

(19) 国家知识产权局



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109699180 B

(45) 授权公告日 2022.07.26

(21) 申请号 201780043057.1

(73) 专利权人 格勒诺布尔-阿尔卑斯大学

(22) 申请日 2017.05.11

地址 法国圣马丹德艾赫

(65) 同一申请的已公布的文献号

(72) 发明人 唐纳德·基思·马丁

申请公布号 CN 109699180 A

娜塔丽·皮克莱-德哈汉

(43) 申请公布日 2019.04.30

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理
事务所(普通合伙) 11400

(30) 优先权数据

专利代理人 方挺 侯晓艳

16/54213 2016.05.11 FR

(51) Int.CI.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12M 3/00 (2006.01)

2019.01.10

审查员 薛育菲

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2017/051148 2017.05.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/194894 FR 2017.11.16

权利要求书6页 说明书44页 附图54页

(54) 发明名称

细胞共培养芯片及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其包含中央模块(104)，该中央模块包括：-中央单元(105)，以及-基底(106)，所述中央单元包含：-由不可吸收性膜(1)组成的支撑件；-包括至少一个突起(8)的3D纳米结构化多孔膜(5)，所述3D纳米结构化多孔膜(5)和所述至少一个突起(8)由适于培养两种不同细胞类型的材料构成，所述中央单元(105)集成在所述基底(106)中，并与所述基底(106)形成为一体。

1. 微流体细胞培养芯片，其包含中央模块(104)，该中央模块包括：

- 中央单元(105)，其包含

- 由不可吸收性膜组成的支撑件(1)，所述支撑件包括由至少一个穿孔(4)穿过的上表面(2)和下表面(3)，

- 3D纳米结构化多孔膜(5)，所述3D纳米结构化多孔膜包括上表面(6)和下表面(7)，并且包括至少一个突起(8)，所述至少一个突起包括外表面(9)和内表面(10)，并且在所述3D纳米结构化多孔膜(5)的上表面(6)一侧上形成浮雕结构，所述突起为具有圆形基底(13)的中空圆顶的形状，

所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述下表面(7)被定位为固定于所述支撑件(1)的所述上表面(2)，

或者所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)被定位为固定于所述支撑件(1)的所述下表面(3)，

并且所述3D纳米结构化多孔膜(5)和所述至少一个突起(8)由适于培养两种不同细胞类型的材料构成；

- 基底(106)，

所述中央单元(105)集成在所述基底(106)中，并与所述基底(106)形成整体。

2. 根据权利要求1所述的微流体细胞培养芯片，其中，所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述下表面(7)被定位为固定至所述支撑件(1)的所述上表面(2)。

3. 根据权利要求1所述的微流体细胞培养芯片，其中，所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)被定位为固定至所述支撑件(1)的所述下表面(3)。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的微流体细胞培养芯片，所述支撑件(1)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU8组成。

5. 根据权利要求1所述的微流体细胞培养芯片，其中所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)具有：

位于所述支撑件(1)的上表面即所述穿孔的上部分(11)的圆形部分，所述上部分具有直径d1，即所述穿孔的上部直径d1，和穿过所述穿孔(4)的所述上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)，以及

在所述支撑件(1)的下表面(3)，即所述穿孔的下部分(12)处的圆形部分，所述下部分具有直径d2，即所述穿孔的下部直径d2，和穿过所述穿孔的所述下部分的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(w)，其中所述轴(x)和轴(w)重合，

所述穿孔的上部直径d1的值的范围从大于或等于10μm到小于或等于500μm，所述穿孔的下部直径d2的值的范围从大于或等于10μm到小于或等于500μm，

以使所述穿孔的下部直径d2的值大于或等于所述穿孔的上部直径d1的值，

并且其中所述突起(8)的所述圆形基底(13)具有直径d3，即所述突起的圆形基底的直径d3，所述突起(8)的直径d3的值的范围从10μm到500μm，并且小于、等于或大于d1的值，以及所述突起具有1μm到600μm的高度。

6. 根据权利要求5所述的微流体细胞培养芯片，其中所述突起具有从1μm到300μm的高度。

7. 根据权利要求5所述的微流体细胞培养芯片，其中所述突起具有从50μm到300μm的高

度。

8. 根据权利要求5所述的微流体细胞培养芯片,所述突起的高度为50μm。

9. 根据权利要求2和5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片,其中,所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地或部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)。

10. 根据权利要求9所述的微流体细胞培养芯片,其中,所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体上面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4) :

-当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1的值大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3的值时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

-当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1的值大于所述至少一个突起(8)的直径d3的值时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)以小于或等于[(d1-d3)/2]的距离值彼此分开。

11. 根据权利要求1、2和5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的外表面(9)支撑至少一个贴壁细胞,并且其中所述突起(8)的内表面(10)支撑至少一个贴壁细胞。

12. 根据权利要求11所述的微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述外表面(9)在汇合阶段支撑第一组贴壁细胞,所述第一组贴壁细胞为一组基质细胞,并且所述突起(8)的所述内表面(10)在汇合阶段支撑第二组贴壁细胞,所述第二组贴壁细胞是一组上皮细胞。

13. 根据权利要求1、2、5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片,包括至少两个突起(8),并且其中两个相邻突起之间的距离为1,所述1的值的范围从10μm至100μm,

所述中央单元的1cm²表面的最大突起(8)数量为:

$$\frac{\pi (d3/2)^2}{(1 + d3) - \pi (d3/2)^2}$$

并且其中d3是所述突起(8)的圆形基底(13)的直径。

14. 根据权利要求13所述的微流体细胞培养芯片,其中,所述1的值的范围从50μm至100μm。

15. 根据权利要求1至3和5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片,其中所述3D纳米结构化多孔膜(5)由至少一层聚电解质组成,所述至少一层聚电解质选自聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)、聚(乙烯亚胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(丙烯酰胺-共-二烯丙基二甲基氯化铵)、二烯丙基二甲基氯化铵、聚(烯丙基胺盐酸盐)(PAH)、聚乙醇磺酸、聚丙烯酸、聚(苯乙烯-alt-马来酸)、聚硫酸乙烯酯、聚乙烯磺酸、聚(2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸)、聚(2-丙烯酰胺-2-甲基-1-丙磺酸-共聚-丙烯腈)、聚(4-苯乙烯磺酸)、聚(4-苯乙烯磺酸-共聚-马来酸)、水合4-苯乙烯磺酸钠,

并且其中当所述3D纳米结构化多孔膜(5)由至少两个连续层组成时,由带正电荷的聚电解质组成的层与由带负电荷的聚电解质组成的层交替。

16. 根据权利要求15所述的微流体细胞培养芯片,其中所述3D纳米结构化多孔膜(5)由1至150个连续的聚电解质层组成。

17. 根据权利要求16所述的微流体细胞培养芯片,其中,所述3D纳米结构化多孔膜(5)由15层连续的相互交替的聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)和/或聚(烯丙基胺盐酸盐)(PAH)组成。

18. 根据权利要求5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片,其包含实心下部模块(107),包括

-下部单元(108),其包括上表面、下表面和至少一个侧面,并且包括至少一个管状导管(14),所述管状导管包括具有直径d4的上孔口(15)和具有直径d5的下孔口(16),所述上孔口(15)具有穿过所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t),

-基底(109),

所述下部单元(108)集成在所述基底(109)中,并与所述基底(109)形成为一体,

所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4的值大于或等于所述导管(14)的所述下孔口(16)的直径d5的值,并且所述直径d4的值大于或等于所述至少一个穿孔(4)的下部直径d2的值,

所述下部单元(108)的所述上表面包括所述至少一个导管的所述上孔口(15),并且所述下孔口(16)本身或通过中间装置通向所述基底(109)的外部。

19. 根据权利要求18所述的微流体细胞培养芯片,其中所述下部模块(107)和所述中央模块(104)被组装成使得所述下部单元(108)的所述上表面的所述至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述中央单元(105)的所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)上开口,所述至少一个导管(14)的下孔口(16)其本身通向芯片的外部,或者经由由容器(17)构成的中间装置通向芯片的外部,该容器能够回收液体并且使得能够经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片外部,

所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面具有彼此相同的形状和表面,

并且所述下部单元(108)和所述中央单元(105)由分别位于所述下部模块(107)和所述中央模块(104)的每个基底上的连接元件(204)组装,以便以密封的方式组装所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面(3)。

20. 根据权利要求18所述的微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个导管(14)的所述上孔口(15)通向所述支撑件(1)的一个单个穿孔(4),并且其中所述支撑件(1)的所述穿孔(4)整体地面向所述至少一个导管(14)的所述上孔口(15):

-当所述穿孔(4)的下部直径d2的值等于所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4的值时,穿过所述穿孔(4)的下部分(12)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(w)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或者

-当所述穿孔(4)的下部直径d2的值小于所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4的值时,穿过所述穿孔(4)的所述下部分(12)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(w)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或者以小于或等于[(d4-d2)/2]的距离值彼此分开。

21. 根据权利要求18所述的微流体细胞培养芯片,其中所述下部模块(107)包括至少两个导管(14),

并且其中所述至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4),

-并且至少两个导管(14)的至少两个下孔口(16)分别通向芯片的外部到至少两个不同的位置，

-或者所有至少两个导管(14)的至少两个下孔口(16)通向由容器(17)构成的一个相同的中间装置，该容器能够回收液体，并且能够经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片外部。

22. 根据权利要求1、2、5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片，其包含上部模块(101)，所述上部模块包括：

-具有实心表面并且中空的上部单元(102)，其包括限定开放体积或腔室(203)的实心表面，并且所述实心表面的边缘能够与所述中央模块(104)的所述中央单元(105)接触并限定所述开放体积的开口的表面；和

-基底(103)，

所述上部单元(102)集成在所述基底(103)中，并与所述基底(103)形成为一体。

23. 根据权利要求22所述的微流体细胞培养芯片，其中所述上部模块(101)的所述上部单元(102)和所述中央模块(104)的所述中央单元(105)被组装，使得所述上部单元(102)的开口的所述表面位于所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)上方，以形成由所述上部单元(102)的所述实心表面和所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)界定的封闭空间，

所述开口的所述表面和所述上表面(6)具有彼此相同的形状和表面，

所述上部模块(101)的所述上部单元(102)和所述中央模块(104)的所述中央单元(105)由位于上部模块(101)和中央模块(104)的每个基底(103、106)上的连接元件(201、204)组装，以便以密封的方式组装所述上部单元(102)的开口的所述表面和所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)

所述上部单元(102)的所述至少一个实心表面具有分别通向入口/出口导管(202)的两个孔，使得所述封闭空间能够经由通向基底(109)外部的所述入口/出口导管(202)与微流体芯片的外部连通。

24. 根据权利要求1、2、5至8中任一项所述的微流体细胞培养芯片，还包括上部模块(101)和下部模块(107)，并且其中所述上部模块(101)、所述下部模块(107)和所述中央模块(104)被组装成使得：

所述上部模块(101)的上部单元(102)的开口的表面位于所述中央模块(104)的所述中央单元(105)的所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)上方，

并且所述下部模块(107)的下部单元(108)的上表面的至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述中央单元(105)的所述支撑件(1)的至少一个所述穿孔(4)上开口，

所述上部单元(102)的开口的所述表面和所述中央单元(105)的所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)具有彼此相同的形状和表面，

所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面(3)具有彼此相同的形状和表面，以及

所述上部模块(101)，所述中央模块(104)和所述下部模块(107)由位于各个基底(103、106、109)上的连接元件(201、204)组装。

25. 根据权利要求24所述的微流体细胞培养芯片，其中所述突起(8)的所述内表面(10)

整体地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

-使得当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1的值大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3的值时，穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起；或者

-使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1的值大于所述至少一个突起(8)的直径d3的值，并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)以小于或等于 $[(d_1 - d_3)/2]$ 的距离值彼此分开；

并且当所述支撑件(1)的所述穿孔(4)整体地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)时：

使得当d4的值大于d2的值时，穿过所述突起(8)的所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起，或者以小于或等于 $[(d_4 - d_3)/2]$ 的距离值彼此分开。

26.一种制备根据权利要求2和5至25中任一项所述的微流体细胞培养芯片的方法，其中，中央模块(104)的中央单元(105)的制备包括：

-通过所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)挤压可吸收性聚合物(22)的溶液以在所述支撑件(1)的所述上表面(2)的侧面上形成至少一个3D纳米结构(23)的步骤，所述至少一个3D纳米结构是圆顶形状，之后

-聚合所述可吸收性聚合物溶液以使所述至少一个3D纳米结构(23)刚性化的步骤，所述至少一个3D纳米结构(23)经聚合后在所述支撑件的所述上表面侧形成可吸收性聚合物(22)的模具，之后

-施加至少一种聚电解质的至少一个连续层的步骤，所述至少一种聚电解质的至少一个连续层覆盖在所述支撑件(1)的上表面(2)和所述可吸收性聚合物(22)的模具的表面上以构成3D纳米结构化多孔膜(5)，之后

-溶解所述可吸收性聚合物的模具以获得所述3D纳米结构化多孔膜(5)的下表面(7)的步骤，所述3D纳米结构化多孔膜(5)固定至所述支撑件(1)的所述上表面(2)上，并且至少一个突起(8)的内表面(10)整体地面向至少一个穿孔(4)定位，

所述可吸收性聚合物(22)选自壳聚糖、琼脂糖和藻酸盐。

27.一种用于制备根据权利要求3所述的微流体细胞培养芯片的方法，其中，中央模块包括中央单元，所述中央模块的制备包括：

(i) 组装支撑部件(I、i)的步骤，该支撑部件包括侧框架(213)、敞开的上表面(214)和实心的下表面(215)，该下表面包括中央单元形状的切口(216)，以及具有所述支撑部件(I、i)的形状和尺寸的模具(H、H1、H2、h1、h2)，该模具在上表面(209)上包括至少一个模压的3D纳米结构(208)，

(ii) 在所述模具(H、H1、H2、h1、h2)的所述上表面(209)上浇注可吸收性聚合物(22)的溶液的步骤，之后

(iii) 聚合所述可吸收性聚合物(22)的溶液以使所述可吸收性聚合物的溶液刚性化并形成可吸收性聚合物基体(210)的步骤，所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一种3D纳

米结构的至少一个阴模(211),之后

(iv) 移除所述模具(H、H1、H2、h1、h2)以获得所述可吸收性聚合物基体(210)的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括在所述支撑部件(I、i)的实心的下表面(215)的所述切口(216)中形成的所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211),之后

(v) 将所述支撑部件(I、i)与穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)组装在一起的步骤,所述穿孔部件包括由不可吸收性膜构成的支撑件(1),所述不可吸收性膜被集成在基底(106)中的至少一个穿孔(4)穿过,

所述穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)具有所述支撑部件(I、i)的形状和尺寸,并且所述穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)的穿孔(4)的数量与步骤(i)中使用的所述模具(H、H1、H2、h1、h2)中模压的3D纳米结构(208)的数量相同,

使得所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)与所述至少一个3D纳米结构的所述至少一个阴模(211)对准,接下来

(vi) 在由所述支撑件(1)的下表面(3)和所述可吸收性聚合物基体(210)的下表面(212)组成的连续表面上施加至少一种聚电解质的至少一个连续层的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括在所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)处的所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211),以构成包括至少一个突起(8)的3D纳米结构化多孔膜(5),之后

(vii) 溶解所述可吸收性聚合物基体(210)的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211),

(viii) 移除所述支撑部件(I、i)以获得所述穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)的步骤,所述穿孔部件在其下表面(3)上包括3D纳米结构化多孔膜(5),并且在其上表面侧包括所述至少一个突起。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中所述模具由塑料制成。

细胞共培养芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其包括多个部件，每个部件由术语“模块”表示，并可两个两个地组装。

[0002] 本发明还涉及制备所述芯片的方法，以及其在诊断领域的用途。

背景技术

[0003] 许多现有设备是为了在芯片上的仿制器官而开发的，该设备由2D膜组成。

[0004] 在专利US8647861B2(发明人为Ingber等人，提交于2011年10月13日)中，发明人开发了一种有机模拟装置，使得在膜的两侧共培养贴壁细胞成为可能，该装置配备有能够在膜周围产生压差的装置，从而产生膜的膨胀或收缩，以便在组织与组织界面处再现在活体内存在的机械应力。该装置基于微流体系统，该微流体系统包括由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成的柔性多孔膜，使得流体能够沿着所述膜循环，特别是使得能够在呼吸期间模拟肺泡，所述柔性多孔膜在两个微流体导管的界面处。

[0005] 在专利US2014/0038279A1(发明人为Ingber等人，提交于2012年2月28日)中，发明人提出了一种细胞共培养系统，使得繁殖天然肠上皮结构并模拟其行为成为可能。这种基于微流体系统的有机模拟装置包括PDMS多孔膜，该多孔膜位于两个微流体导管的界面处，使得流体能够沿着所述膜循环，并且在该多孔膜的至少一侧培养有一层肠上皮细胞。膜与支撑元件的耦合导致膜在至少一个维度上伸长的运动，从而使得再现在活体内组织的运动成为可能。

[0006] 即使这些装置能够重建组织与组织界面以及活体内存在的机械应力，以模拟器官的微结构，细胞共培养仍保留在2D培养基上，无法再现某些器官的形态。

[0007] 2013年，Kim等人在他们题为《芯片上肠微环境对人小肠细胞绒毛分化的诱导作用》(“Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation”，*Integr.Biol.*, 5, 1130)的出版物中提出了一种有机模拟微流体芯片，从而可以繁殖3D肠绒毛，就像在活体内肠中形成的绒毛一样。该芯片基于微流体系统，包括位于两个微流体导管的界面处的PDMS多孔膜，使得流体能够沿所述膜循环，并且在该膜上培养了Caco-2肠上皮细胞，该细胞在30μL/h的恒定培养基流的存在下，在培养两天之后自发形成绒毛。

[0008] 然而，所有这些装置都提出了在PDMS多孔膜上进行细胞共培养，这在生物相容性(惰性、孔隙率)方面不是最佳的。PDMS可以吸收小的有机成分也可以吸收药物，并且对于气体的渗透性，PMDS可能会阻碍某些应用。此外，PDMS膜可以具有与组织的天然基膜不同的固有运输、机械和结构性质。通过重新创建这些类型的界面，作者倾向于器官微结构的复制。

[0009] 2014年，March等人在他们题为《三维生态位中肠干细胞分化》(“Differentiating Intestinal Stem Cells in a 3D Niche”)的出版物中提出了一种使用聚乳酸乙醇酸结构的体外肠模型，该模型具有微绒毛的三维形态，并且能够支持其表面上的不同类型的上皮细胞的共培养，例如Caco-2和HT29-MTX肠上皮细胞的共培养。这个模型使得在微绒毛表面

以类似于体内肠道的方式使细胞分化成为可能。

[0010] 因此,即使某些当前装置具有由PDMS或PGLA制成的结构,使得有可能模拟器官的微绒毛,已知标记物的检测是通过细胞附着后的免疫荧光和使用抗体进行标记来完成的,因此这意味着用于分析的细胞裂解。

[0011] 许多出版物指出,在3D结构上培养的细胞与在2D中培养的相同细胞不具有相同的特性;在基因和蛋白质表达谱、细胞粘附、增殖速度和细胞分化方面确实存在差异。此外,对细胞类型药物的代谢反应是不同的,根据这种反应,细胞在2D和3D中被培养,如Kim等人在2013年发表的题为《芯片上肠微环境对人小肠细胞绒毛分化的诱导作用》(“Gut-on-a-Chip microenvironment induces human intestinal cells to undergo villus differentiation”, Integr. Biol., 5, 1130)中,他们在Transwell®D培养模型和包含模拟微绒毛的3D结构的培养模型之间比较了细胞色素酶P450代谢药物的活性,并表明在2D中,该活性在培养期间保持不变,而在3D中,该活性在微绒毛形成期间增加,然后稳定。

[0012] 细胞培养基的形态对细胞的行为有显著影响,因此尽可能精确地复制细胞的体内条件是很重要的,以便开发可靠的细胞培养模型。

发明内容

[0013] 在本发明中,发明人开发了细胞共培养微流体芯片,模拟具有腺泡/管状结构和腔微环境的器官的微绒毛。

[0014] 根据本发明的微流体芯片包括由多孔生物材料制成的膜,该膜包含褶皱从而形成3D中空突起,在突起处,在所述膜的任一侧培养有贴壁细胞(cellules adhérentes)。该膜与微流体系统的耦合使得在细胞培养期间回收细胞分泌物以分析他们的组成。

[0015] 因此,与现有技术不同,通过在贴壁细胞上的免疫标记检测标记物,从而意味着细胞的死亡(Kim等人,2013年),根据本发明的芯片使得能够在培养在突起上的细胞分泌物中进行这些检测,这些分泌物由微流体系统回收。

[0016] 因此,根据本发明的芯片可收集活细胞上的分泌物,并因此在培养过程中不同时间收集分泌物,甚至在几天内进行动力学研究,同时随着时间的推移保持细胞的活力和功能。

[0017] 这些分泌物包括所有可在细胞培养基中分泌的微粒。如肽、蛋白质、氨基酸、miRNA、DNA、RNA。

[0018] 这些分泌物的分析图谱使得获得分泌蛋白质组成为可能,即分泌物成分的定性和定量图谱。

附图说明

[0019] 图1:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支持件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起整体地面向穿孔。

[0020] 图2:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支持件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值小于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起整体地面向穿孔。

[0021] 图3:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,以及所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中所述突起部分地面向穿孔。

[0022] 图4:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且小于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起部分地面向穿孔。

[0023] 图5:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值小于所述穿孔的下部直径d2的值,并且小于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起部分地面向穿孔。

[0024] 图6:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且小于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起部分地面向穿孔。

[0025] 图7:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起整体地面向穿孔。

[0026] 图8:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起整体地面向穿孔。

[0027] 图9:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值小于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起整体地面向穿孔。

[0028] 图10:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值小于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起部分地面向穿孔。

[0029] 图11:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值小于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,并且其中突起整体地面向穿孔。

[0030] 图12:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,并且其中突起相对于纵轴(y)沿着轴(z)倾斜。

[0031] 图13:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中突起的内表面在汇合阶段被一组第一细胞类型覆盖,并且突起的外表面在汇合阶段被一组第二细胞类型覆盖。

[0032] 图14:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,所述导管的上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起整体地面向导管。

[0033] 图15:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,

并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，所述导管的上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且大于下孔口的直径d5的值，并且其中突起整体地面向导管。

[0034] 图16：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部段的直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起整体地面向导管。

[0035] 图17：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部段的直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起整体地面向导管。

[0036] 图18：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部段的直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起整体地面向导管。

[0037] 图19：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，所述导管的上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起整体地面向导管。

[0038] 图20：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起部分地面向导管。

[0039] 图21：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且小于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，其中上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起部分地面向导管。

[0040] 图22：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔，其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且小于所述突起的圆形基底的直径d3的值，所述中央单元位于包括导管的下部单元上，其中上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值，并且等于下孔口的直径d5的值，并且其中突起部分地面向导管。

[0041] 图23：中央单元的示意性横截面图，该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突

起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且小于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0042] 图24:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,其中上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0043] 图25:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0044] 图26:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0045] 图27:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,所述导管的上孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0046] 图28:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,所述导管的上部孔口的直径d4的值大于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下部孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0047] 图29:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,其中上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0048] 图30:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的突起和支撑件中的穿孔,其中所述穿孔的上部直径d1的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且大于所述突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括导管的下部单元上,其中上孔口的直径d4的值等于所述穿孔的下部直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且其中突起部分地面向导管。

[0049] 图31:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的两个突起和支撑件中的两个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括两个导管的下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部区段的直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且两个导管的两个下孔口分别通向容器,经由出口导管通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0050] 图32:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的两个突起和支撑件中的两个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括两个导管的下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部区段的直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且两个导管的两个下孔口在两个不同的位置通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0051] 图33:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的两个突起和支撑件中的两个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括两个导管的下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部区段的直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且两个导管彼此连接,使得两个导管的两个下孔口在同一位置通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0052] 图34:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的两个突起和支撑件中的两个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括两个导管的下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部区段的直径d2的值,并且等于下孔口的直径d5的值,并且两个导管的两个下孔口分别通向容器,每个容器通过彼此连接的出口导管在同一位置通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0053] 图35:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的两个突起和支撑件中的两个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括两个导管的下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且大于下孔口的直径d5的值,并且两个导管彼此连接,使得两个导管的两个下孔口通向容器上的相同位置,容器通过出口导管通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0054] 图36:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的两个突起和支撑件中的两个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括两个导管的下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部区段的直径d2的值,并且大于下孔口的直径d5的值,并且两个导管的两个下孔口分别通向同一个容器上的两个不同位置,容器通过出口导管通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0055] 图37:中央单元的示意性横截面图,该中央单元包括3D纳米结构化多孔膜中的四个突起和支撑件中的四个穿孔,其中每个穿孔的上部直径d1的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且等于每个突起的圆形基底的直径d3的值,所述中央单元位于包括四个导管的

下部单元上,其中每个导管的上孔口的直径d4的值等于每个穿孔的下部直径d2的值,并且第一组两个导管的两个下孔口分别通向第一容器上的两个不同位置,并且第二组两个导管的两个下孔口分别通向第二容器上的两个不同位置,第一容器和第二容器分别在不同位置通向下部模块的外部(突起整体地面向导管)。

[0056] 图38:上部模块的示意性透视图。

[0057] 图39:中央模块的示意性透视图。

[0058] 图40:从3D纳米结构化多孔膜的表面上方截取的中央单元的示意性透视图,该中央单元包括一组突起。

[0059] 图41:下部模块的示意性透视图。

[0060] 图42:微流体芯片的示意性透视图,包括上部模块、中央模块和下部模块的组合。

[0061] 图43:上部模块的照片(腔室开口的侧视图)。

[0062] 图44:中央模块的照片。包括一组突起的3D纳米结构化多孔膜的上表面的俯视图。

[0063] 图45:下部模块的照片。下部单元的上表面的俯视图,其包括导管的一组上孔口。

[0064] 图46:上部模块和下部模块的照片。

[0065] 图47:分解的上部模块、分解的中央模块和分解的下部模块的照片。

[0066] 图48:支撑件的示意性横截面图,该中央单元的支撑件由不可吸收性膜组成,该支撑件包括穿孔。

[0067] 图49:由不可吸收性膜组成的中央单元的支撑件的示意性横截面图,该支撑件包括穿孔,可吸收性聚合物通过该穿孔被挤压以在所述支撑件的上表面一侧形成3D纳米结构。

[0068] 图50:中央单元的支撑件的示意性横截面图,该支撑件由不可吸收性膜组成并包括穿孔,可吸收性聚合物通过该穿孔被挤出成型,以在所述支撑件的上表面的侧面上形成3D纳米结构,在该侧面上施加聚电解质层以获得3D纳米结构多孔膜,该3D纳米结构多孔膜包括所述3D纳米结构上的模压突起。

[0069] 图51:中央单元的支撑件的示意性横截面图,该支撑件由不可吸收性膜组成并包括穿孔,该支撑件位于中央单元的穿孔上,包括中空突起的3D纳米结构化多孔膜上固定至其上。

[0070] 图52:使用共聚焦显微镜拍摄的突起内表面的照片,在汇合阶段该突起内表面支持上皮细胞的培养。

[0071] 图53:模具的示意性横截面图,在所述模具上表面的侧面上包括至少一个模压的3D纳米结构。

[0072] 图54:模具的示意性截面图,在所述模具上表面的侧面上覆盖有可吸收性聚合物。

[0073] 图55:可吸收性聚合物基体的示意性横截面图,该可吸收性聚合物基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模。

[0074] 图56:可吸收性聚合物基体的示意性横截面图,该可吸收性聚合物基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模,所述基体的下表面被聚电解质层覆盖。

[0075] 图57:可吸收性聚合物基体的示意性横截面图,该基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模,该阴模与穿孔部件组装在一起,该穿孔部件包括支撑件,所述支撑件由通过至少一个穿孔穿过的不可吸收性膜构成,所述基体在其下表面的侧面上与所述支撑

件的上表面组装在一起，使得3D纳米结构的阴模与所述支撑件的穿孔对齐。

[0076] 图58:可吸收性聚合物基体的示意性横截面图,该基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模,该阴模与穿孔部件组装在一起,该穿孔部件包括由通过至少一个穿孔穿过的不可吸收性膜构成的支撑件,所述基体在其下表面上的侧面上与所述支撑件的上表面组装在一起,使得3D纳米结构的阴模与所述支撑件的穿孔对齐,其中由所述支撑件的下表面和所述可吸收性聚合物基体的下表面构成的连续表面在所述支撑件的所述至少一个穿孔处,被聚电解质层覆盖以形成包括至少一个突起的3D纳米结构化多孔膜,所述可吸收性聚合物基体包括至少一个阴模。

[0077] 图59:对应于穿孔部件的中心模块的示意性横截面图,该穿孔部件在支撑件的下表面侧包括3D纳米结构化多孔膜,并且在支撑件的上表面侧包括穿孔部件的支撑件的至少一个穿孔的延伸部中的至少一个突起。

[0078] 图60:模具的示意性横截面图,该模具在其上表面侧包括至少一个模压的3D纳米结构,该模具在其上表面侧装配有支撑部件,该支撑部件在其下表面包括切口。

[0079] 图61:模具的示意性横截面图,该模具在其上表面的侧面上包括至少一个模压的3D纳米结构,该模具在其上表面的侧面上组装有支撑部件,该支撑部件在其下表面上有切口,其中所述模具在其上表面的侧面上被可吸收性聚合物覆盖。

[0080] 图62:可吸收性聚合物基体的示意性横截面图,该可吸收性聚合物基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模,所述基体在支撑部件的切口处形成。

[0081] 图63:支撑部件的示意性横截面图,该支撑部件在其实心下表面的切口处包含可吸收性聚合物基体,该可吸收性聚合物基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模,所述支撑部件被组装到穿孔部件上,该穿孔部件包括具有至少一个穿孔的支撑件,使得至少一个模压3D纳米结构的所述阴模与所述穿孔对齐。

[0082] 图64:支撑部件的示意性横截面图,该支撑部件在其实心下表面的切口处包含可吸收性聚合物基体,该可吸收性聚合物基体包括至少一个模压3D纳米结构的至少一个阴模,所述支撑部件被组装到穿孔部件上,该穿孔部件包括具有至少一个穿孔的支撑件,使得至少一个模压3D纳米结构的所述阴模与所述穿孔对齐,由所述支撑件的下表面和所述可吸收性聚合物基体的下表面构成的连续表面包括在所述支撑件的所述至少一个穿孔处,被聚电解质层覆盖以形成包括至少一个突起的3D纳米结构化多孔膜,所述可吸收性聚合物基体包括至少一个阴模。

[0083] 图65:穿孔部件的支撑件的示意性横截面图,该支撑件在其下表面侧包括3D纳米结构化多孔膜,在其上表面侧包括在穿孔部件的支撑件的至少一个穿孔的延伸部中的至少一个聚电解质突起,以及支撑部件I。

[0084] 图66:对应于穿孔部件的中心模块的示意性横截面图,该穿孔部件在支撑件的下表面侧包括3D纳米结构化多孔膜,并且在支撑件的上表面侧包括穿孔部件的支撑件的至少一个穿孔的延伸部中的至少一个突起。

[0085] 图67:圆形支撑部件I、圆形模具H、圆形穿孔部件G和中央模块的支撑部件F的示意性透视图,其中所述圆形模具H包括100个模压3D纳米结构(H1),所述圆形穿孔部件G包括100个穿孔(G1)。

[0086] 图68:圆形支撑部件I、圆形模具H、圆形穿孔部件G和中央模块的支撑部件F的示意

性透视图,其中所述圆形模具H包括9个模压的3D纳米结构(H2),所述圆形穿孔部件G包括9个穿孔(G2)。

[0087] 图69:圆形支撑部件I在圆形模具H上的组件的示意性透视图,圆形模具H包括100个模压3D纳米结构(H1),并通过I的定位销和H1的对准孔组装。A:两元件组装后的俯视图。B:元件分解后的俯视图。C:两元件组装后的侧视图。D:两元件分解后的侧视图。

[0088] 图70:圆形支撑部件I在圆形穿孔部件G上的组装示意性透视图,圆形穿孔部件G包括100个穿孔(G1)并通过I的定位销和G1的对准孔组装。A:两个元件组装后的俯视图。B:元件分解后俯视图。C:两元件组装后的仰视图。D:两元件分解后的仰视图。E:两组装元件翻转时的侧视图,此时G1朝向顶部且I朝向底部。

[0089] 图71:圆形穿孔部件G的组件的示意性透视图,该圆形穿孔部件G包括中央模块的支撑部件F上的100个穿孔(G1)。A:两个元件组装的仰视图。B:两个元件分解后的仰视图。C:两个元件组装后的侧视图。D:两个元件分解后的侧视图。

[0090] 图72:正方形支撑部件i、正方形模具H和正方形穿孔部件G的示意性透视图,其中正方形模具H包括100个模压3D纳米结构(h1),正方形穿孔部件G包括100个穿孔(g1)。

[0091] 图73:正方形支撑件部i、正方形模具H和正方形穿孔部件G的示意性透视图,其中正方形模具H包括9个模压的3D纳米结构(h2),正方形穿孔部件G包括9个穿孔(g2)。

[0092] 附图标记说明

- [0093] 1:由不可吸收性膜组成的支撑件(中央单元)
- [0094] 2:由不可吸收性膜组成的支撑件的上表面(中央单元)
- [0095] 3:由不可吸收性膜组成的支撑件的下表面(中央单元)
- [0096] 4:由不可吸收性膜组成的支撑件的穿孔(中央单元)
- [0097] 5:3D纳米结构多孔膜(中央单元)
- [0098] 6:3D纳米结构多孔膜的上表面(中央单元)
- [0099] 7:3D纳米结构多孔膜的下表面(中央单元)
- [0100] 8:突起(中央单元)
- [0101] 9:突起的外表面(中央单元)
- [0102] 10:突起的内表面(中央单元)
- [0103] 11:支撑件上表面的穿孔部分(中央单元)
- [0104] 12:支撑件下表面的穿孔部分(中央单元)
- [0105] 13:突起的圆形基底(中央单元)
- [0106] 14:导管(下部单元)
- [0107] 15:导管的上孔口(下部单元)
- [0108] 16:导管的下孔口(下部单元)
- [0109] 17:容器(下部单元)
- [0110] 18:容器导管(下部单元)
- [0111] 19:通向入口/出口导管的上部单元的孔口(上部单元)
- [0112] 20:导管的上孔口(下部模块)
- [0113] 21:导管的下孔口(下部模块)
- [0114] 22:可吸收性聚合物

- [0115] 23:3D纳米结构
- [0116] 24:上皮细胞
- [0117] 101:上部模块
- [0118] 102:上部单元
- [0119] 103:上部模块的基底
- [0120] 104:中央模块
- [0121] 105:中央单元
- [0122] 106:中央模块的基底
- [0123] 107:下部模块
- [0124] 108:下部单元
- [0125] 109:下部模块的基底
- [0126] 201:连接元件
- [0127] 202:入口/出口导管(上部模块)
- [0128] 203:腔室(上部单元)
- [0129] 204:连接元件
- [0130] 205:导管下孔口组(下部模块)
- [0131] 206:导管上孔口组(下部模块)
- [0132] 207:突起组(中央模块)
- [0133] 208:模压3D纳米结构
- [0134] 209:模具的上表面
- [0135] 210:可吸收性聚合物基体
- [0136] 211:3D纳米结构阴模
- [0137] 212:基体的下表面
- [0138] F:中央模块的支撑部件
- [0139] 213:支撑部件的侧框架
- [0140] 214:支撑部件的敞开的上表面
- [0141] 215:支撑部件的实心下表面
- [0142] 216:支撑部件的实心面的切口
- [0143] 217:定位销
- [0144] 218:对准孔
- [0145] H、H1、H2、h1、h2:模具
- [0146] I、i:支撑部件
- [0147] G、G1、G2、g1、g2:穿孔部件

具体实施方式

- [0148] 本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其包含中央模块(104),该中央模块包括:
- [0149] -中央单元(105),其包含
- [0150] -由不可吸收性膜(1)组成的支撑件,该支撑件包括上表面(2)和下表面(3),该上表面和下表面由至少一个穿孔(4)穿过,

[0151] -3D纳米结构化多孔膜(5),包括上表面(6)和下表面(7),并且包括至少一个突起(8),所述至少一个突起包括外表面(9)和内表面(10),并且在3D纳米结构化多孔膜(5)的上表面(6)的侧面上形成浮雕结构(图40),

[0152] 所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述下表面(7)被定位为固定到所述支撑件(1)的所述上表面(2),

[0153] 或者3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)被定位为固定到所述支撑件(1)的所述下表面(3),

[0154] 并且所述3D纳米结构化多孔膜(5)和所述至少一个突起(8)由适于培养两种不同细胞类型的材料组成;

[0155] -基底(106),

[0156] 所述中央单元(105)集成在所述基底(106)中,并与所述基底(106)形成一个整体(图39和40)。

[0157] 表述“不可吸收性膜”是指该膜不能通过物理方法去除,也不能通过化学方法在水性溶剂中去除。

[0158] 表述“穿孔”与支撑件相关,是指从一端到另一端穿过支撑件的开口,即穿过支撑件的下表面和上表面之间的开口,从而使这两个表面之间的连通成为可能。

[0159] 所述支撑件的穿孔形成穿过所述支撑件的空间,其特征在于所述支撑件的上表面处的部分和所述支撑件的下表面处的部分。

[0160] 涉及3D纳米结构化多孔膜的表述“突起”是指在所述3D纳米结构化多孔膜的上表面侧形成浮雕结构的突出的突起。

[0161] 涉及3D纳米结构化多孔膜的表述“多孔的”是指所述膜包括从所述膜的上表面延伸至下表面的直径在2nm至10nm之间的相互连接的连续孔。这些孔使得通过膜进行气体交换以及培养基中包含的小微粒(生长因子、血清蛋白、确保细胞活力的营养元素,如Ca²⁺、K⁺、Na⁺离子)交换成为可能。这些孔也使得药物分子能够通过,例如抑制剂或抗癌分子、小RNAs(例如干扰RNAs)、激素(例如二氢睾酮)。

[0162] 涉及多孔膜的表述“3D纳米结构”是指在所述多孔膜的上表面上存在至少一个浮雕结构,即三维浮雕结构,所述结构的尺度约为1纳米。

[0163] 表述“固定”是指所述支撑件和所述膜之间的连接类型,是指在所述支撑件和所述膜之间建立化学键以及疏水和静电相互作用,以便通过密封连接将所述膜和所述支撑件结合在一起。

[0164] 术语“基底”是指其中集成有所述单元的实心部分。

[0165] 用于表征基底和单元之间的布置的术语“形成整体”意味着基底和单元一起形成一个单一保持件的一部分,并且不能彼此分离。

[0166] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其包含中央模块(104),该中央模块包括:

[0167] -中央单元(105),其包含

[0168] -由不可吸收性膜(1)组成的支撑件,该支撑件包括上表面(2)和下表面(3),该上表面和下表面由至少一个穿孔(4)穿过,

[0169] -3D纳米结构化多孔膜(5),包括上表面(6)和下表面(7),并且包括至少一个突起

(8),所述至少一个突起包括外表面(9)和内表面(10),并且在3D纳米结构化多孔膜(5)的上表面(6)侧形成浮雕结构(图40),

[0170] 所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述下表面(7)被定位为固定到所述支撑件(1)的所述上表面(2),

[0171] 并且所述3D纳米结构化多孔膜(5)和至少一个突起(8)由适于培养两种不同细胞类型的材料组成;

[0172] -基底(106),

[0173] 所述中央单元(105)集成在所述基底(106)中,并与所述基底(106)形成一个整体(图39和40)。

[0174] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其包含中央模块(104),该中央模块包括:

[0175] -中央单元(105),其包含

[0176] -由不可吸收性膜(1)组成的支撑件,该支撑件包括上表面(2)和下表面(3),该上表面和下表面由至少一个穿孔(4)穿过,

[0177] -3D纳米结构化多孔膜(5),包括上表面(6)和下表面(7),并且包括至少一个突起(8),所述至少一个突起包括外表面(9)和内表面(10),并且在3D纳米结构化多孔膜(5)的上表面(6)的一侧上形成浮雕结构,

[0178] 所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)被定位为固定到所述支撑件(1)的所述下表面(3),

[0179] 并且所述3D纳米结构化多孔膜(5)和至少一个突起(8)由适于培养两种不同细胞类型的材料组成;

[0180] 所述中央单元(105)集成在所述基底(106)中,并与所述基底(106)形成整体。

[0181] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述微流体细胞培养芯片的纳米结构化多孔膜的所述至少一个突起(8)呈中空圆顶的形状,并且具有圆形基底(13)。

[0182] 与突起的形状相关的表述“圆顶的形状”意味着所述突起具有圆形结构,该圆形结构为具有圆形基底的拱形,在所述支撑件的上表面侧形成凸起。

[0183] 在另一个实施例中,所述突起可以具有拱形的圆形结构,其具有椭圆形基底,形成所述支撑件的所述上表面一侧的凸面。

[0184] 表述“呈中空圆顶的形状”意指所述突起的内表面限定了自由体积,因为所述突起是对应于在其下表面侧的所述3D纳米结构化多孔膜的加强件,因此所述加强件在所述膜的下表面侧形成凹面,并因此形成自由体积。

[0185] 与中空圆顶有关的表述“圆形基底”是指自由下表面,所述圆顶形状的突起放置在该自由下表面上,并由所述突起的内表面界定。

[0186] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述支撑件的至少一个穿孔的特征在于所述支撑件上表面的圆形部分和所述支撑件下表面的圆形部分。

[0187] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)具有

[0188] 位于支撑件(1)的上表面的部分(11)(穿孔的上部),其具有穿过穿孔(4)的所述上

部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)，

[0189] 以及位于支撑件(1)的下表面(3)上的部分(12)(穿孔的下部)，其具有穿过穿孔(4)的所述下部(12)中心的轴(w)，所述轴(w)垂直于所述支撑件(1)。

[0190] 并且其中所述轴(x)和(w)重合在一起。

[0191] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述穿孔的圆形截面在支撑件的下表面处的直径d2大于或等于所述穿孔的圆形截面在支撑件的上表面处的直径d1。

[0192] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)具有

[0193] 位于支撑件(1)的上表面的圆形部分(11)(穿孔的上部)，其具有直径d1(穿孔的上部直径d1)和穿过穿孔(4)的所述上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)，

[0194] 以及在支撑件(1)的下表面(3)处的圆形部分(12)(穿孔的下部)，其具有直径d2(穿孔的下部直径d2)和穿过穿孔的下部的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(w)，

[0195] 直径d1大于或等于 $10\mu\text{m}$ ，小于或等于 $500\mu\text{m}$ ，优选为 $150\mu\text{m}$ ，直径d2小于或等于 $500\mu\text{m}$ ，优选为 $150\mu\text{m}$ ，

[0196] 使得直径d2大于或等于直径d1，并且其中所述轴(x)和(w)重合在一起(图1和图2)。

[0197] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中在所述支撑件下表面处的所述穿孔的圆形截面的直径d2大于在所述支撑件上表面处的所述穿孔的圆形截面的直径d1。

[0198] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述穿孔的圆形截面在支撑件的下表面处的直径d2大于所述穿孔的圆形截面在支撑件的上表面处的直径d1，使得比值(d1/d2)范围从0.3到小于1。

[0199] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中在所述支撑件下表面的所述穿孔的圆形截面的直径d2大于在所述支撑件上表面的所述穿孔的圆形截面的直径d1，并且所述支撑件的所述穿孔呈截锥形。

[0200] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1小于所述至少一个穿孔(4)的下部直径d2，并且所述穿孔(4)为截锥形(图2)。

[0201] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述穿孔的圆形截面在支撑件的下表面处的直径d2等于所述穿孔的圆形截面在支撑件的上表面处的直径d1。

[0202] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中在所述支撑件下表面处的所述穿孔的圆形截面的直径d2等于在所述支撑件上表面处的所述穿孔的圆形截面的直径d1，并且所述支撑件的所述穿孔为圆柱体形。

[0203] 在该实施方案中，所述支撑件的穿孔因此具有规则的形状，即，其所有截面的直径具有相等的长度，并且所述截面具有圆形形状。

[0204] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1等于所述至少一个穿孔(4)的下部直径d2，并且所述穿孔(4)为圆柱

体形(图1)。

[0205] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)具有圆形基底(13)并且具有直径d3(突起圆形基底的直径d3),突起(8)的直径d3的值介于10μm到500μm之间。

[0206] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的直径d3等于所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1(图1和2)。

[0207] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的直径d3等于所述至少一个穿孔的上部直径d1,并且等于所述至少一个穿孔(4)的下部直径d2(图1和3)。

[0208] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的直径d3大于所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1(图4、5和6)。

[0209] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的直径d3小于所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1(图7、8、9、10和11)。

[0210] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)全部或部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)。

[0211] 包括至少一个突起的3D纳米结构化多孔膜和由至少一个穿孔穿过的支撑件被定位为使得所述突起的内表面整体或部分地面对支撑件的上表面处的所述穿孔的圆形部分。

[0212] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4):

[0213] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起(图1、2、7和9);或者

[0214] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x),以小于或等于[(d1-d3)/2]的距离值彼此分开(图8和11)。

[0215] 用于表征轴(x)和(y)的术语“重合”意味着这两个轴之间的距离等于零。

[0216] 用于表征轴(x)和(y)的术语“分开”意味着这两个轴之间的距离严格大于零。

[0217] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4):

[0218] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1小于所述至少一个突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起(图6);或者

[0219] -当所述穿孔(4)的上部直径d1等于或小于所述突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)以小于d3的距离值彼此分开(图3、4和5);或者

[0220] -当所述穿孔(4)的上部直径d1大于所述突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直

于所述支撑件(1)的轴(x),以大于[(d1-d3)/2]并

[0221] 小于[(d1+d3)/2]的距离值彼此分开(图10)。

[0222] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中突起(8)具有倾斜的变形,所述倾斜变形由形成于轴(z)和轴(y)之间的角度 α 所限定:

[0223] -穿过直径d3的圆形基底(13)的中心的轴(z),该轴(z)由所述支撑件(1)的上表面(2)处的所述突起(8)和所述突起(8)的顶部界定,

[0224] -以及穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)(图12)。

[0225] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中轴(y)和轴(z)之间形成的角度 α 在0°和45°之间。

[0226] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中轴(y)和轴(z)之间形成的角度 α 在0°和60°之间。

[0227] 如果轴(y)和轴(z)之间形成的角度 α 大于45°,突起的倾斜部分地阻碍分泌物的回收。可取的角度 α 的最大理论值是90°,但是在该实施方案中,突起沿着所述3D纳米结构化多孔膜的上表面完全折叠,分泌物的回收受到阻断。

[0228] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的外表面(9)在所述外表面上支撑至少一个贴壁细胞,并且其中所述突起(8)的内表面(10)在所述内表面(10)上支撑至少一个贴壁细胞,所述至少两个细胞属于两种不同的细胞类型。

[0229] 术语“贴壁细胞”是指任何类型的细胞,其生长需要粘附到支撑件上,并且其与所述支撑件的分离需要机械或酶处理(例如,用胰蛋白酶)。

[0230] 术语“不同的细胞类型”是指不同性质或功能的细胞类型,或者来自不同的组织。

[0231] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述外表面上的所述贴壁细胞是基质细胞,所述内表面上的所述贴壁细胞是上皮细胞。

[0232] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述外表面(9)上的所述至少一种贴壁细胞是基质细胞,更具体地说是成纤维细胞,并且所述内表面(10)上的所述至少一种贴壁细胞是上皮细胞。

[0233] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述外表面上的所述贴壁细胞是上皮细胞,所述内表面上的所述贴壁细胞是基质细胞。

[0234] 上皮细胞可以是前列腺、膀胱或肾脏非致瘤商业化的细胞系,或者商业化的原代培养物。

[0235] 基质细胞可以是成纤维细胞(商业化的原代培养物或细胞系)、间充质细胞(商业培养物或细胞系)或其它基质细胞如内皮细胞。

[0236] 在所述突起的内表面和外表面上培养的两种细胞类型被称为“中性”或健康细胞,即它们不是致瘤细胞。

[0237] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的外表面(9)在汇合阶段支撑第一组贴壁细胞,并且其中所述突起(8)的内表面(10)在汇合阶段支撑第二组贴壁细胞,第一组和第二组贴壁细胞的细胞属于两种不同的细胞类型(图13)。

[0238] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起

(8)的外表面(9)支撑第一组贴壁细胞,有利地在汇合阶段,所述第一组是一组基质细胞,更具体地是成纤维细胞,并且其中所述突起(8)的内表面(10)在汇合阶段支撑第二组贴壁细胞,所述第二组是一组上皮细胞(图52)。

[0239] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的外表面(9)支撑第一组贴壁细胞,所述第一组是一组基质细胞,更具体地是成纤维细胞,并且其中所述突起(8)的内表面(10)在汇合阶段支撑第二组贴壁细胞,所述第二组是一组上皮细胞。

[0240] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中在将细胞引入这些表面之前,即在细胞培养之前,突起的外表面和内表面被细胞外基质(ECM)制剂(基质凝胶®、胶原蛋白、纤连蛋白、透明质酸)覆盖。更具体地,所述ECM制剂由基质凝胶®或基质凝胶®/胶原混合物组成。

[0241] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述3D纳米结构化多孔膜的厚度为2nm至300nm,更具体地为30nm。

[0242] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述3D纳米结构化多孔膜的厚度为2nm至300nm。

[0243] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述3D纳米结构化多孔膜具有30nm的厚度。

[0244] 突起在其圆形基底具有一个截面,该截面的表面可以根据半径计算。

[0245] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述中空圆顶形状的突起高度为1μm至600μm,更具体地为1μm至300μm,更具体地为50μm至300μm,更具体地为50μm,以及由圆顶底部界定表面积为78.5μm²至200000μm²、更具体地从2000μm²至70000μm²、甚至更具体地17500μm²、甚至更具体地7850μm²。

[0246] 术语“高度”是指突起顶部中心和直径d3的开口中心之间的距离。

[0247] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述支撑件包括至少两个相同形状和尺寸的穿孔,并且所述3D纳米结构化多孔膜包括至少两个形状和尺寸相同的突起,穿孔的数量等于突起的数量。

[0248] 当所述膜包括至少两个突起时,必须在这至少两个突起之间限定距离。

[0249] 表达式“两个相邻突起之间的距离”的定义是两个点之间的距离,这两个点分别位于由两个相邻突起的所述3D纳米结构化多孔膜的外表面相交形成的圆周上,并且在分别位于两个相邻突起的所述圆周上的点对之间的所有可能距离中形成最短距离(图32)。

[0250] 当所述膜包括至少两个突起时,这些突起必须分开适当的距离。

[0251] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中两个相邻突起之间的距离为值1,所述值1介于10μm至100μm之间。

[0252] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中两个相邻突起之间的距离为值1,所述值1介于10μm至100μm之间,更具体地介于50μm至100μm之间。

[0253] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中两个相邻突起之间的距离为值1,所述值1介于50μm至100μm之间。

[0254] 在下面的每一段中,“两个相邻突起之间的距离”可以用上面给出的定义代替。

[0255] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述支撑件包

括至少两个穿孔，并且所述纳米结构化多孔膜包括至少两个突起，例如，值 $\frac{d_1}{d_2}$ 从1变化到 $\frac{d_1}{(d_1+l)}$ ， l 是两个相邻突起之间的距离值，

[0256] 其中直径 d_1 大于或等于 $10\mu\text{m}$ ，小于或等于 $500\mu\text{m}$ ，直径 d_2 大于或等于 $10\mu\text{m}$ ，小于或等于 $500\mu\text{m}$ 。

[0257] 因此，在支撑件的下表面处的所述穿孔的下部直径 d_2 总是大于或等于在支撑件的上表面处的所述穿孔的上部直径 d_1 。

[0258] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中所述3D纳米结构化多孔膜包括1至100个突起，形成 1cm^2 的中央单元的表面。

[0259] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述3D纳米结构化多孔膜包括 1cm^2 中央单元表面的最大数量的突起，其值等于下式：

$$[0260] \frac{\pi (d_3/2)^2}{(l + d_3) - \pi (d_3/2)^2}$$

[0261] 其中 l 是两个相邻突起之间的距离，所述值 l 介于 $10\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 之间，更具体地介于 $50\mu\text{m}$ 至 $100\mu\text{m}$ 之间，

[0262] 其中 d_3 是所述突起的直径。

[0263] 3D纳米结构化多孔膜由1至150多个连续的聚电解质层组成，应当理解，这些层的连续性是应用于至少两层。

[0264] 层数使得突起的机械强度变化成为可能。事实上，层数越多，突起的机械阻力将会越大，使得它们保持突起的形状，同时在其外表面和内表面上支持细胞培养，并阻止突起两侧的流动（例如培养基）。

[0265] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中聚电解质的连续层的数量为1至150，特别是15。

[0266] 使用聚电解质构成的3D纳米结构化多孔膜提供了生物相容性和功能性的替代物，以模拟贴壁细胞附着在组织中的基底膜。

[0267] 3D纳米结构化多孔膜可以由聚电解质层组成。

[0268] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中3D纳米结构化多孔膜由选自以下的聚电解质层组成：

[0269] 聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)、聚(乙烯亚胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(丙烯酰胺-共-二烯丙基二甲基氯化铵)、二烯丙基二甲基氯化铵、聚(丙烯酰胺盐酸盐)(PAH)、聚乙醇磺酸、聚丙烯酸、聚(苯乙烯-alt-马来酸)、聚乙烯基硫酸盐、聚乙烯基磺酸、聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸-共聚丙烯腈)酸、聚(4-苯乙烯磺酸)、聚(4-苯乙烯磺酸-共马来酸)，水合4-苯乙烯磺酸钠盐。

[0270] 3D纳米结构化多孔膜可以由聚电解质的至少两个连续层组成。

[0271] 当所述膜包括至少两层时，该膜的逐层构造是必要的。

[0272] 所述至少一个突起是所述3D纳米结构化多孔膜的不可分割的部分，所述3D纳米结构化多孔膜的组成与所述至少一个突起的组成相同。

[0273] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中3D纳米结构化多孔膜由聚电解质的连续层组成，聚电解质选自：

[0274] 聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)、聚(乙烯亚胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(丙烯酰胺-共-二烯丙基二甲基氯化铵)、二烯丙基二甲基氯化铵、聚(烯丙基盐酸盐)(PAH)、聚乙醇磺酸、聚丙烯酸、聚(苯乙烯-alt-马来酸)、聚乙烯基硫酸盐、聚乙烯基磺酸、聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸-共聚丙烯腈)酸、聚(4-苯乙烯磺酸)、聚(4-苯乙烯磺酸-共马来酸)、水合4-苯乙烯磺酸钠盐。

[0275] 当所述膜包括至少两个连续层时，所述层可以对应于至少两种不同性质的聚电解质：至少一种带负电荷的聚电解质和至少一种带正电荷的聚电解质。

[0276] 在该情况下，该膜的逐层构造必须使得带正电荷的聚电解质层与带负电荷的聚电解质层交替。

[0277] 因此，由于带正电荷的聚电解质层和带负电荷的聚电解质层之间的静电相互作用，膜具有很高的内聚性。这使得获得杨氏模量约为1千帕的膜成为可能。

[0278] 必须注意，多孔膜的下层和上层可以彼此独立地由任何一种聚电解质组成。

[0279] 然而，由最后一层组成的聚电解质的电荷，并因此组成的所述膜的上表面，对膜的疏水性有影响。因此，当最后一层由带负电的聚电解质组成时，与膜的上表面带正电相比，膜的上表面具有相对亲水的性质。相反，当最后一层由带正电荷的聚电解质组成时，与膜的上表面带负电荷相比，膜的上表面具有相对疏水的性质。

[0280] 膜的上表面的粗糙度由膜的最后一层，即由所述膜的上表面组成的层组成的聚电解质携带的基团控制。例如，它是PSS层，这种聚电解质具有附着的垂直苯环和组合的硫酸盐基团，因此提供了比PAH层更粗糙的表面，PAH电解质没有附着任何苯环。

[0281] 3D纳米结构多孔膜的粗糙度约为1纳米。

[0282] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中带正电的聚电解质和带负电的聚电解质层数为从1至150，特别是15层的连续层数，所述带负电荷的聚电解质层和所述带正电的聚电解质层相互交替。

[0283] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中3D纳米结构化多孔膜由至少两种聚电解质的连续层组成，其中至少一种聚电解质带正电荷，至少一种聚电解质带负电荷，所述带正电荷的聚电解质选自聚(4-苯乙烯磺酸钠)、聚(乙烯亚胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(丙烯酰胺-共-二烯丙基二甲基氯化铵)、二烯丙基二甲基氯化铵，所述带负电的聚电解质选自聚(烯丙基盐酸盐)、聚乙醇磺酸、聚丙烯酸、聚(苯乙烯-alt-马来酸)、聚硫酸乙烯酯、聚乙烯磺酸、聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸)、聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸-共丙烯腈)、聚(4-苯乙烯磺酸)、聚(4-苯乙烯磺酸-共马来酸)、水合4-苯乙烯磺酸钠，所述带负电荷的聚电解质层和所述带正电荷的聚电解质层相互交替。

[0284] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中3D纳米结构化多孔膜由带正电荷的聚电解质和带负电荷的聚电解质的连续层组成，所述带正电荷的聚电解质是聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)，所述带负电荷的聚电解质是聚(烯丙基盐酸盐)(PAH)，所述带负电荷的聚电解质层和所述带正电荷的聚电解质相互交替。

[0285] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)和/或聚(烯丙基盐酸盐)(PAH)的连续层的数量为1至150，特别是15。

[0286] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中每个聚电解质

层的厚度为2nm至300nm,更具体地约为2nm。

[0287] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中正电荷聚电解质和带负电的聚电解质的连续层数为15,所述带负电的聚电解质层和所述带正电的聚电解质层相互交替,每层的厚度为2nm。

[0288] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所有连续的聚电解质层的厚度值由层的厚度值组成,所述厚度值小于所述突起直径d3的一半。

[0289] 根据一个具体实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中3D纳米结构化多孔膜(5)由选自以下的聚电解质的至少一层组成:聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)、聚(乙烯亚胺)、聚(二烯丙基二甲基氯化铵)、聚(丙烯酰胺-共-二烯丙基二甲基氯化铵)、二烯丙基二甲基氯化铵、聚(烯丙基胺盐酸盐)(PAH)、聚乙醇磺酸、聚丙烯酸、聚(苯乙烯-alt-马来酸)、聚硫酸乙烯酯、聚乙烯磺酸、聚(2-丙烯酰胺)聚(2-丙烯酰胺基-2-甲基-1-丙磺酸-共聚-丙烯腈)、聚(4-苯乙烯磺酸)、聚(4-苯乙烯磺酸-共聚-马来酸)、水合4-苯乙烯磺酸钠盐,

[0290] 并且其中当所述3D纳米结构化多孔膜(5)由至少两个连续层组成时,由带正电荷的聚电解质组成的层与由带负电荷的聚电解质组成的层相互交替,

[0291] 所述3D纳米结构化多孔膜(5)尤其由1至150层连续的聚电解质组成,

[0292] 更具体地,所述3D纳米结构化多孔膜(5)由15层连续的聚(4-苯乙烯磺酸钠)(PSS)和/或聚(烯丙基胺盐酸盐)(PAH)组成,相互交替。

[0293] 因此3D纳米结构化多孔膜由连续的聚电解质层组成,并且因此包括(作为可变参数):

[0294] -层数,

[0295] -每个层的厚度,

[0296] -所用聚电解质的电荷。

[0297] 通过改变层数,可以改变所述膜的粗糙度、厚度和刚度,从而改变所述突起。

[0298] 通过改变所用聚电解质的层数或电荷类型,也可以改变所述膜和所述突起的疏水性。

[0299] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述支撑件的厚度为2μm至1000μm,更具体地为20μm.

[0300] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述穿孔具有由所述不可吸收性膜界定的表面积,该表面积的值为78.5μm²至200000μm²、更具体地2000μm²至70000μm²、甚至更具体地17500μm²、甚至更具体地7850μm²。

[0301] 支撑件包括至少一个穿孔。当所述支撑件包括至少两个穿孔时,必须限定该至少两个穿孔之间的距离。

[0302] “两个相邻穿孔之间的距离”必须理解为分别位于所述相邻穿孔的每个上部圆形部分的圆周上的两个点之间的距离,并且在分别位于所述相邻穿孔的每个上部圆形部分的圆周上的点对之间的所有可能距离中形成的最短距离。

[0303] 当所述支撑件包括至少两个穿孔时,这些穿孔必须分开适当的距离。

[0304] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中两个相邻穿孔之间的所述距离为值1,所述值1为10μm至100μm,更具体地为50μm至100μm(图32)。

[0305] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述支撑

件包括 1cm^2 的中央单元表面的1至100个穿孔。

[0306] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中支撑件由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成。

[0307] SU-8树脂是酚醛环氧基负性光敏聚合树脂，其平均环氧基团官能度约为8。SU-8树脂是本领域技术人员熟知的，通常用于制备微系统。术语“负片(négatif)”是指暴露于紫外线的部分发生交联，而膜的其余部分保持可溶状态，可通过洗涤去除。

[0308] 生物打印塑料对应于本领域技术人员已知的塑料，其适用于3D打印设备并与之兼容(挤出、温度限制)。

[0309] 组织培养塑料对应于由模具盒组成的塑料，模具盒包括基础处理(通过放电或等离子放电进行处理，以形成亲水表面，即带有完全的负电荷)，并使真核贴壁细胞的附着和生长成为可能(不同于塑料培养盒，没有经过细菌学处理)。

[0310] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中支撑件由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且所述支撑件是透明的。

[0311] 下部模块

[0312] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其包含实心的下部模块(107)，包括

[0313] -下部单元(108)，其包括上表面、下表面和至少一个侧面，并且包括至少一个管状导管(14)，该管状导管包括上孔口(15)和下孔口(16)，

[0314] -基底(109)，

[0315] 所述下部单元(108)集成在所述基底(109)中，并与所述基底(109)形成整体，

[0316] 并且所述下部单元的所述上表面包括至少一个导管的所述上孔口(15)，并且所述下孔口(16)自身或通过中间装置(17)通向所述基底(109)的外部(图41和45)。

[0317] 至少一个导管的上孔口位于下部单元内，至少一个导管延伸穿过下部单元，然后穿过下部模块的基底，所述单元和所述基底形成一个单一保持件的一部分，使得至少一个导管的下孔口通向所述基底的外部。

[0318] 至少一个导管的下孔口本身通向所述基底的外部，或者通向中间装置，例如容器，该容器本身通向所述基底的外部。

[0319] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述下部模块(107)和所述中央模块(104)组装成使得所述下部单元(108)的所述上表面的所述至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述中央单元(105)的所述支撑件(1)的至少一个所述穿孔(4)上开口，并且所述至少一个导管(14)的下孔口(16)通向芯片的外部，

[0320] 所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面(3)具有彼此相同的形状和表面。

[0321] “芯片的外部”的表述必须解释为“基底的外部”，反之亦然。

[0322] 当下部模块组装到中央模块时，所述下部单元(108)的所述上表面的至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述支撑件(1)的至少一个所述穿孔(4)上开口。该至少一个导管使得能够回收至少一个突起内表面上培养的细胞的分泌物。

[0323] 该至少一个导管还可以引入培养基，并可能引入在所述突起的内表面上培养的细胞。

[0324] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述下部模块(107)和所述中央模块(104)被组装成使得所述下部单元(108)的所述上表面的所述至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述中央单元(105)的所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)上开口，所述至少一个导管(14)的下孔口(16)经由中间装置通向芯片的外部，该中间装置包括能够回收液体的容器(17)，并且能够经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片的外部，

[0325] 所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面具有彼此相同的形状和表面。

[0326] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述至少一个导管(14)的所述下孔口(16)通向装置上的芯片的外部，从而能够分析溶液中的化合物。

[0327] 该分析装置可以由本领域技术人员已知的任何分析装置组成，例如质谱仪、RMN装置、色谱装置(液相或气相)、基于免疫相互作用的装置(ELISA、免疫沉淀)、PCT或RT-PCR装置。

[0328] 事实上，细胞的分泌物既由蛋白质和肽组成，也由DNA和RNA组成。因此，选择的分析装置必须能够分析所有这些微粒。

[0329] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述至少一个导管(14)的所述下孔口(16)通向装置上的芯片外部，使得分析溶液中的化合物成为可能，其中所述装置是质谱仪。

[0330] 根据本发明的微流体芯片可以直接与集成质谱仪的芯片耦合，以便对分泌物进行实时和连续的分析。

[0331] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述下部单元(108)和所述中央单元(105)由分别位于下部模块(109)和中央模块(106)的每个基底上的连接元件(204)组装，以便以密封的方式将所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面(3)进行组装。

[0332] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4大于所述导管(14)的所述下孔口(16)的直径d5。

[0333] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4等于所述导管(14)的所述下孔口(16)的直径d5，所述至少一个导管为圆柱形。

[0334] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述至少一个导管(14)的所述上孔口(15)具有直径d4以及穿过所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)，例如直径d4大于或等于所述至少一个穿孔(4)的下部直径d2。

[0335] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述至少一个导管(14)的所述上孔口(15)通向所述支撑件(1)的一个单个穿孔(4)。

[0336] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)总体地面向所述至少一个导管(14)的所述上孔口(15)：

[0337] -当所述穿孔(4)的下部直径d2等于所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4时，穿过穿孔(4)的所述上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)和穿过所述导管

(14) 的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起(图14和15),或者

[0338] -当所述穿孔(4)的下部直径d2小于所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4时,穿过穿孔(4)的所述上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或者彼此分开的距离小于或等于 $[(d_4-d_2)/2]$ (图16、17和18)。

[0339] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)部分地面向所述至少一个导管(14)的所述上孔口(15):

[0340] -当所述穿孔(4)的下部直径d2等于所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4时,穿过穿孔(4)的所述上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t),相差一个值的距离,该值小于或等于 $[d_4/2]$ (图19、21、22、24、29和30),或

[0341] -当所述穿孔(4)的下部直径d2小于所述导管(14)的所述上孔口(15)的直径d4时,穿过穿孔(4)的所述上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t),相差一个值的距离,小于或等于 $[d_4/2]$ (图20、23、25、26、27和28)。

[0342] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述下部模块(107)包括至少两个导管(14)。

[0343] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4),并且至少两个导管(14)的至少两个下孔口(16)分别通向芯片外部的至少两个不同位置(图32)。

[0344] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4),并且至少两个导管(14)的至少两个下孔口(16)分别通向中间装置,该中间装置包括能够回收液体的容器(17),并且使得经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片外部成为可能(图31)

[0345] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及微流体细胞培养芯片,其中所述至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4),并且所述至少两个导管(14)的至少两个下孔口(16)分别通向中间装置,所述中间装置包括能够回收液体并能够经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片外部的容器(17),每个所述容器的所述出口导管彼此连接,以在相同位置通向芯片的外部(图34)。

[0346] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述至少两个导管(14)彼此连接以形成网络,使得所述至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4),并且所述至少两个导管(14)的每个下孔口(16)本身在同一位置处的通向芯片外部,或者经由中间装置通向芯片外部,所述中间装置包括能够回收液体并使得能够经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片外部(图33和35)。

[0347] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4),

[0348] 以及所述至少两个导管(14)的第一组至少两个下孔口(16)通向由容器(17)组成的第一中间装置,

[0349] 以及所述至少两个导管(14)的至少第二组至少两个下孔口(16)通向由容器(17)组成的至少一个第二中间装置，

[0350] 所述第一和至少第二容器(17)能够回收液体，并且每个容器能够在不同位置通过通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的相应出口导管(18)输送到芯片外部(图37)。

[0351] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中至少两个导管(14)的每个上孔口(15)通向穿孔(4)，并且至少两个导管(14)组的至少两个下孔口(16)通向一个相同的中间装置，该中间装置由能够回收液体的容器(17)组成，并且能够经由通向所述下部模块(107)的基底(109)外部的出口导管(18)输送到芯片外部(图36)。

[0352] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述下部模块(107)具有100μm至2cm的高度。

[0353] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中下部模块(107)的所述基底(109)具有100μm至2cm的高度。

[0354] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述下部单元(108)的高度为100μm至2cm。

[0355] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中下部模块(107)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料或SU8组成。

[0356] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中下部模块(107)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且所述下部模块(107)是透明的。

[0357] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中下部模块(109)的底部由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料或SU8组成。

[0358] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中下部模块(109)的基底由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且下部模块(109)的所述基底是透明的。

[0359] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中下部单元(108)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料或SU8组成。

[0360] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中下部单元(108)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且所述下部单元(108)是透明的。

[0361] 上部模块

[0362] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其包含上部模块(101)，该上部模块包括：

[0363] -实心表面并中空的上部单元(102)，其包括限定开放体积(腔室)(203)的实心表面，并且实心表面的边缘能够与所述中央模块(104)的所述中央单元(105)接触并限定所述开放体积的开口的表面；

[0364] -和基底(103)，

[0365] 所述上部单元(102)集成在所述基底(103)中，并与所述基底(103)形成整体。

[0366] 腔室(203)集成在上部模块(101)的基底(103)中，并且除了所述腔室(203)的开放体积的表面之外，被所述基底(103)环绕其所有表面。

[0367] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部模块(101)的所述上部单元(102)和所述中央模块(104)的所述中央单元(105)被组装成使得所述上部单元(102)的所述开口表面位于所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)上方，所述开口表面和所述上表面(6)具有彼此相同的形状和表面。

[0368] 在一个具体的实施例中，上部单元包括在外部(窗口)上的开口，在由所述腔室构成的实心表面上，使得可以插入适合于显微镜观察的透明玻璃部件，优选显微镜载玻片，以便观察3D纳米结构化多孔膜的外表面和至少一个突起的外表面上的细胞培养物。

[0369] 该开口优选地位于所述腔室的实心表面的位置，这样就可以垂直观察突起外表面上的细胞培养物。

[0370] 所述透明玻璃部分位于由所述腔室组成的实心表面的所述开口上，并保持对所述上部单元的密封，以保持上部单元和中央单元之间的封闭空间。

[0371] 优选地，使用密封粘合剂将所述透明玻璃部分保持密封到所述上部单元。

[0372] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部模块(101)的所述上部单元(102)和所述中央模块(104)的所述中央单元(105)由位于上部模块(101)和中央模块(104)的每个基底(103、106)上的连接元件(201、204)组装，以便以密封的方式组装所述上部单元(102)的开口的所述表面和所述中央单元(105)的所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)。

[0373] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述实心表面并中空的上部单元(102)其中所述实心表面包括实心矩形面和与所述实心矩形面相邻并彼此邻近的四个实心表面，这些表面之间形成腔室，所述四个实心表面的自由边缘限定所述腔室(206)开口的所述表面。

[0374] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中上部模块(101)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料或SU8组成。

[0375] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中上部模块(101)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且所述上部模块(101)是透明的。

[0376] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中上部模块(103)的基底由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料或SU8组成。

[0377] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中上部模块(103)的基底由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且上部模块(103)的所述基底是透明的。

[0378] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中上部单元(102)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料或SU8组成。

[0379] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及微流体细胞培养芯片，其中上部单元(102)由生物印刷塑料、聚碳酸酯、组织培养塑料、玻璃或SU-8树脂组成，并且所述上部单元(102)是透明的。

[0380] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部单元(102)的所述腔室(203)的开口的所述表面位于所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)上方，以形成由所述上部单元(102)的所述实心表面和3D纳米结

构化多孔膜(5)的所述上表面(6)界定的封闭空间。

[0381] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部单元(102)的所述腔室(203)的开口的所述表面位于所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)上方，并且其中所述上部单元(102)的所述至少一个实心表面具有分别通向入口/出口导管(202)的两个孔口，以形成由所述上部单元(102)的所述实心表面和所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(6)限定的封闭空间，所述封闭空间可通过所述两个孔口经由通向基底(109)外部的所述入口/出口导管(202)与所述微流体芯片的外部连通(图38和43)。

[0382] 上部单元包括分别通向入口/出口导管的两个孔。两个入口/出口导管延伸穿过上部模块的基底，所述单元和所述基底形成一个单一保持件的一部分，使得所述两个入口/出口导管通向所述上部基底的外部。

[0383] 当上部模块组装到中央模块时，腔室在3D纳米结构化多孔膜上的组装使得有可能仅通过所述两个孔经由所述入口/出口导管限定与所述微流体芯片的外部连通的封闭空间。这些导管还使得将培养基引入腔室成为可能，并可能引入在所述膜的上表面或至少一个突起的外表面上培养的细胞。

[0384] 这些入口/出口导管可以与传感器耦合，使得连续监测培养条件和参数(CO_2 、 O_2 、压力、温度、葡萄糖、pH传感器)成为可能。在替代性实施例中，这些传感器可以直接集成在腔室(203)中。

[0385] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部模块(101)的高度为50 μm 至2cm，特别是1cm。

[0386] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部模块(101)的所述基底(103)具有50 μm 至2cm的高度，特别是1cm的高度。

[0387] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述上部模块(101)的所述上部单元(102)具有50 μm 至2cm的高度，特别是1cm的高度。

[0388] 三个模块的组装

[0389] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，包括上部模块(101)、中央模块(104)和下部模块(107)，并且其中上述模块被组装以使

[0390] 所述上部模块(101)的所述上部单元(102)的开口的所述表面位于所述中央模块(104)的所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(2)上方，

[0391] 并且所述下部模块(107)的所述下部单元(108)的所述上表面的所述至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述中央单元(105)的所述支撑件(1)的至少一个所述穿孔(4)上开口，

[0392] 所述上部单元(102)的开口的所述表面和所述中央单元(105)的3D纳米结构化多孔膜(5)的所述上表面(2)具有彼此相同的形状和表面，所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面(3)具有彼此相同的形状和表面，

[0393] 以及所述上部模块(101)，所述中央模块(104)和所述下部模块(107)由位于各个基底(103、106、109)上的连接元件(201、204)组装(图42、46和47)。

[0394] 位于每个模块基底上的连接元件使得可以将模块两丙两地锁定，将上部模块与中央模块组装在一起，并将中央模块与下部模块组装在一起，或者将两个模块锁定在第三模

块上,将中央模块和下部模块组装在上部模块上。

[0395] 这些连接元件可以是阳/阴凸耳或元件,优选阳/阴元件。

[0396] 根据一个具体的实施方案,上部模块的基底包括作为阳连接元件的平台(201),并且中央模块和下部模块的基底包括作为阴连接元件的穿孔(204),其能够被锁定在上部模块的所述平台上。

[0397] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)整体地面向所述导管(14)的所述上孔口(15):

[0398] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时:

[0399] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,使得穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

[0400] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)彼此分开小于或等于 $[(d1-d3)/2]$ 的距离值。

[0401] 并且当所述支撑件(1)的所述穿孔(4)整体地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)时:

[0402] 当d4大于d2时,穿过所述突起(8)的所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起或彼此分开一段距离,该距离小于或等于 $[(d4-d3)/2]$ 。

[0403] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15):

[0404] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时:

[0405] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,使得穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

[0406] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)彼此分开小于或等于 $[(d1-d3)/2]$ 的距离值。

[0407] 并且当

[0408] -穿过所述突起(8)的所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或以小于或等于 $[(d4/2)+(4d3/10)]$ 的距离彼此分离。

[0409] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15):

[0410] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面对所述支撑件(1)的所述至少

一个穿孔(4)时：

[0411] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,使得穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

[0412] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)彼此分开一段距离,该距离小于或等于 $[(d1-d3)/2]$ 。

[0413] 并且当

[0414] -穿过所述突起(8)的所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或者彼此分开一段小于或等于 $[(d3+d1)/2]-10\mu m$ 的距离。

[0415] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔(15)：

[0416] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0417] 例如当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

[0418] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)彼此分开小于或等于 $[(d1-d3)/2]$ 的距离。

[0419] 并且当

[0420] -穿过所述突起(8)的所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或以小于或等于 $[d4/2]$ 的距离彼此分开。

[0421] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0422] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0423] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1小于所述至少一个突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起,或者以小于或等于 $[(d1/2)+(4d3/10)]$ 的距离彼此分开。

[0424] 并且当直径d2等于或大于直径d4时,穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)重合在一起,

[0425] 或者当直径d4大于直径d2时,以小于或等于 $[(d4-d1)/2]$ 的距离彼此分开。

[0426] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起

(8) 的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0427] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0428] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1小于所述至少一个突起(8)的直径d3，并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起，或者以小于或等于 $[(d_3+d_1)/2] - 10\mu\text{m}$ 的距离值彼此分离。

[0429] 并且当直径d2等于或大于直径d4时，穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)重合在一起，

[0430] 或者当直径d4大于直径d2时，以小于或等于 $[(d_4-d_1)/2]$ 的距离值彼此分离。

[0431] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0432] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0433] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1小于所述至少一个突起(8)的直径d3，并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起，或者以小于或等于 $[(d_3-d_1)/2]$ 的距离值而彼此分离，

[0434] 并且当直径d2等于或大于直径d4时，穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)重合在一起，

[0435] 或者当直径d4大于直径d2时，以小于或等于 $[(d_4-d_1)/2]$ 的距离值彼此分离。

[0436] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0437] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0438] -使得所述穿孔(4)的上部直径d1等于所述突起(8)的直径d3，并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)

[0439] 以小于 $[d_1/2]$ 的距离值彼此分离，

[0440] 并且当直径d2等于或大于直径d4时，穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)重合在一起，

[0441] 或者当直径d4大于直径d2时，以小于或等于 $[(d_4-d_1)/2]$ 的距离值彼此分离。

[0442] 根据一个具体的实施方案，本发明涉及一种微流体细胞培养芯片，其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0443] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0444] -使得所述穿孔(4)的上部直径d1大于所述突起(8)的直径d3，并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部分(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)

[0445] 以小于或等于 $[(d_1-d_3)/2]$ 的距离值彼此分离，

[0446] 并且穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)重合在一起，

[0447] 或者所述轴(x)和所述轴(y)重合在一起。

[0448] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0449] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面对所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)时：

[0450] -使得所述穿孔(4)的上部直径d1大于所述突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起,或以小于或等于 $[(d_1/2)+(4d_3/10)]$ 的距离值彼此分离。

[0451] 并且穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)彼此分开一定距离,使得直径d3的至少 $1/10$ 整体地面向直径d4。

[0452] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述导管(14)的所述上孔口(15)：

[0453] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时：

[0454] -使得所述穿孔(4)的上部直径d1大于所述突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起,或以小于或等于 $[(d_3+d_1)/2]-10\mu m$ 的距离值彼此分离。并且穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的所述轴(x)和轴(t)彼此分离一段距离,使得直径d3的至少有 $10\mu m$ 整体地面向直径d4。

[0455] 在本发明的一个实施例中,中央单元包含：

[0456] -由不可吸收性膜(1)组成的支撑件,其包括上表面(2)和下表面(3),由至少一个穿孔(4)穿过,

[0457] -3D纳米结构化多孔膜(5),包括上表面(6)和下表面(7),并且包括至少一个突起(8),所述至少一个突起包括外表面(9)和内表面(10),并且在3D纳米结构化多孔膜(5)的上表面(6)侧上形成浮雕结构,所述突起尤其是具有中空圆顶的形状,该中空圆顶形状具有圆形基底(13),

[0458] 3D纳米结构化多孔膜的所述上表面(6)被定位为固定到所述支撑件的所述下表面(2),并且所述至少一个突起(8)位于所述支撑件(1)的上表面(2)的一侧。

[0459] 因此,根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述上部模块(101)的所述上部单元(102)和所述中央模块(104)的所述中央单元(105)被组装成使得所述上部单元(102)的开口的所述表面位于由所述中央单元(105)的由不可吸收性膜(1)组成的支撑件的所述上表面(2)上方,从而:

[0460] 形成由所述上部单元(102)的所述实心表面界定的封闭空间,所述支撑件的所述上表面(2)由不可吸收性膜(1)和突起的外表面(9)组成,所述开口的所述表面和所述上表面(2)具有彼此相同的形状和表面,所述上部模块(101)的所述上部单元(102)和所述中央

模块(104)的所述中央单元(105)由位于上部模块(101)和中央模块(104)的每个基底(103、106)上的连接元件(201、204)组装,以便以密封的方式组装,所述上部单元(102)的开口的所述表面和由不可吸收膜构成的支撑件(1)的所述上表面(2)

[0461] 有利地,所述上部单元(102)的所述至少一个实心面具有分别通向入口/出口导管(202)的两个孔,使得所述封闭空间能够经由通向基底(109)外部的所述入口/出口导管(202)与所述微流体芯片的外部连通。

[0462] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地或部分地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)。

[0463] 包括至少一个突起和由至少一个穿孔穿过的支撑件的3D纳米结构化多孔膜彼此定位,使得所述突起的内表面在支撑件的上表面处整体或部分地面向所述穿孔的圆形部分。

[0464] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,其中所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面向所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4):

[0465] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

[0466] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3时,穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)以小于或等于 $[(d_1-d_3)/2]$ 的距离值彼此分离。

[0467] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种微流体细胞培养芯片,包括上部模块(101)、中央模块(104)和下部模块(107),并且其中上述模块被组装以使

[0468] 所述上部模块(101)的所述上部单元(102)的开口的所述表面位于由不可吸收性膜构成的支撑件(1)的所述上表面(2)和所述中央模块(104)的所述中央单元(105)的所述至少一个突起(8)的外表面(9)的上方,

[0469] 并且所述下部模块(107)的所述下部单元(108)的所述上表面的所述至少一个导管(14)的上孔口(15)在所述中央单元(105)的所述支撑件(1)的至少一个所述穿孔(4)上开口,

[0470] 所述上部单元(102)的开口的所述表面和所述中央单元(105)的由不可吸收性膜组成所述支撑件(1)的所述上表面(2)具有相同的形状和彼此相同的表面积,

[0471] 所述下部单元(108)的所述上表面和所述中央单元(105)的所述支撑件的所述下表面(3)具有彼此相同的形状和表面,

[0472] 以及所述上部模块(101),所述中央模块(104)和所述下部模块(107)由位于各个基底(103、106、109)上的连接元件(201、204)组装

[0473] 其中所述突起(8)的所述内表面(10)整体地面向所述导管(14)的所述上孔口(15):

[0474] 当所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面对所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)时:

[0475] -当所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于或等于所述至少一个突起(8)的直径d3时,使得穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)重合在一起;或者

[0476] -使得所述至少一个穿孔(4)的上部直径d1大于所述至少一个突起(8)的直径d3,并且穿过所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述穿孔(4)的上部(11)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(x)以小于或等于 $[(d1-d3)/2]$ 的距离值彼此分离;

[0477] 并且当所述支撑件(1)的所述穿孔(4)整体地面向所述导管(14)的所述上

[0478] 孔口(15)时:

[0479] 使得当d4大于d2时,穿过所述突起(8)的所述圆形基底(13)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(y)和穿过所述导管(14)的所述上孔口(15)的中心并垂直于所述支撑件(1)的轴(t)重合在一起,或以小于或等于 $[(d4-d3)/2]$ 的距离彼此分离。

[0480] 本发明还涉及一种制备根据本发明的微流体细胞培养芯片的方法,其中所述中央模块(104)的所述中央单元(105)的制备包括:

[0481] -通过所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)挤压可吸收性聚合物溶液(22)以在所述支撑件(1)的所述上表面(2)一侧上形成至少一个3D纳米结构(23)的步骤(图48和49),之后

[0482] -聚合所述可吸收性聚合物溶液以使所述至少一个3D纳米结构(23)刚性化的步骤,所述至少一个3D纳米结构(23)在聚合后在所述支撑件的所述上表面侧形成可吸收性聚合物模具(22),之后

[0483] -施加至少一种聚电解质的至少一个连续层覆盖所述支撑件(1)的上表面(2)和所述可吸收性聚合物模具(22)的表面,以构成3D纳米结构化多孔膜(5)的步骤(图50),通过

[0484] -溶解所述可吸收性聚合物模具以获得所述3D纳米结构化多孔膜(5)的所述下表面(7)的步骤,所述3D纳米结构化多孔膜(5)固定到所述支撑件(1)的所述上表面(2)上,并且所述至少一个突起(8)的所述内表面(10)整体地面向所述至少一个穿孔(4)定位(图51)。

[0485] 制备中央模块的第一步是通过所述支撑件的一个或多个穿孔挤出可吸收性聚合物溶液的步骤,所述支撑件由不可吸收性材料构成,即不能通过物理方法或在水溶剂中通过化学方法去除的材料。

[0486] 用于溶液的可吸收性聚合物材料最初为粘性液体形式,以使通过支撑件的穿孔挤出成为可能。

[0487] 术语“粘性”在这里用于限定在剪切应力下具有抗变形性的流体,该抗变形性至少与纯水相同,并且优选基本上大于纯水的抗变形性。换句话说,用于挤出的粘性液体流动得比纯水慢,这是由于其粘度比纯水大。用于挤出的液体的粘度特性是重要的,因为这种粘性液体与具有纯水粘度的溶液相比,可在挤出过程中更好地保持突起的形状。用于挤出的液体的优选粘度范围在1(纯水)和100Pa.s之间,优选液体的粘度在0.1Pa.s和1Pa.s之间。

[0488] 术语“挤出”在此用于定义一个步骤,其中粘性液体形式的材料在力的作用下穿过基体,以赋予所述粘性材料由所述基体预先确定的形状。在本发明的范围内,基体由包括至少一个穿孔的支撑件组成,并且所述粘性液体材料由可吸收性聚合物组成。这种粘性状态的可吸收性聚合物通过至少一个穿孔从所述支撑件的下表面挤出到所述支撑件的外表面,使得在所述支撑件的上表面侧上赋予所述可吸收性聚合物3D纳米结构形状成为可能。

[0489] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种生产微流体细胞培养芯片的方法,其中将所述可吸收性聚合物溶液(22)挤出穿过所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)的步骤使得可在所述支撑件(1)的所述上表面(2)的侧面上形成圆顶形状的3D纳米结构(23)。

[0490] 通过穿孔挤出之后,经过所述可吸收性聚合物溶液聚合而获得的3D纳米结构具有用作3D纳米结构多孔膜突起形成模具的技术效果。

[0491] 当可吸收性聚合物溶液已形成所需长度的3D纳米结构时挤出停止,所述3D纳米结构用作所需突起的模具。

[0492] 因此,可吸收性聚合物溶液在没有应力的情况下被保持聚合或凝胶化,由此通过穿孔得到固体3D纳米结构,所述固体3D纳米结构超出穿过穿孔的所述支撑件上表面的一侧。

[0493] 聚合直接在支撑件上进行,该支撑件由不可吸收性膜组成,并包括至少一个穿孔。

[0494] 聚合后,获得的3D纳米结构使得可以构成模具以获得3D纳米结构多孔膜的突起。

[0495] 然后,由支撑件的上表面和通过挤出的3D纳米结构形成的表面,并通过穿孔超过所述支撑件的上表面的侧面,被由聚电解质膜组成的多孔膜覆盖。

[0496] 聚电解质具有能够形成任何类型的材料构成的任何类型的3D结构的形状(甚至是可吸收性的)的特性,并且在移除已经用作模具的3D结构期间保持获得的3D形状。

[0497] 该聚电解质膜是多层膜,通过使用叠层技术制成。

[0498] 该技术的目的是将连续的聚电解质层吸附在由支撑件的上表面和超过所述支撑件的穿孔的3D纳米结构形成的表面上,以产生多个精细的聚电解质层。

[0499] 优选地,所使用的聚电解质是PAH和PSS。PAH和PSS溶液以1mg/1的浓度制备并含有0.5mol/1的NaCl。

[0500] 多层聚电解质膜是通过以一种聚电解质无差别地开始,并且以一种聚电解质无差别地结束来构建的,但要考虑到带相反电荷的聚电解质之间的层的交替。

[0501] 在改变聚电解质溶液时,表面用MilliQ水($18\Omega \cdot \text{cm}$)彻底冲洗。

[0502] 重复该过程,直到获得所需数量的聚电解质层。

[0503] 该方法能够得到最终的多层膜,其由覆盖在由支撑件的上表面和通过所述支撑件的穿孔伸出的3D纳米结构形成的整个表面上的连续膜构成。

[0504] 因此,这种最终的聚电解质多层膜具有在将连续的聚电解质层施加到3D纳米结构上的过程中通过模压获得的突起,所述3D纳米结构来自通过支撑件穿孔的挤出。

[0505] 一旦由支撑件的上表面和3D纳米结构形成的表面被连续聚电解质多层膜覆盖,由可吸收性聚合物材料制成的3D纳米结构形成的模具就会被溶解。

[0506] 必须注意的是,使用由不可吸收性材料(即不能通过物理方法或在水溶剂中使用化学方法去除的材料)组成的支撑件,使得保持来自该溶解步骤的所述完整支撑件成为可能。

[0507] 可吸收性聚合物材料的溶解产生连续的聚电解质多层膜,该膜牢固地组合到支撑件上,并且具有保持3D纳米结构形状的突起,在该3D纳米结构上突起被模压。因此,该连续膜由3D纳米结构化多孔膜组成。

[0508] 由附着在支撑件上的3D纳米结构化多孔膜组成的最终结构可以容易地处理,并形成所述微流体细胞培养芯片的中央模块。

[0509] 该中央模块可通过用70%的乙醇连续洗涤三次来消毒,然后用细胞培养基连续洗涤三至四次以除去任何残留的微量乙醇。

[0510] 也可通过使用环氧乙烷气体对中央模块进行消毒。

[0511] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种制备微流体细胞培养芯片的方法,其中将所述可吸收性聚合物溶液(22)经过所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)挤出的步骤,通过使用泵送系统进行。

[0512] 该可吸收性聚合物溶液的挤出是使用泵送系统完成的,该泵送系统可以手动或机械控制(通过马达控制)。

[0513] 泵送系统可由例如注射器或活塞组成,以引导所述可吸收性聚合物溶液(22)连续流通过所述至少一个穿孔(4)。

[0514] 在另一个实施方案中,所述可吸收性聚合物溶液(22)可使用两个平行的平板通过至少一个穿孔(4)挤出,这两个平板可以手动地或机械地例如使用马达朝向彼此移动。一个平板位于上部模块(204)的外表面上,另一个平板位于下部模块(101)的外表面上,因此两个平板彼此平行地定位。所述平的平行板朝向彼此移动因而使得向所述可吸收性聚合物溶液(22)施加力成为可能。在该情况下,施加到可吸收性聚合物溶液(22)的力迫使所述可吸收性聚合物溶液(22)循环通过所述至少一个穿孔(4)。

[0515] 挤出可在液体或空气中进行。

[0516] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种制备微流体细胞培养芯片的方法,其中通过所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)挤出所述可吸收性聚合物溶液(22)的步骤在液体中进行。

[0517] 在液体中挤出的情况下,液体的选择以避免导致用于形成突起的聚合物的再吸收为宜。

[0518] 在液体中挤出的3D纳米结构的情况下,当液体在支撑件的上表面上方时,会产生流体静压力,形成与三维纳米结构长度形成相反方向的力,从而不利于与3D纳米结构的长度的形成。流体静压力的大小是通过将液体密度(ρ)乘以支撑件上表面上方液体的深度(t),再乘以重力加速度(g)来计算的,即公式 $\rho t g$ 。该流体静压力的大小起到降低3D纳米结构高度的作用。例如,对于1mm深的稀释盐溶液(密度=1)(用于模仿体内细胞外流体),阻碍3D纳米结构长度上形成的流体静压大小为9.8毫帕斯卡。

[0519] 由于用作挤出用可吸收性聚合物的聚电解质溶液的杨氏模量通常约为100-400兆帕,因此挤出过程中形成的3D纳米结构的长度略有减少(例如,在最坏的情况下,对于100兆帕的杨氏模量,长度减少约为 $10^{-5}\%$)。

[0520] 在液体中挤出3D纳米结构的情况下,如果液体低于支撑件的下表面,就不存在阻碍3D纳米结构长度上的形成的流体静压力。在该情况下,突起达到与在空气中挤出的3D纳米结构相同的长度。

[0521] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种制备微流体细胞培养芯片的方法,其中通过所述支撑件(1)的至少一个穿孔(4)挤出所述可吸收性聚合物溶液(22)的步骤在空气中进行。

[0522] 在空气中挤出的3D纳米结构的情况下,不存在阻碍3D纳米结构长度上形成的压力。

[0523] 本发明还涉及用于制备根据本发明的微流体细胞培养物的替代方法,其中所述中央模块(104)的所述中央单元(105)的制备包括:

[0524] -将可吸收性聚合物溶液(22)浇注到模具(H)的上表面(209)的步骤,所述模具尤其由塑料制成,包括在所述上表面(209)的至少一个模压3D纳米结构(208)(图53和54),之后

[0525] -聚合所述可吸收性聚合物溶液(22)以使所述可吸收性聚合物溶液刚性化并形成可吸收性聚合物基体(210)的步骤,之后

[0526] -移除所述模具以形成可吸收性聚合物基体(210)的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一个3D纳米结构的至少一个(211)阴模(图55),之后

[0527] -在所述可吸收性聚合物基体(210)的下表面(212)上施加由至少一种聚电解质组成的至少一个连续层的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一种3D纳米结构的至少一个阴模(211)以构成包括至少一个突起(8)的3D纳米结构多孔膜(5)的(图56),之后

[0528] -溶解所述可吸收性聚合物基体的步骤。

[0529] 根据一个具体的实施方案,本发明还涉及一种用于制备根据本发明的微流体细胞培养芯片的替代方法,其中所述中央模块(104)的所述中央单元(105)的制备包括:

[0530] -将可吸收性聚合物溶液(22)浇注到模具(H)的上表面(209)的步骤,所述模具尤其由塑料制成,该模具包括在所述上表面(209)的至少一个模压3D纳米结构(208)(图53和54),之后

[0531] -聚合所述可吸收性聚合物溶液(22)以使所述可吸收性聚合物溶液刚性化并形成可吸收性聚合物基体(210)的步骤,之后

[0532] -移除所述模具(H)以形成可吸收性聚合物基体(210)的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211)(图55),之后

[0533] -将包含所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211)的所述可吸收性聚合物基体(210)与包含至少一个穿孔(4)的不可吸收性膜组成的支撑件(1)组装的步骤,使得所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211)与所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)对准(图57),之后

[0534] -在由所述支撑件(1)的下表面(3)和所述可吸收性聚合物基体(210)的下表面(212)形成的连续表面上,在所述支撑件(1)的穿孔(4)处施加至少一种聚电解质的至少一个连续层的步骤,所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211),以构成包含至少一个突起(8)的3D纳米结构多孔膜(5)(图58),之后

[0535] -溶解所述可吸收性聚合物基体(210)的步骤(图59)。

[0536] 本发明还涉及用于生产根据本发明的微流体细胞培养芯片的替代方法,其中包括中央单元的中央模块的生产包括:

[0537] (i)组装支撑部件(I、i)和模具(H、H1、H2、h1、h2)的步骤,所述支撑部件(I、i)由侧框架(213)、敞开的上表面(214)和实心的下表面(215)组成的支撑部件(I、i)的步骤,所述实心的下表面具有中央单元形状的切口(216),所述模具(H、H1、H2、h1、h2)具有所述支撑部件(I、i)的形状和尺寸,所述模具(H、H1、H2、h1、h2)在其上表面(209)包括至少一个模压的3D纳米结构(208),所述模具尤其由塑料制成(图60),

[0538] (ii)在所述模具(H、H1、H2、h1、h2)的所述上表面(209)倾倒可吸收性聚合物溶液

(22) 的步骤, (图61), 之后

[0539] (iii) 聚合所述可吸收性聚合物溶液(22)以使所述可吸收性聚合物溶液刚性化并形成可吸收性聚合物基体(210)的步骤, 所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一种3D纳米结构的至少一个阴模(211), 之后

[0540] (iv) 移除所述模具(H、H1、H2、h1、h2)以获得所述可吸收性聚合物基体(210)的步骤, 所述可吸收性聚合物基体包括形成在所述支撑部件(I、i)的实心的下表面(215)的所述切口(216)中的所述至少一个3D纳米结构(211)的至少一个阴模, 之后是(图62)

[0541] (v) 将所述支撑部件(I、i)与穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)组装在一起的步骤, 所述穿孔部件包括由不可吸收性膜构成的支撑件(1), 所述支撑件被集成在基底(106)中的至少一个穿孔(4)穿过(图63)

[0542] 所述穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)具有所述支撑部件(I、i)的形状和尺寸, 并且所述穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)的穿孔(4)的数量与步骤(i)中使用的所述模具(H、H1、H2、h1、h2)中模压的3D纳米结构(211)的数量相同,

[0543] 使得所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)与所述至少一个3D纳米结构的所述至少一个阴模(211)对准,

[0544] 之后

[0545] (vi) 在由所述支撑件(1)的下表面(3)和所述可吸收性聚合物基体(210)的下表面(212)组成的连续表面上, 在所述支撑件(1)的所述至少一个穿孔(4)处施加至少一种聚电解质的至少一个连续层的步骤, 所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一种3D纳米结构的至少一个阴模(211), 以构成包含至少一个突起(8)的3D纳米结构化多孔膜(5) (图64), 之后

[0546] (vii) 溶解所述可吸收性聚合物基体(210)的步骤, 所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211) (图65),

[0547] (viii) 移除支撑部件(I、i)以获得所述穿孔部件(G、G1、G2、g1、g2)的步骤, 所述穿孔部件在其下表面(3)上包括3D纳米结构化多孔膜(5), 并且在其上表面侧包括所述至少一个突起(图66)。

[0548] 如图69所示, 上述过程的步骤(i)对应的是将支撑部件I组装到模具H中, 特别是包含100个模压的3D纳米结构(208)的H1模具, 该模具以部件的平坦部分和用于对齐支撑部件I的销(217)引导, 以可重复且特定的对齐方式进行组装, 该销插入用于对齐的模具H1的对准孔(218)中。

[0549] 为了组装支撑部件I和模具H, 所述支撑部件I的实心面(215)被放置在模具H的上表面(209)上, 使得所述模具H的模压3D纳米结构(208)被放置在支撑部件I的所述实心面的切口(216)处。

[0550] 然后根据步骤(ii), 用可吸收性聚合物(22)填充由模具H与支撑部件I连接而形成的腔室。

[0551] 在可吸收性聚合物聚合之后(步骤(iii)), 在支撑部件I的实心表面(215)上的切口(216)中形成可吸收性聚合物基体(210), 该基体包括所述至少一个3D纳米结构的至少一个阴模(211)。

[0552] 然后根据步骤(iv)将模块H从支撑部件I上移除。因此, 支撑部件I的基底在切口(216)处由可吸收性聚合物基体(210)形成, 该基体包括至少一个3D纳米结构(211) μ至少一

个阴模。

[0553] 然后根据步骤(v),支撑部件I与穿孔部件G,特别是包括100个穿孔(4)的穿孔部件G1以可再现的和特定的对齐方式组装,该对齐方式由部件的平坦部分和用于对齐支撑部件I的定位销(217)引导,该定位销插入用于对齐穿孔部件G的对准孔(218)中(图70)。

[0554] 穿孔部件G由包括至少一个穿孔(4)的支撑件(1)组成,所述支撑件(1)插入基底(106)中。

[0555] 穿孔部件(G1、G2、g1、g2)的选择取决于步骤(i)中模具(H1、H2、h1、h2)的选择,模具(H1、H2、h1、h2)的3D纳米结构的形状和数量必须与穿孔部件(G1、G2、g1、g2)的形状和数量相同(图67、68、72、73)。

[0556] 穿孔部件G的支撑件(1)的上表面(2)定位为与所述可吸收性聚合物基体(210)的下表面(212)接触。

[0557] 因此穿孔部件G的穿孔(4)使用用于对准支撑件I的定位销(217)与所述基体(210)的3D纳米结构(211)的阴模对准,该定位销在用于对准穿孔部件G的对准孔(218)中触发。

[0558] 然后组装好的部件I和G1如图70-E所示翻转,以使部件G1位于支撑部件I上方。

[0559] 部件G1的穿孔壁使得形成腔室成为可能,从而通过在由所述支撑件(1)的下表面(3)和所述可吸收性聚合物基体(210)的下表面(212)形成的连续表面上,在所述支撑件(1)的穿孔(4)处施加根据步骤(vi)的至少一种聚电解质的至少一个连续层,以促进突起(8)的形成,所述可吸收性聚合物基体包括所述至少一种3D纳米结构的至少一个阴模(211)。

[0560] 一旦形成至少一个突起(8),根据步骤(vii)将形成阴模(211)的所述基体(210)的可吸收性聚合物溶解。

[0561] 因此,将支撑部件I从穿孔部件G1移除。

[0562] 因此,穿孔部件G1在支撑件(1)的下表面(3)侧包括3D纳米结构化多孔膜(5),并且在支撑件(1)的上表面(2)侧包括穿孔部件G1的支撑件的所述至少一个穿孔的延伸部分中的所述至少一个突起(图66)。

[0563] 在该实施例中,3D纳米结构化多孔膜(5)的上表面(6)与由不可吸收性膜组成的支撑件(1)的下表面(5)固定(接触)。

[0564] 如此获得的穿孔部件G1包括具有穿孔(4)的支撑件(1)和包括突起(8)的3D纳米结构化多孔膜(5),其由微流体芯片的中央模块组成,并用于培养所述至少一个突起的每一侧的细胞。

[0565] 圆形部件I、H和G的示例

[0566] 根据一个具体的实施方案,所述支撑部件(I)、所述模具(H1,H2)和所述穿孔部件(G1,G2)是圆形的,使其得特别适合直径为35mm的细胞培养箱。

[0567] 图67给出了该方法的具体实施例,其中所述模具(H1)和所述穿孔部件(G1)分别包括100个模压3D纳米结构和100个穿孔。

[0568] 该方法使得获得具有100个突起的中央单元成为可能。

[0569] 图68给出了该方法的具体实施例,其中所述模具(H2)和所述穿孔部件(G2)分别包括9个模压的3D纳米结构和9个穿孔。

[0570] 这样的方法使得获得具有9个突起的中央单元成为可能。

[0571] 不对这些实施例的穿孔和模压3D纳米结构的数量做限制。

[0572] 模具和穿孔部件的选择取决于中央单元的3D纳米结构化多孔膜所需的突起数量。

[0573] 如图71所示,在该具体实施方案中,由穿孔部件G和通过上述方法获得的突起组成的中央模块可通过部件F放置在细胞培养室上,例如包含培养基的直径为35mm的细胞培养箱。

[0574] 根据本发明的一个实施方案,通过上述方法获得的中央模块被放置在例如本发明所述的下部模块上,该下部模块包括至少一个导管以收集来自至少一个突起的分泌物。

[0575] 下部模块具有与所述中央模块相同的形状和尺寸。

[0576] 下部模块以可再现的和特定的对准方式组装到中央模块,该对准由部件的平坦部分和用于对准下部模块的插入用于对准中央模块的孔中的销引导。

[0577] 下部模块包括多个导管(与穿孔的数量相同,并因此与中心模块的突起的数量相同),使得所述中心模块与所述下部模块的组装使得导管与穿孔对齐,从而与突起对齐,以通过微流体系统从细胞收集分泌物。

[0578] 在根据本发明另一个具体的实施方案中,下部模块由部件F代替。该部件F用作中央模块在培养箱上的支撑件,如图67、68和71所示,包括方形开口,该开口使得培养基的循环能够给所述至少一个突起的内表面上的生长细胞提供营养。

[0579] 正方形部件I、H和G的示例

[0580] 根据一个具体的实施方案,所述支撑部件(i)、所述模具(h1,h2)和所述穿孔部件(g1,g2)是正方形。

[0581] 图72示出了该方法的具体实施例,其中所述模具(h1)和所述穿孔部件(g1)分别包括100个模压的3D纳米结构和100个穿孔。

[0582] 该方法使得获得具有100个突起的中央单元成为可能。

[0583] 图73给出了该方法的具体实施例,其中所述模具(h2)和所述穿孔部件(g2)分别包括9个模压的3D纳米结构和9个穿孔。

[0584] 该方法使得获得具有9个突起的中央单元成为可能。

[0585] 这些实施例的穿孔和模压3D纳米结构的数量的并不特别限制。

[0586] 模具和穿孔部件的选择取决于中央单元的3D纳米结构化多孔膜所需的突起数量。

[0587] 可吸收性聚合物溶液优选由壳聚糖、琼脂糖或藻酸盐制成。

[0588] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种生产微流体细胞培养芯片的方法,其中所述可吸收性聚合物溶液(22)是壳聚糖。

[0589] 当使用壳聚糖时,可吸收性模具可通过将2%的壳聚糖溶解在2%的乙酸中一晚,然后用含乙醇的1.5%壳聚糖稀释来制备。然后将壳聚糖溶液在5M浓度下按1:1混合的NaOH:乙醇热浴中聚合。

[0590] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种生产微流体细胞培养芯片的方法,其中聚合所述可吸收性聚合物溶液(22)的步骤是通过与2%乙酸溶液孵育来进行的,所述可吸收性聚合物溶液(22)是壳聚糖。

[0591] 当壳聚糖用作可吸收性聚合物材料时,根据本领域技术人员熟知的方案,通过用2%乙酸溶液孵育过夜完成溶解。

[0592] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及生产微流体细胞培养芯片的方法,其中所述可吸收性聚合物溶液(22)是琼脂糖。

[0593] 当使用琼脂糖时,可吸收性模具可通过加热并通过将40 μ g/mL琼脂糖溶解在PBS(磷酸盐缓冲盐水)中来制备。琼脂糖通过将所得溶液置于低于其凝胶点的温度下聚合。

[0594] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种生产微流体细胞培养芯片的方法,其中聚合所述可吸收性聚合物溶液(22)的步骤通过在高于琼脂糖凝胶化温度的温度下孵育来进行,所述可吸收性聚合物溶液(22)是琼脂糖。

[0595] 当琼脂糖用作可吸收性聚合材料时,溶解通过从环境温度缓慢加热到70℃,持续120分钟,然后使琼脂糖的温度在一夜间恢复到环境温度来完成。

[0596] 该加热可在水浴中进行。重要的是,为减少热对流使温度缓慢升高,热对流可能会损坏3D纳米结构多孔膜。

[0597] 本领域技术人员熟知的这种加热方案的变体包括在水浴的水中添加DMSO以改变琼脂糖的凝胶特性。

[0598] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种生产微流体细胞培养芯片的方法,其中所述可吸收性聚合物溶液(22)是藻酸盐。

[0599] 根据一个具体的实施方案,本发明涉及一种生产微流体细胞培养芯片的方法,其中聚合所述可吸收性聚合物溶液的步骤通过与不添加Ca²⁺和Ca²⁺离子组合剂的溶液孵育过夜来进行,所述可吸收性聚合物溶液(22)是藻酸盐,Ca²⁺和Ca²⁺离子组合剂的溶液如EDTA或EGTA。

[0600] 作为可变参数,聚电解质多层膜包括:

[0601] -层数,

[0602] -每个层的厚度,

[0603] -所用聚电解质的电荷。

[0604] 通过改变层数,可以改变最终多层膜的粗糙度、厚度和刚度。

[0605] 优选地,该膜由15层2nm厚的聚电解质组成。

[0606] 通过改变所用聚电解质的层数或电荷类型,最终多层膜的疏水性也可被改变。

[0607] 由于使用用于挤出的泵送系统,3D纳米结构的挤出可能受到以下缺陷的影响:

[0608] -平移缺陷,当相对于与支撑件的穿孔直接对准预留的位置平移时,存在突起的平移时,

[0609] -挤出缺陷,当突起的形状存在缺陷时,例如基底增厚或本领域技术人员已知的其它缺陷。

[0610] 由此,从存在平移缺陷或挤压缺陷的三维纳米结构形成的突起可以继续在设备中发挥其最初设计的技术功能,但是,由于这样形成的突起具有不太理想的形状,因此其在装置中的性能也不太理想。然而,该设备仍可继续发挥其可提供的功能,但性能会有所降低。

[0611] 突起可有多种变化,例如:

[0612] -相对于通过开口中心并垂直于支撑件的轴(y)倾斜,

[0613] -其高度发生变化,

[0614] -由于支撑件上3D纳米结构化多孔膜的平移,相对于穿孔发生平移。

[0615] 这些变化的产生是制备中央模块的方法造成的,特别是聚合物溶液通过所述载体的穿孔的挤出阶段。

[0616] 装置中突起的使用过程中,也会直接驱动产生某些变化。

[0617] I- 使用芯片用于共培养的示例

[0618] 1. 维持前列腺上皮细胞和基质细胞的细胞系培养的条件

[0619] 用于所有实验的培养基是角质细胞无血清培养基 (KSFM) (Life Technologies, Carlsbad, CA, Ref. 17005-075), 补充有5ng/mL表皮生长因子(EGF) 和50g/mL牛垂体提取物。

[0620] 在37°C和5%CO₂气氛中, 前列腺上皮细胞和基质细胞的细胞系保持在培养基中培养。

[0621] 在新鲜培养基中上皮细胞每三天进行一次的传代培养, 基质细胞每两天进行一次。为此, 用购自Dulbecco (D-PBS) 的不含钙和镁的磷酸盐缓冲盐水溶液 (Life Technologies, Ref. 14190) 洗涤细胞, 然后以0.25mg/mL的胰蛋白酶-EDTA在37°C下孵育约7分钟 (Lonza, basel, CH, Ref. CC-5012)。

[0622] 对于所有实验, 每天用新鲜培养基补充细胞的培养基。

[0623] 2. 在引入中央单元之前准备细胞

[0624] 细胞的化学分离是通过在37°C下, 在没有钙和镁的PBS培养基中, 用1mL的0.25mg/mL胰蛋白酶-EDTA (Life Technologies, Ref. 25300-054) 孵育5分钟来完成的。

[0625] 独立地, 本发明的微流体芯片是通过使70%乙醇(体积分数)溶液在导管中循环来消毒的, 然后通过温度为35°C至45°C的电炉干燥所有微流体系统至少30分钟, 然后通过将其暴露于紫外线辐射和臭氧中40分钟来消毒。

[0626] 3. 制备中央单元的3D纳米结构多孔膜

[0627] 3D纳米结构化多孔膜由带正电荷的聚电解质层和带负电荷的聚电解质层的连续聚电解质层交替组成。根据生产方法, 这种膜由突起组成。

[0628] 由聚电解质多孔膜组成的突起的外表面和内表面被由Matrigel®和/或胶原、纤连蛋白或透明质酸组成的细胞外基体(ECM)制剂覆盖。

[0629] 这里使用的Matrigel®是康宁(Corning)®公司生产的商业产品。

[0630] 这是一种重构的基膜制剂, 从Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) 小鼠肉瘤中提取, 这是一种富含细胞外基体蛋白的肿瘤。一旦分离, 这种材料由大约60%的层粘连蛋白、30%的IV型胶原蛋白和8%的巢蛋白组成。巢蛋白是一种桥连分子, 它与层粘连蛋白和IV型胶原相互作用, 并有助于细胞外基体中这些分子的结构组织。

[0631] 购于康宁公司的Matrigel®还含有硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (Perlecan)、转化生长因子β (TGF-β)、表皮生长因子、胰岛素型生长因子、成纤维细胞生长因子、纤溶酶原组织激活剂和EHS肿瘤中天然存在的其它生长因子。它还含有来自肿瘤细胞的残留基体金属蛋白酶。

[0632] Matrigel®本身可以以6mg/mL的浓度, 或者以0.75mg/mL至2.5mg/mL浓度与I型胶原蛋白的混合物的形式, 用于使多孔膜功能化。

[0633] 4. 中央单元中引入两种类型细胞和细胞共培养

[0634] 4.1 上皮细胞的引入

[0635] 最初, 引入上皮细胞以形成细胞连接层, 即汇合阶段的细胞培养物。

[0636] 根据一个具体的实施方案, 上皮细胞被引入中央单元的突起的内表面。

[0637] 获得细胞的粘附需要3小时, 形成连接细胞的层需要24小时, 即在细胞汇合阶段。

这些粘附和增殖细胞分泌它们自己的细胞外基质,从而建立起起屏障作用的基底层。

[0638] 因此,中央单元突起的内表面被致密的单层上皮细胞覆盖,该上皮细胞被用作对从患者尿液中分离的人类细胞生长和分化的生理支持。

[0639] 根据如下三种方法,可在突起的内表面上引入细胞:

[0640] • 翻转中央模块,以便使穿孔的下部朝向顶部,并手动吸移细胞悬浮液。

[0641] • 翻转中央模块,以便使穿孔的下部朝向顶部,并使用机器人来处理流体以引入细胞悬浮液。

[0642] • 组装上部模块、中央模块和下部模块,并使用下部单元的微流体导管在突起的内表面侧填充中央单元。在这三个模块的预组装的情况下,细胞因此通过下部模块的导管引入。这种在三个模块预组装之后引入细胞的方法比其它两种方法更好,因为它防止了任何细菌的污染,因为之前消毒的系统是保持关闭的。

[0643] 根据一个具体的实施方案,上皮细胞以 3.10^6 个细胞/mL的浓度引入中央单元,或者直接通过带有注射器的穿孔(第一和第二种方法),或者通过使用流体系统的下部单元的导管(第三种方法),该流体系统是自动化的,并由压力和流量(Fluigent)或注射泵控制。

[0644] 优选使用具有可调流量的注射泵,以便使细胞平滑地、受控地导入。

[0645] 通过使用压力泵(Fluigent,法国)输送稳定和连续的流量。包含培养基的加压容器在腔室内保持受控的温度和CO₂水平。流量被调节到大约5-10mL/小时(10毫巴),并且随着时间的推移观察到细胞的粘附和增殖。所有样品都保存在培养箱中,在37°C和5%CO₂下加湿。

[0646] 在一个具体的实施例中,中央单元包括高度为350μm的突起,圆形基底直径为150μm。因此,突起内表面的面积为 $329700\mu\text{m}^2$,在汇合阶段(连接细胞层),大约有50个上皮细胞计数,即大约每 $66\mu\text{m}^2$ 有一个细胞。

[0647] 4.2在突起的外表面引入细胞

[0648] 其次,一旦在突起的内表面上形成连接(或汇合)上皮细胞层,基质细胞即被分配在突起的外表面和内表面的多孔膜上。

[0649] 可以根据两种方法在突起的内表面上引入细胞:

[0650] • 翻转中央模块,以便使突起的顶部朝向顶部,并手动吸移细胞悬浮液。

[0651] • 组装上部模块、中央模块和下部模块,并使用下部单元的微流体导管将中央单元填充到突起的内表面侧。在这三个模块的预组装的情况下,细胞因此通过上部单元的入口/出口导管引入。这种在三个模块预组装后引入细胞的方法优于其它方法,因为它防止了任何细菌污染,因为之前消毒的系统是保持关闭的。

[0652] 根据一个具体的实施方案,基质细胞直接使用注射器(第一种方法),或通过使用流体系统的上部模块的导管(第二种方法)经由上部模块的入口/出口导管以 3.10^6 细胞/mL的浓度引入中央单元,该流体系统是自动化的,并由压力和流量(Fluigent)或注射泵控制。

[0653] 基质细胞粘附非常快(不到一小时)。

[0654] 在本实施例中,没有必要使基质细胞形成汇合(或连接)细胞层,其在外表面上的简单粘附就足够了。

[0655] 通常,上皮细胞和基质细胞的比例是1:2。

[0656] 因此,根据一个具体的实施方案,对于 0.7cm^2 表面上的共培养,用稀释至6mg/mL的

90 μ l基体凝胶®溶液将突起外表面和内表面的多孔膜功能化,然后接种,最终获得7000个上皮细胞/cm²和14000个基质细胞(成纤维细胞)/cm²。

[0657] 通过上部模块的入口/出口导管和下部模块的导管引入以供应细胞培养物的培养基,在突起的两侧是相同的,并且由KSF培养基组成,补充有5ng/mL表皮生长因子(EGF)和50g/mL牛垂体提取物。

[0658] 4.3上皮细胞和基质细胞的示例

[0659] 这些上皮细胞可以是非致瘤商业化的细胞系(前列腺或膀胱或肾)或商业化的原代培养物。

[0660] 这些基质细胞可以是:

[0661] -成纤维细胞(商业化的原代培养物或细胞系),

[0662] -或间充质细胞(商业培养物或细胞系),

[0663] -或其它基质细胞(内皮细胞等)。

[0664] 用于形成这些细胞单层的两种细胞类型被称为“中性”或“健康的”,它们不是致瘤的,仅起基底层的作用。在汇合阶段,这些“中性”细胞在突起的内表面和外表面形成高度连续的细胞层,形成紧密的密封,这可通过免疫荧光和成像来表征(见E-钙粘蛋白的第五部分标记)。

[0665] 4.4突起内表面和外表面上培养物的可交换性

[0666] 根据一个具体的实施方案,上皮细胞被引入突起的内表面,基质细胞被引入突起的外表面。

[0667] 然而,共同培养可以以可互换的方式建立,即基质细胞也可被引入突起的内表面,上皮细胞可以被引入突起的外表面。在这两种情况下,位于两种细胞类型之间的聚电解质层可以利用其带正电荷和带负电荷的聚电解质网构成多孔屏障。

[0668] 5.中央单元中细胞的可视化(突起上共培养概念验证)

[0669] 为了验证在中央单元突起上共培养的方法,进行了免疫标记。

[0670] 这种免疫标记是在死亡细胞上进行的(由PFA附着),这种可视化的唯一目的是控制共培养物正确就位,以及正确引入细胞的方法。

[0671] 细胞通过免疫标记在中央模块中显现出来。

[0672] •毒伞素用于识别皮质肌动蛋白丝,其跟随质膜的边缘并因此提供了界定细胞及其膜范围的方法。

[0673] •E-钙粘蛋白用于检测细胞-细胞连接。

[0674] 免疫染色是通过在环境温度下用注射泵通过导管引入E-钙粘蛋白来进行的。

[0675] 在上皮细胞的汇合层形成后,在其引入后约24小时,上皮细胞与4%全氟烷氧基(PFA)(体积分数)的含10%蔗糖的细胞骨架缓冲液(溶液A)溶液中附着20分钟。

[0676] 然后用溶液A洗涤细胞,并用加入0.1%Triton TX-100的溶液A渗透3分钟。用TBS溶液洗涤10分钟,然后用PBS溶液第二次洗涤30分钟。PFA的自发荧光被TBS溶液中含有的NH₄Cl灭活。用含有10%山羊血清和3%BSA的PBS溶液孵育,阻断非特异性位点。然后将细胞与初级抗体一起孵育1小时。所用的主要抗体是抗E-钙粘蛋白抗体(Abcam,Ref.ab1416),该抗体在含有0.1%Tween-20和1%BSA的PBS溶液中稀释至1/50。然后用PBS溶液洗涤培养物30分钟,然后用与细胞色素Cy3(Jackson,Ref.115-162-062)偶联的次级抗小鼠抗体孵育,

用毒伞素FITC(Sigma,Ref.P5282)稀释至1/1000,之后在含有0.1%的Tween-20和1%BSA的PBS溶液中稀释至1:1000,持续20分钟。

[0677] • 用PBS溶液洗涤30分钟后,用Hoechst着色剂(Life Technologies,Ref.H-1399)对细胞核进行反染色,稀释至1:7000,持续5分钟。

[0678] 然后将细胞洗涤10分钟,手动引入Dako荧光培养基。

[0679] • 粘附点已通过使用Vinculine标记检测到。为了用Vinculine进行反标记,用TritonX-100将细胞预渗透40秒,并用含4%PFA(体积分数)的PBS溶液附着20分钟,然后用PBS溶液洗涤一次。

[0680] 为了避免任何非特异性抗体吸附,将细胞与0.1%BSA和10%山羊血清溶液孵育1小时。

[0681] 然后将细胞与针对Vinculine的初级抗体一起孵育1小时(Sigma,Ref.V9131),在PBS溶液中用0.05%Tween20和5%山羊血清稀释至1:700,然后用PBS溶液连续洗涤4次45分钟。

[0682] 然后用抗小鼠抗体孵育细胞,该抗小鼠抗体与细胞色素Cy5耦合,在PBS溶液中用0.05%的Tween20和5%山羊血清(Jackson)稀释至1/500。

[0683] 然后用PBS溶液洗涤中央模块4次,持续15分钟。如上所述,细胞核和肌动蛋白被染色。

[0684] 通过荧光显微镜观察共培养物,或者可通过其它显微镜方法观察共培养物,例如相差显微镜、无透镜成像、共聚焦显微镜、光薄片显微镜。

[0685] 这些图像是在细胞培养过程中拍摄的。

[0686] 为了提供设备整个宽度的视图,使用无透镜传感器记录细胞图像。还进行了扫描电镜分析。

[0687] 在一个特定的实施方案中,包含细胞共培养物的中央模块的荧光图像是使用Zeiss Axio Imager Z1显微镜获得的,该显微镜具有20倍的透镜,该透镜配备有用于采集z-堆叠场深度的适当的Apostom模块,在z轴上每隔3mm拍摄一次直径为150mm的管。这些图像是用安装在显微镜上的AxioCam MRm数码相机记录的。

[0688] 6. 实时可视化中央单元中的细胞

[0689] 中央单元中的细胞培养物可通过相位收缩显微镜观察来实时监控,因为组成模块的材料是透明的,这使得可以观察到未标记的活的细胞。

[0690] II-使用芯片进行诊断的示例

[0691] 1. 引入来自患者的细胞

[0692] 根据一个具体的实施方案,将上皮细胞引入突起的内表面,将基质细胞引入突起的外表面。

[0693] 一旦在每个面上获得单层细胞,即在24小时后,这样提供有细胞的微流体芯片可以用于诊断患者。

[0694] 为此,从至少50mL,特别是50mL至100mL的患者尿样中分离细胞。分离是通过低速离心特别是800g尿液样品,持续5分钟,使得尿液样品中包含的细胞可能沉淀。该离心步骤是本领域技术人员公知的。

[0695] 沉淀细胞的下部然后悬浮在培养基中,细胞悬浮液直接引入根据本发明的微流体

芯片中,这意味着细胞在引入芯片之前不需要任何预培养。

[0696] 从尿样中获得的细胞浓度是几百个细胞到几千个细胞,或者相差几百个细胞到几千个细胞。

[0697] 患者的分离的尿细胞可以被引入支持上皮细胞培养的突起面一侧,或者被引入支持基质细胞培养的突起面一侧。换句话说,这些培养物可在突起的两侧互换,患者尿液的分离细胞可以被引入突起的内表面和外表面。

[0698] 根据一个具体的实施方案,患者尿液的分离细胞被引入支持上皮细胞培养的突起面一侧。因此,当单层上皮细胞形成在突起的内表面侧时,它们通过下部单元的导管引入,即当单层上皮细胞形成在突起的外表面侧时,它们通过上部模块的入口/出口导管引入。

[0699] 从患者尿液中分离的细胞是脱落尿上皮(或尿上皮)细胞,包括所有膀胱、前列腺和肾上皮细胞。

[0700] 在特定实施例中,突起的内表面被预先培养的上皮细胞形成的层覆盖,突起的外表面被预先形成的成纤维细胞(基质细胞)覆盖,分离的细胞通过下部模块的导管分配。

[0701] 这些分离的细胞被插入该层,由突起内表面侧的健康上皮细胞预先形成,并由一层健康成纤维细胞支撑。

[0702] 2. 来自患者的细胞增殖的观察

[0703] 因此,监测分离细胞的增殖,以便观察装置中分离细胞的增殖进展,并检查这种增殖是否导致替换健康的基底细胞并影响组织的整体分泌概况。

[0704] 3. 分泌物回收

[0705] 在引入从患者尿液中分离的细胞后,通过在突起的外表面或内表面上加入0.1ng/ml的DHT(二氢睾酮)刺激患者的上皮细胞。DHT对细胞的刺激持续24-48小时。

[0706] 由突起的外表面和内表面组成的膜是多孔的,这种刺激可在突起的任一侧上均等地产生。

[0707] 上皮细胞也可通过加入米博莱酮(非代谢激素)来刺激。

[0708] 因此,上皮细胞的刺激是在两种细胞类型组合在突起的任一侧之后,并且在其生长之后直到汇合阶段。

[0709] 当患者的分离细胞连接并插入该层时,分泌物可以被回收,该层由突起内表面侧的健康上皮细胞预先形成,并且由突起外表面侧的健康成纤维细胞层支撑。患者分离细胞的连接持续约3小时,其整合持续约6小时。

[0710] 足够量的分泌物逐渐积累。

[0711] 在至少12小时后,将分泌物进行最终回收,以分析分泌物。

[0712] 更具体地说,分泌物在用DHT刺激24-48小时后回收。

[0713] 然后通过装置对它们进行分析,使得分析溶液中的化合物成为可能。根据一个具体的实施方案,通过质谱分析分泌物。

[0714] 分泌物可通过组合在所述芯片中的传感器进行逐一分析。

[0715] 必须注意的是,当分泌物被回收或者当分泌物被传感器连续逐一分析时,构成所述芯片的不同模块不受影响。

[0716] 通过免疫学方法寻找特定标记物也可在回收的分泌物中进行。

[0717] 例如,可以检测PSA(前列腺特异性抗原),其为前列腺癌的参考生物标志物。

[0718] 对于高度为350μm的突起和直径为150μm的圆形基底,24小时后回收的分泌物体积约为2nL。

[0719] PSA的检测和量化是通过ELISA测试完成的。

[0720] 为此,在几个突起内收集大约50μL的培养基,然后沉积在96孔板中,在37℃下放置45分钟。必须用蒸馏水连续洗涤五次,以除去不附着于抗PSA初级抗体的蛋白质。

[0721] 然后,在每个孔中加入100μL与HRP(辣根过氧化物酶)偶联的游离抗PSA二级抗体,之后放于37℃的ELISA平板孵育45分钟。最后,加入100μL底物(TMB),引起底物酶的显色反应。

[0722] 在37℃下15分钟后,通过加入100μL硫酸停止反应,并使用ELISA平板读取器在450nm处检测吸光度。

[0723] III-使用芯片筛选微粒的示例

[0724] 在一个具体的实施方案中,根据本发明的微流体细胞培养芯片用于筛选微粒。

[0725] IV-使用芯片确定患者泌尿系统癌症治疗效果的实施例

[0726] 在一个具体实施方案中,根据本发明的微流体细胞培养芯片用于确定患有泌尿癌症的患者中泌尿癌症的治疗效果。

[0727] 在该实施例中,在治疗患者之前和之后,和/或在治疗期间,对插入突起的上皮细胞培养物中的患者尿液分离细胞的分泌部进行分析。

[0728] 将治疗前获得的分泌液与治疗后获得的分泌液和/或治疗期间获得的分泌液进行比较,可以确定治疗对患者患有泌尿系统癌症的影响。

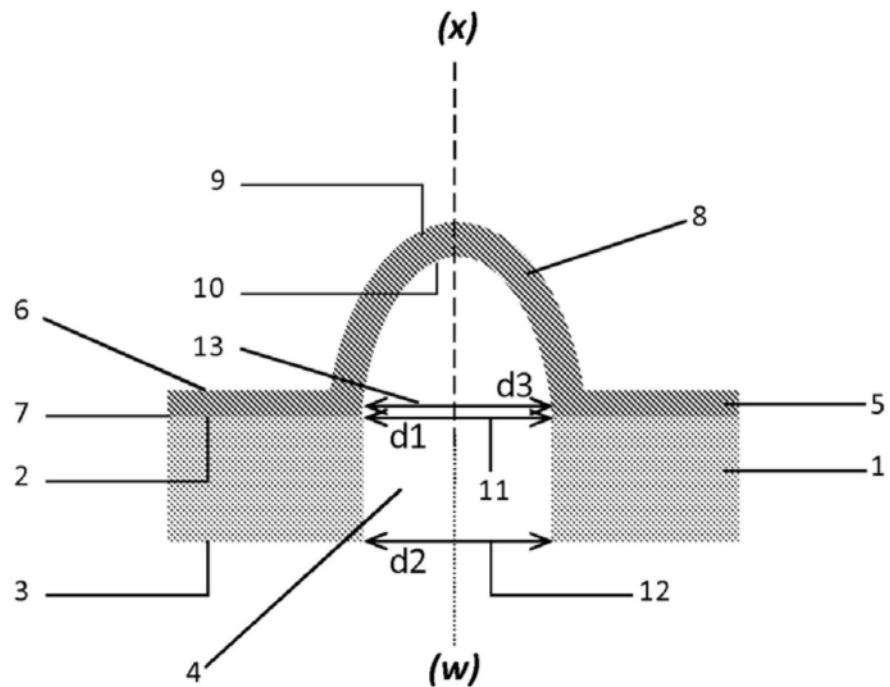


图1

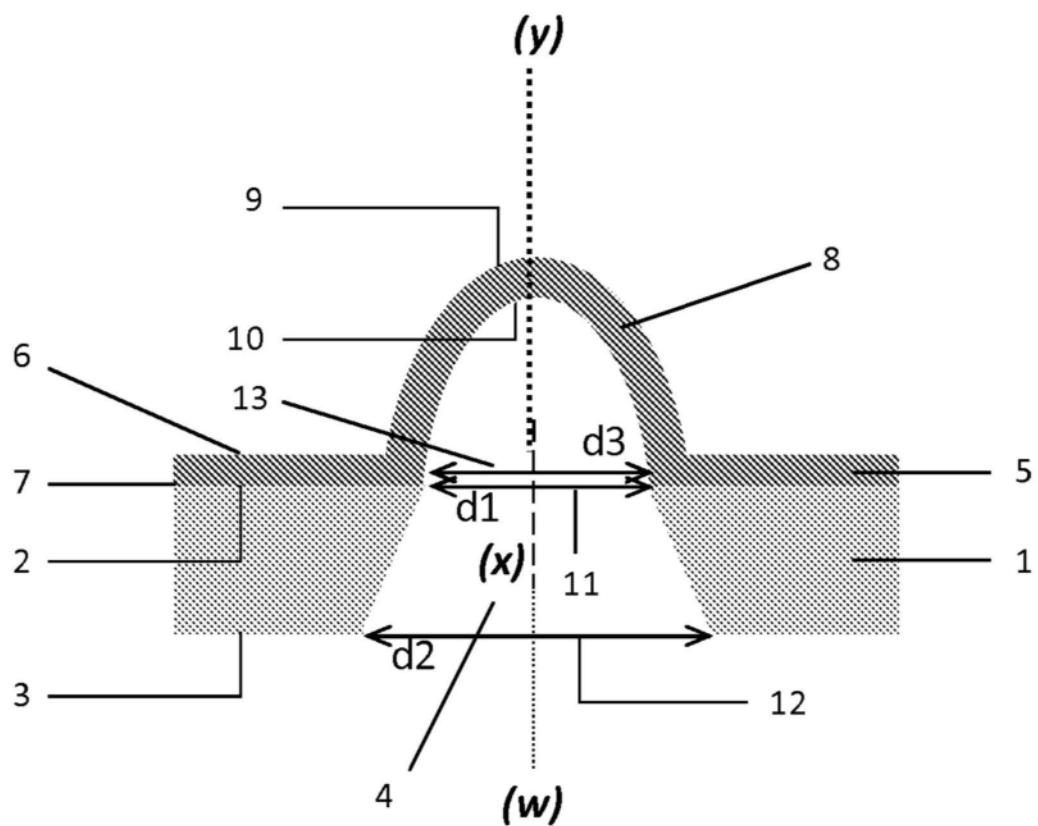


图2

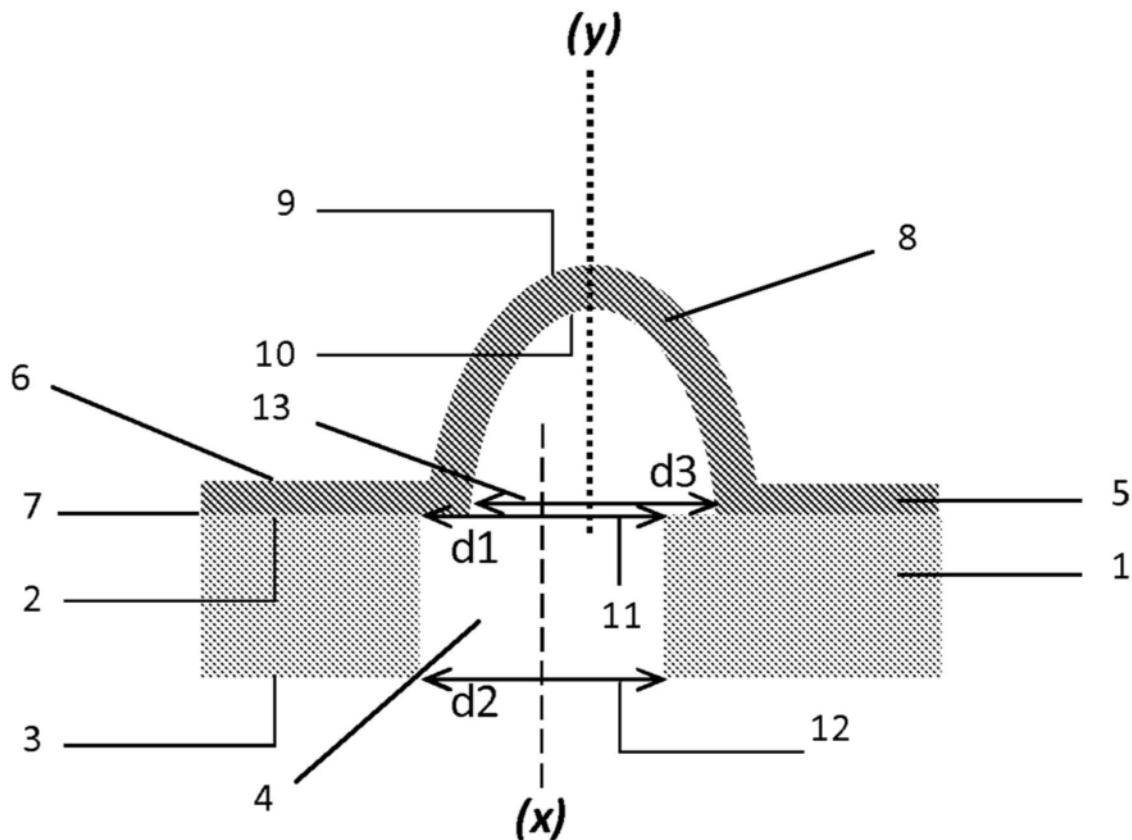


图3

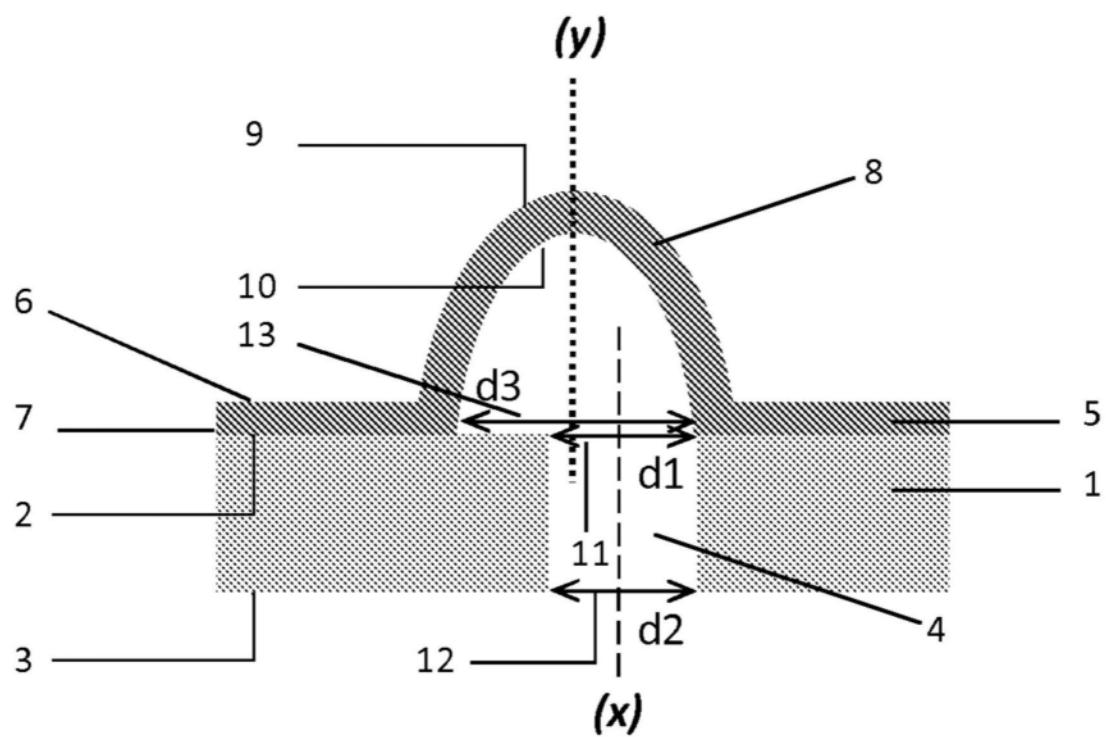


图4

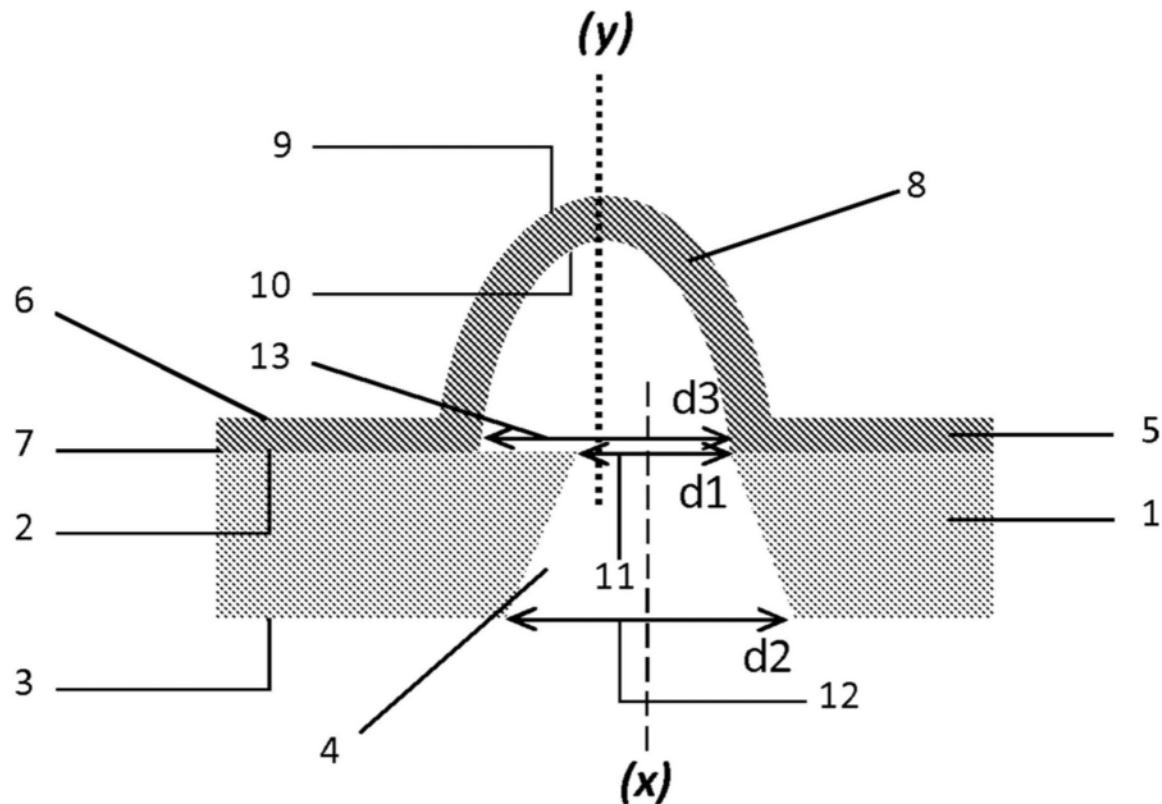


图5

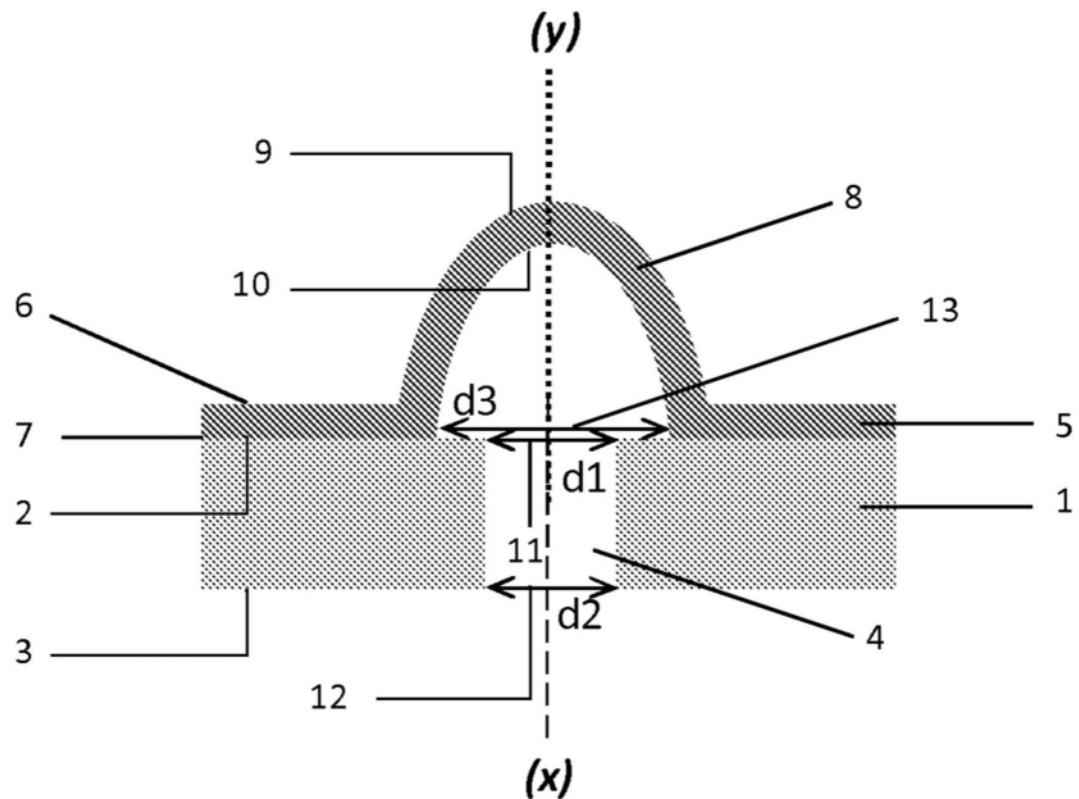


图6

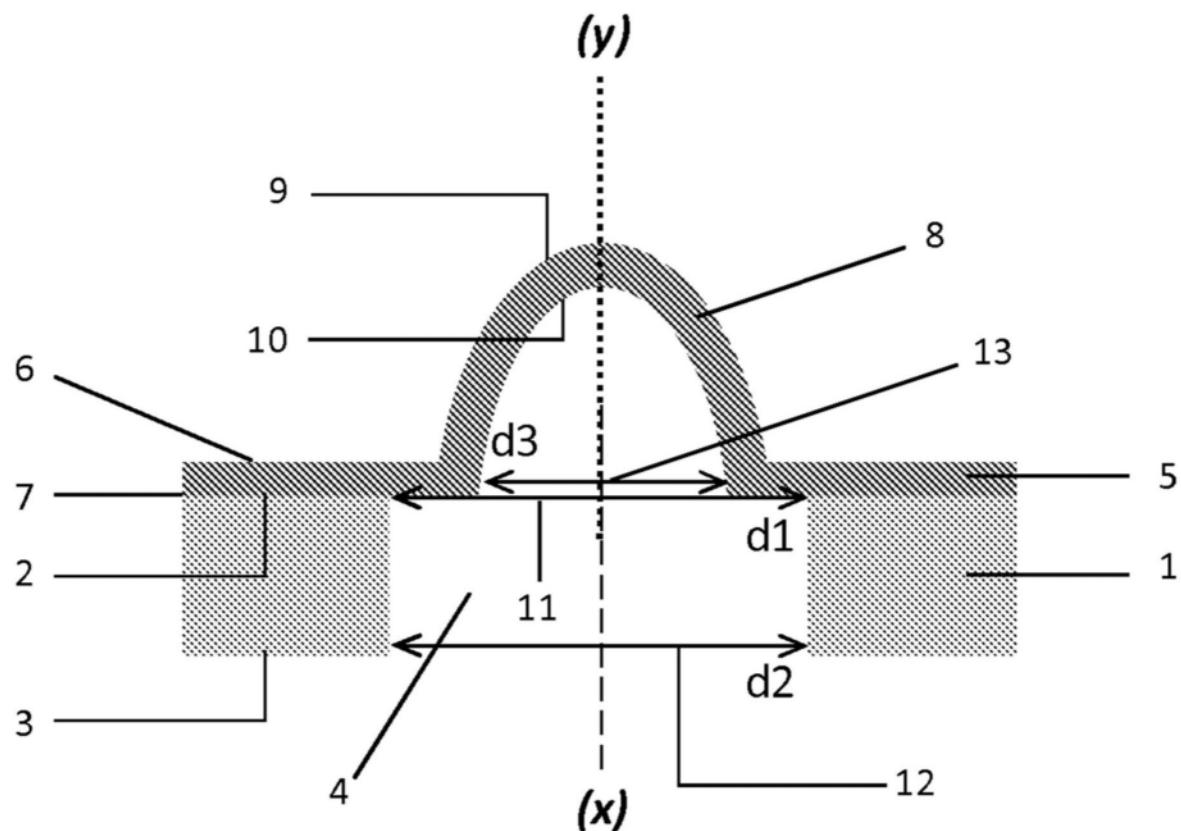


图7

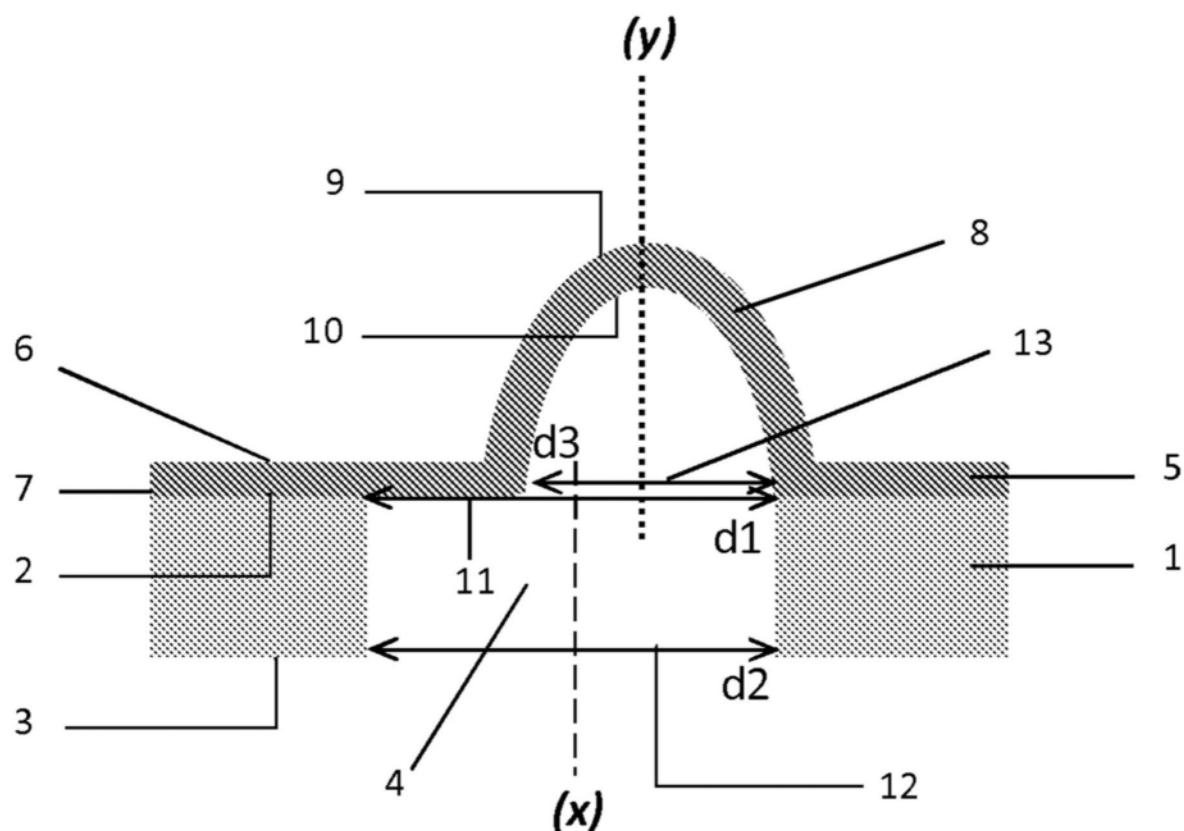


图8

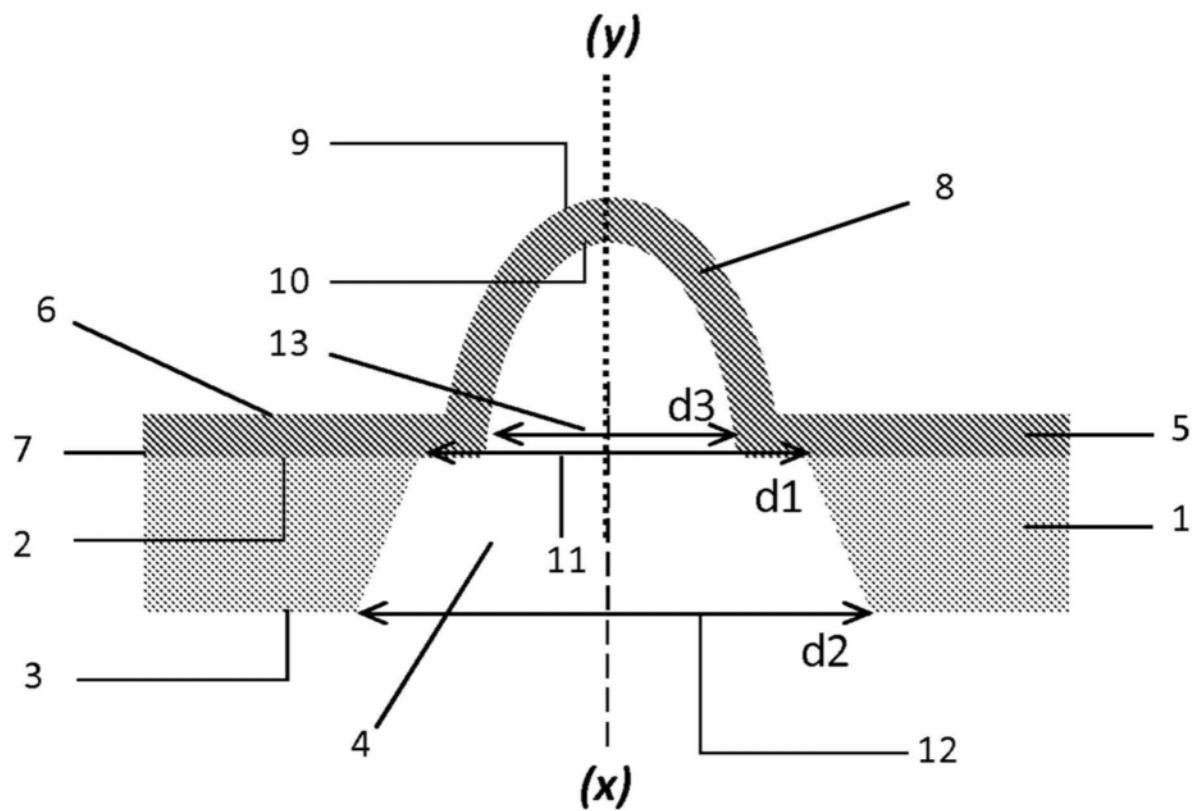


图9

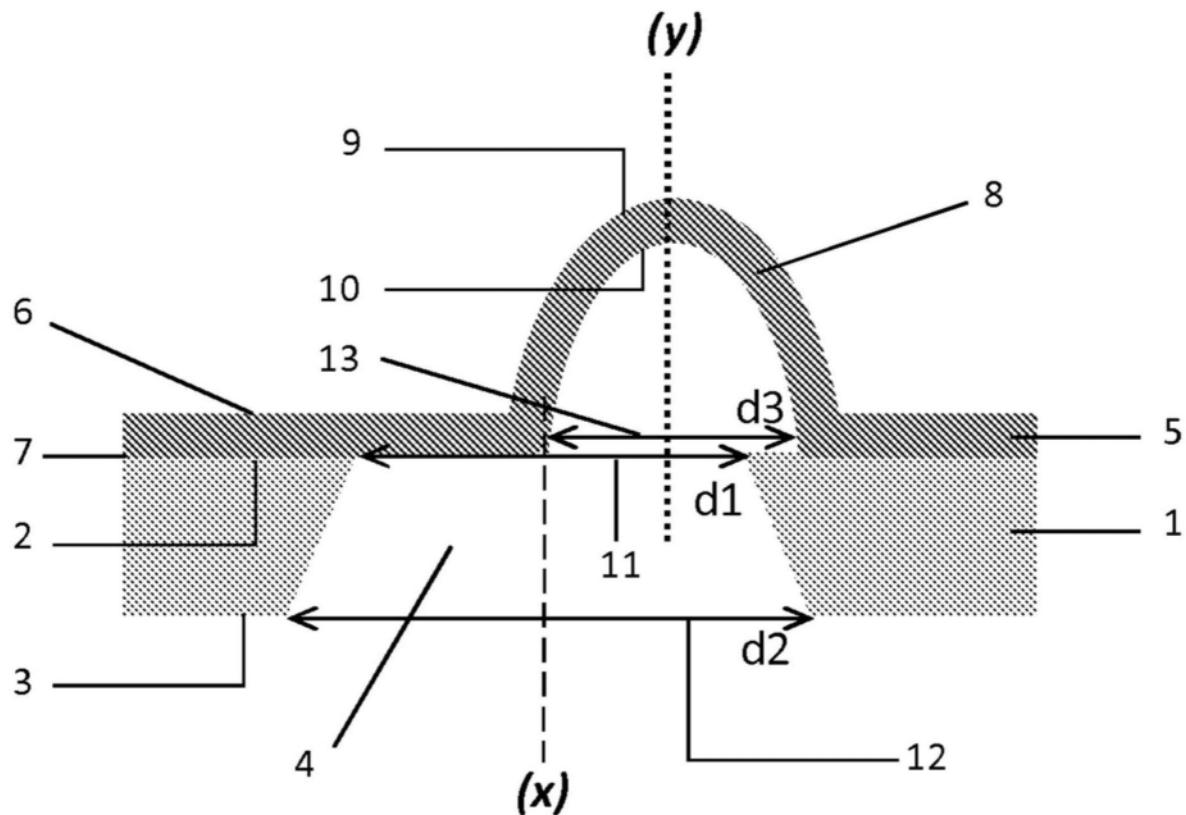


图10

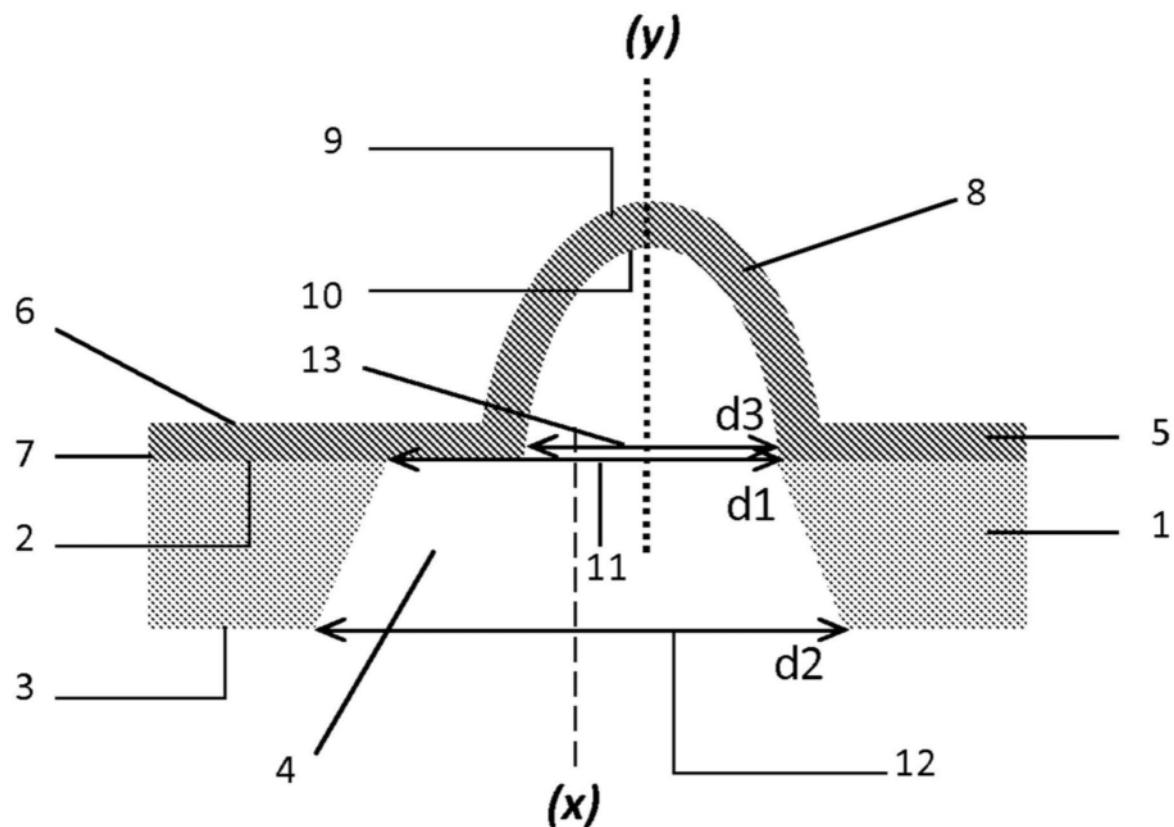


图11

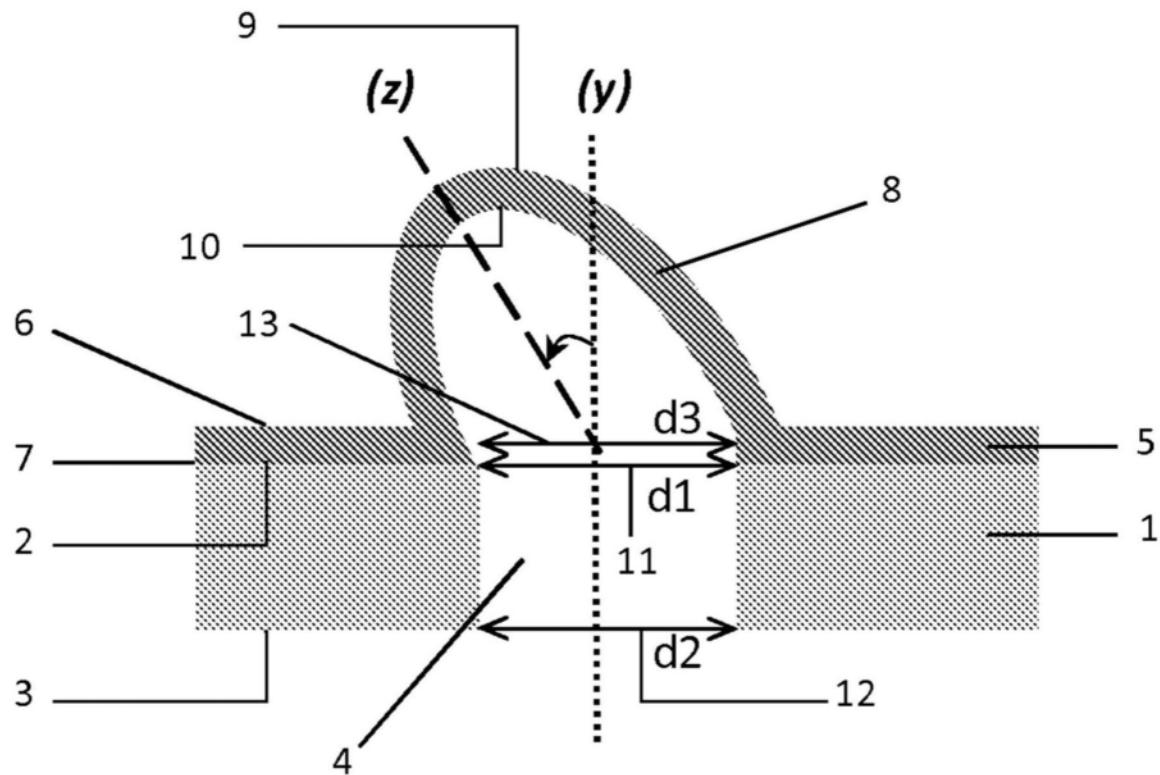


图12

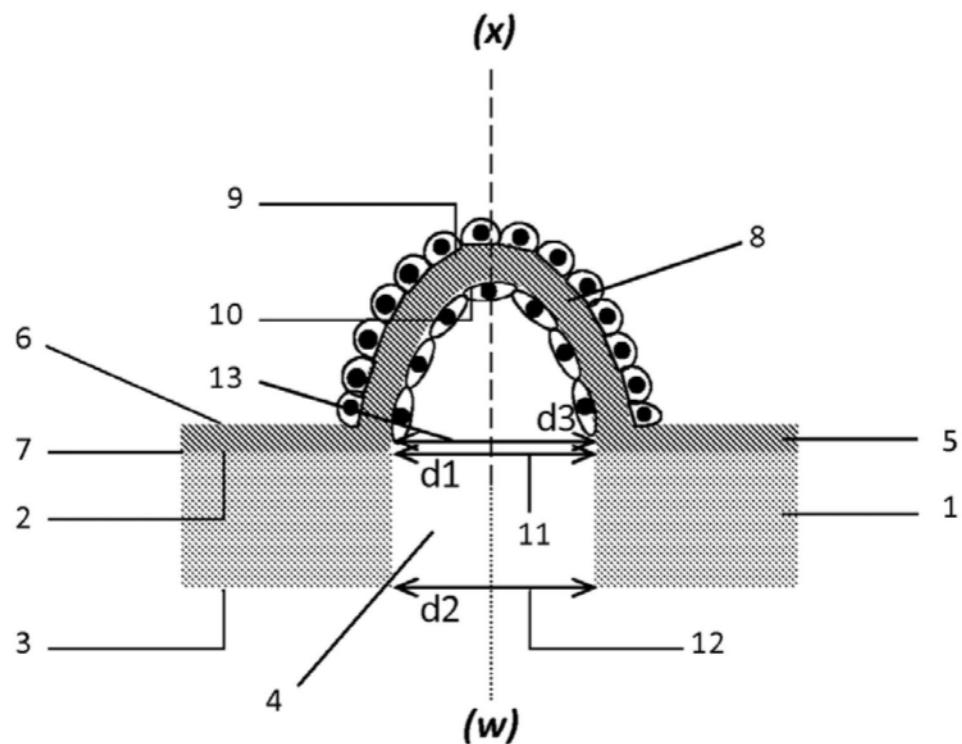


图13

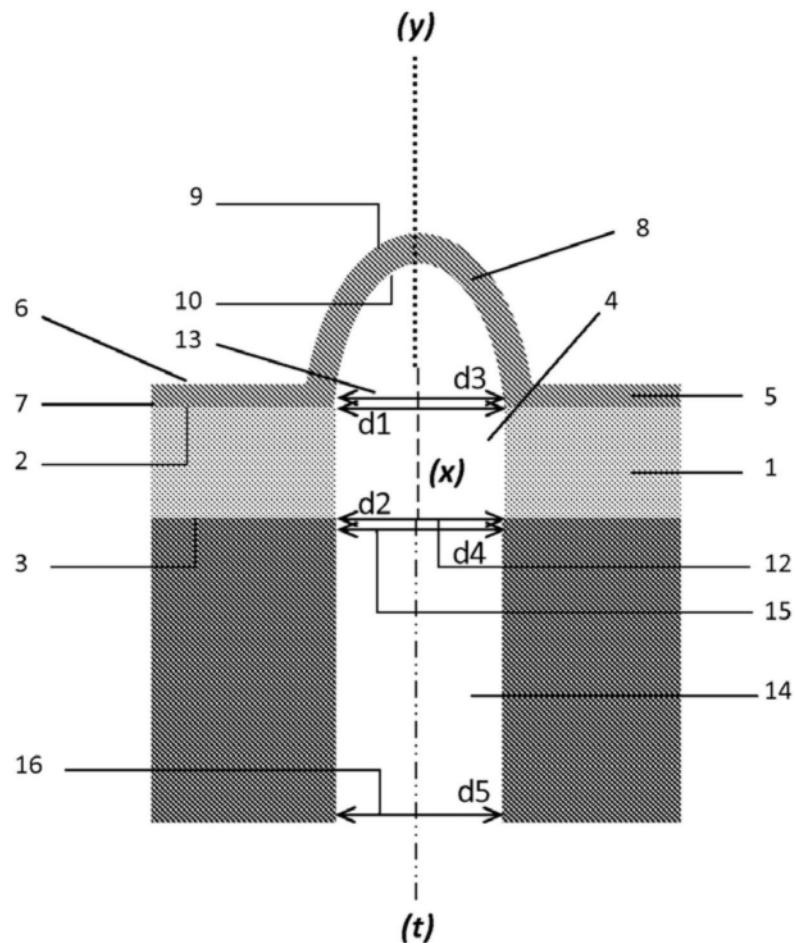


图14

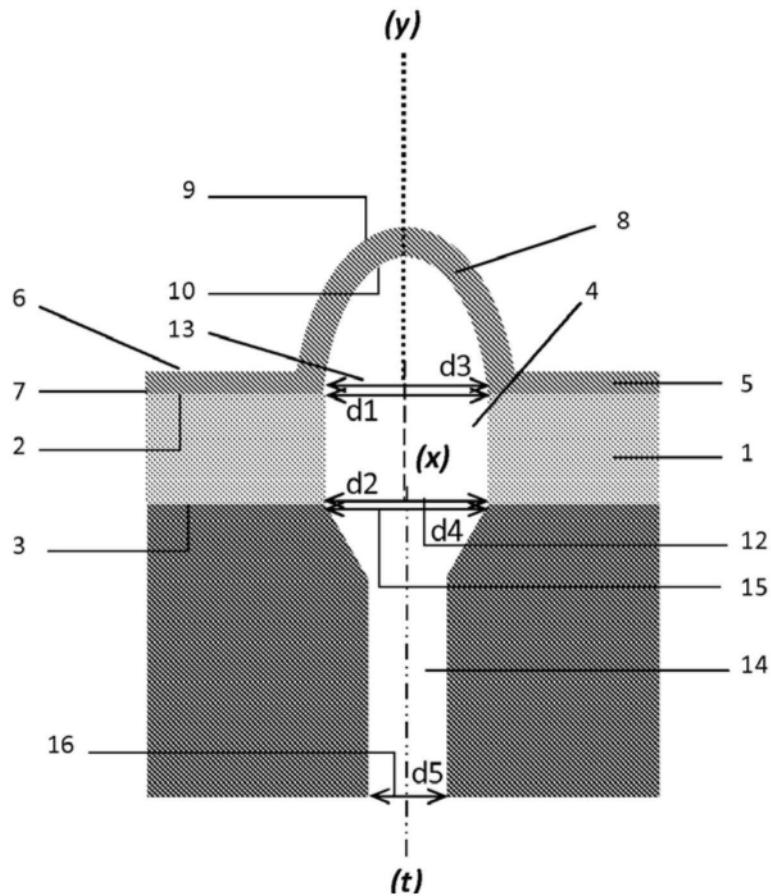


图15

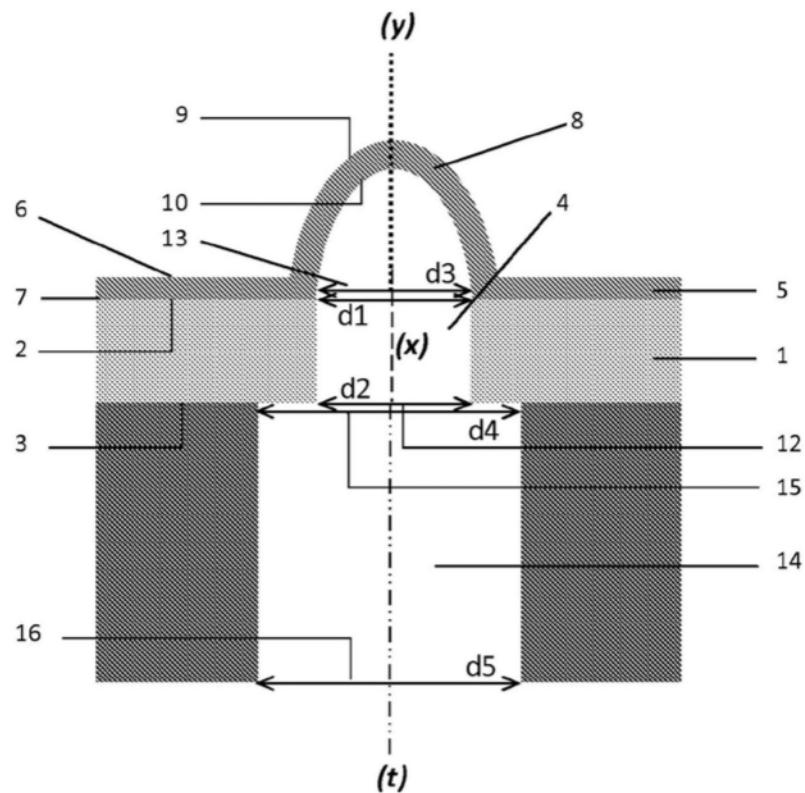


图16

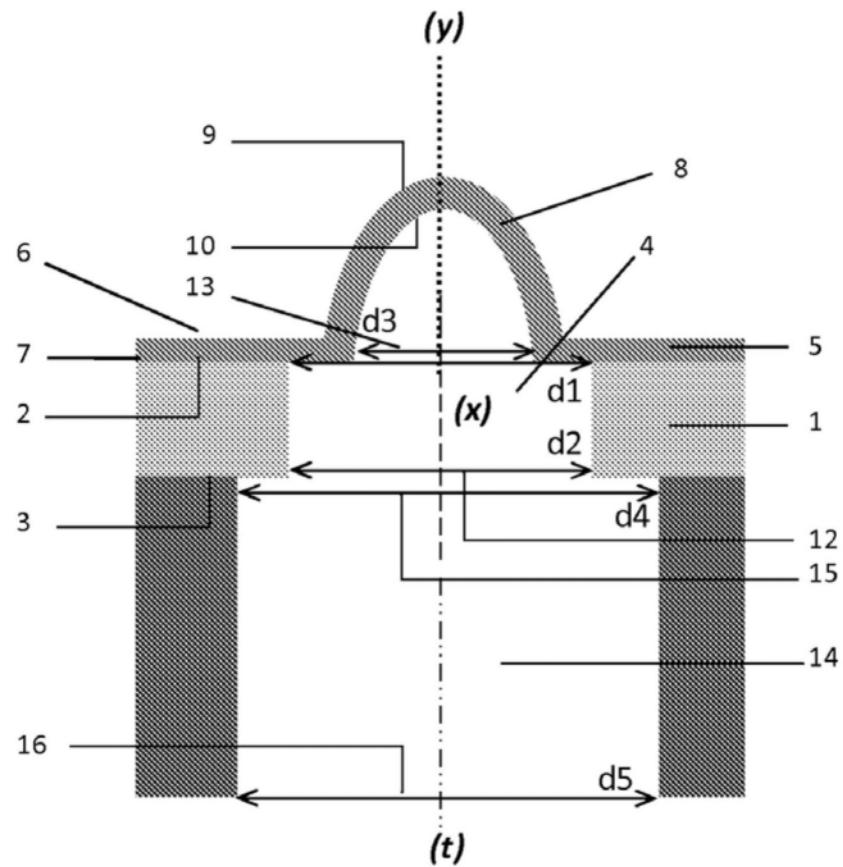


图17

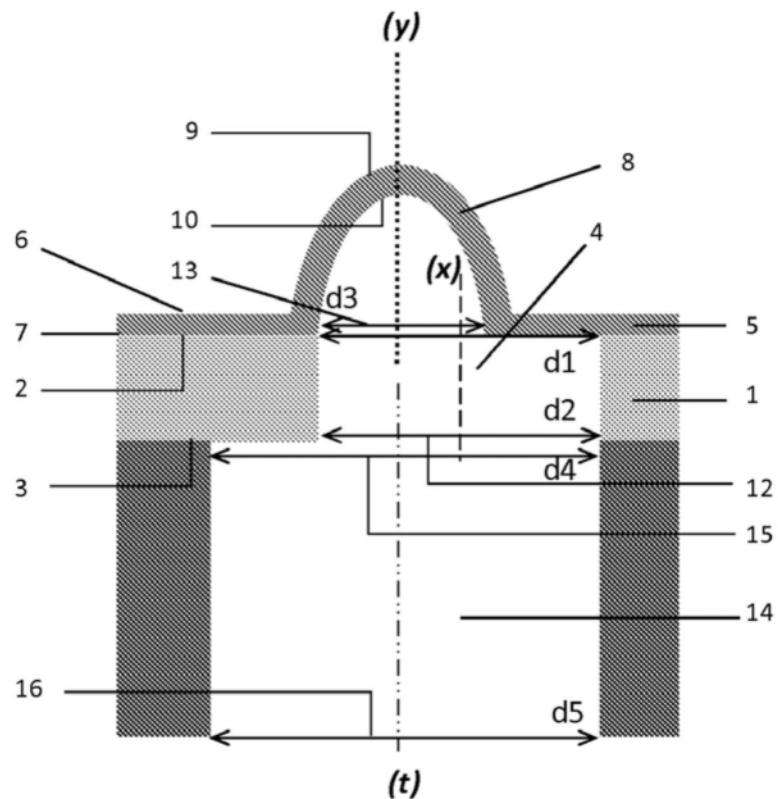


图18

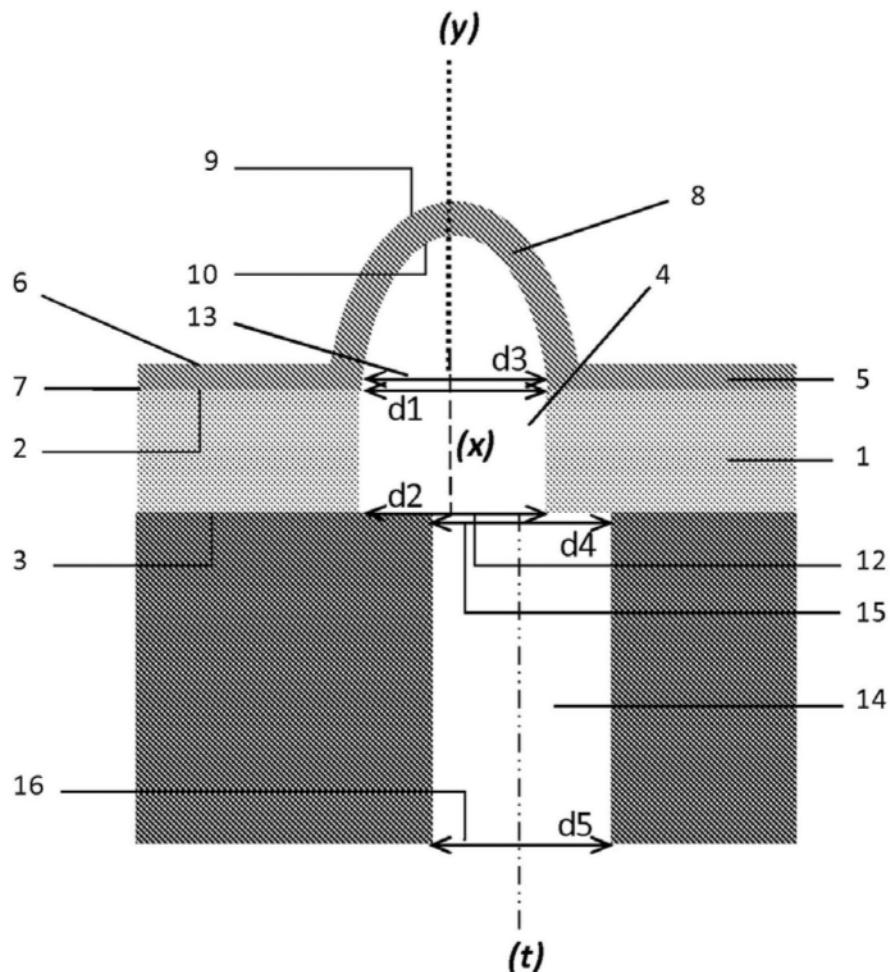


图19

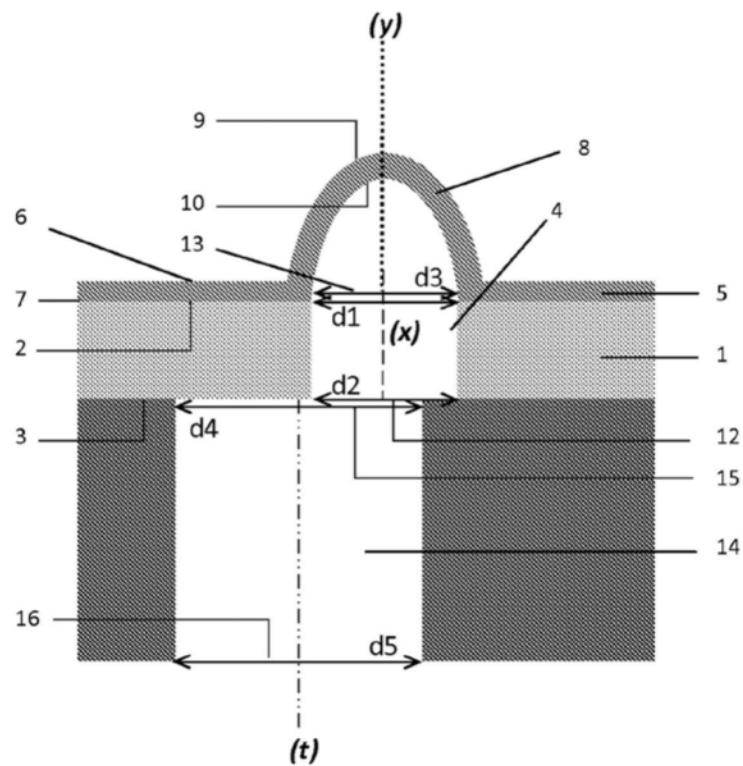


图20

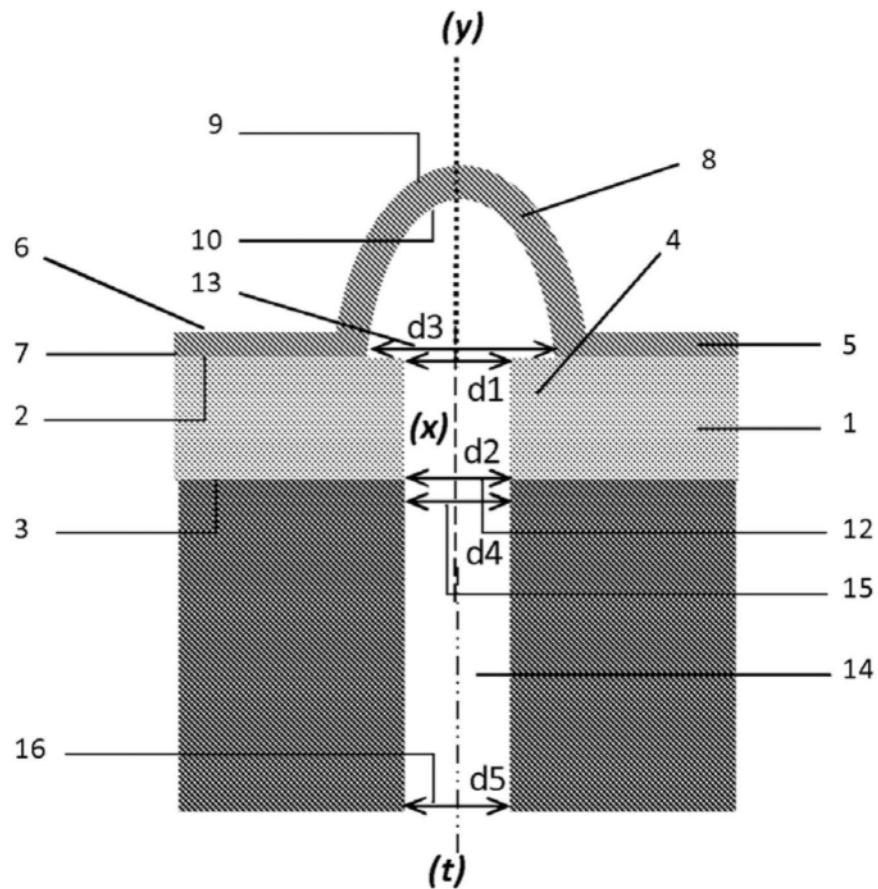


图21

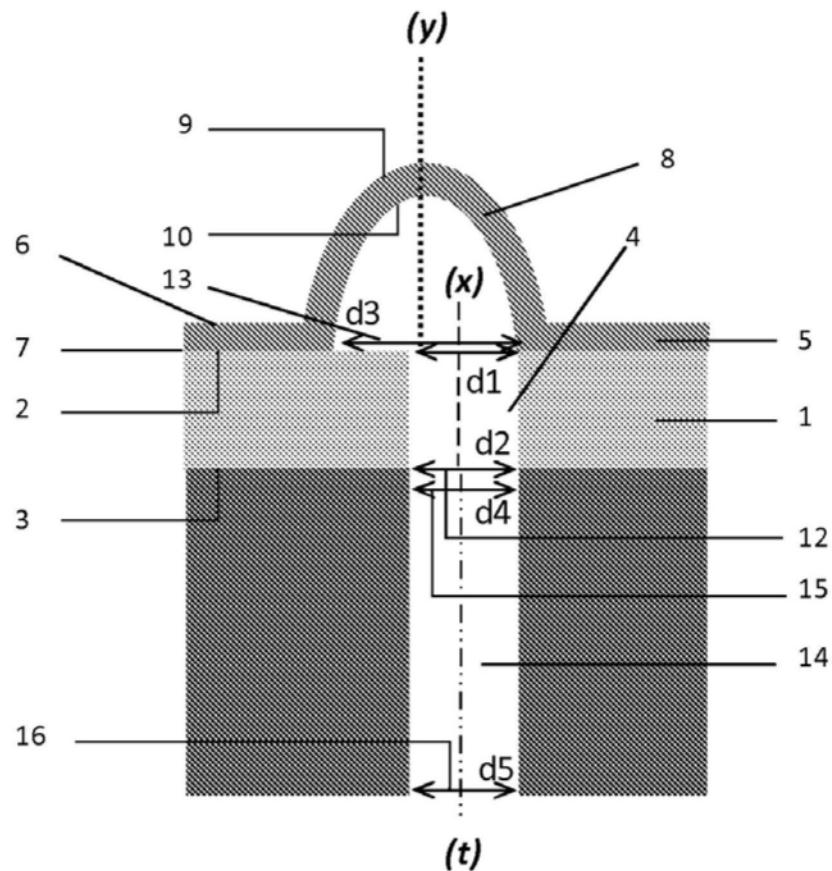


图22

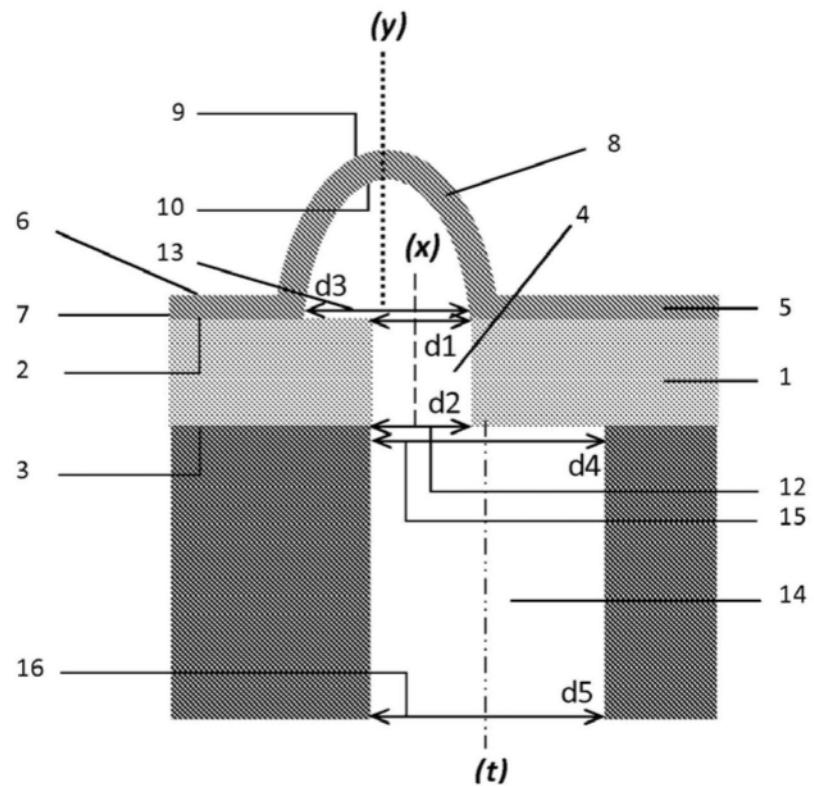


图23

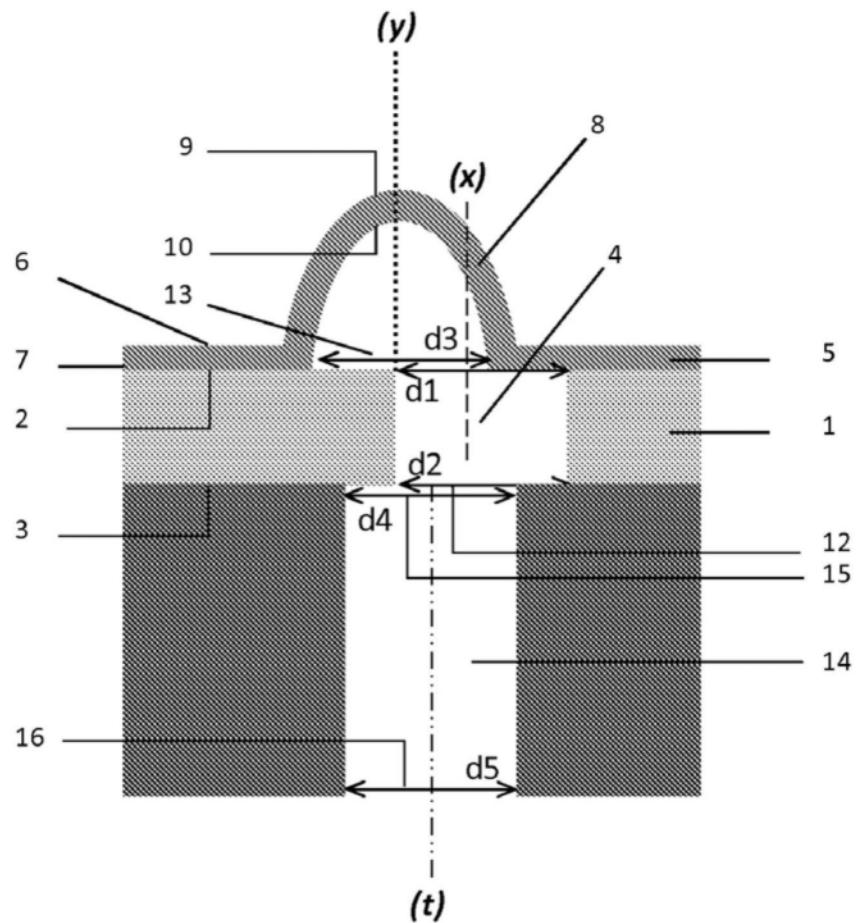


图24

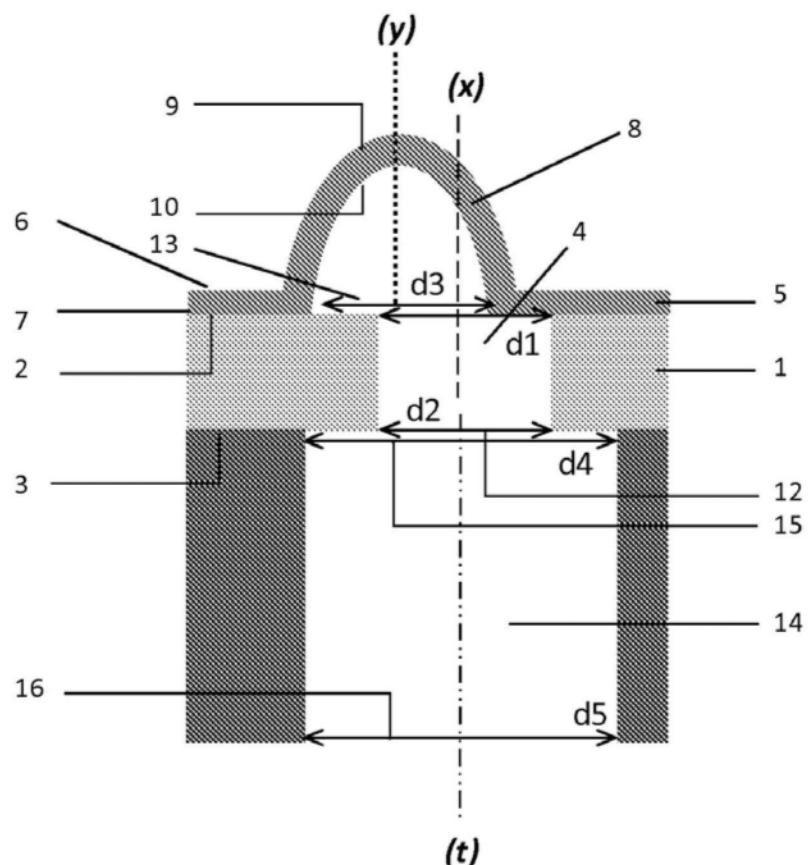


图25

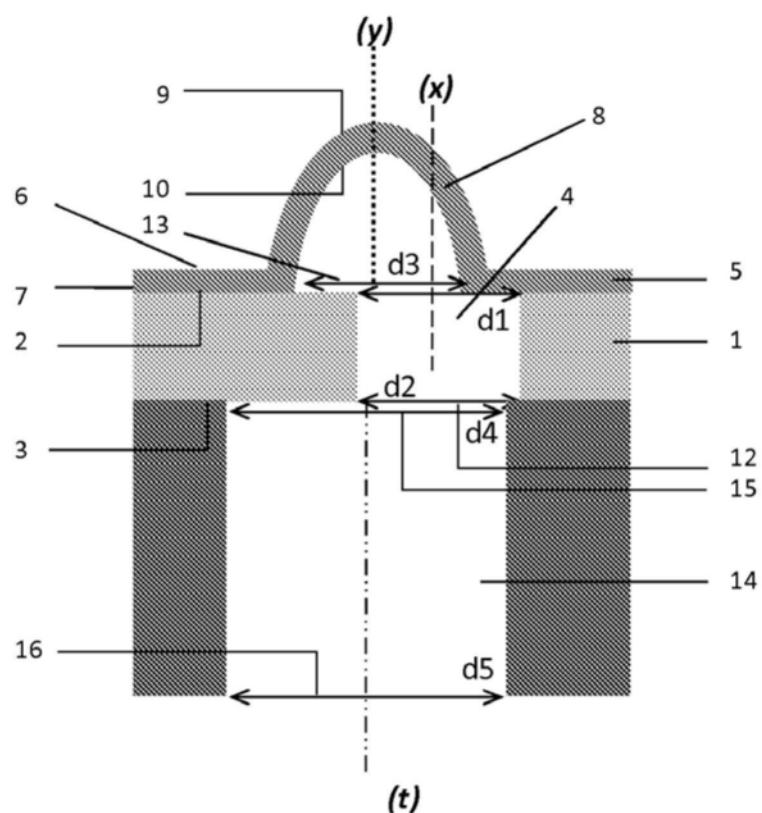


图26

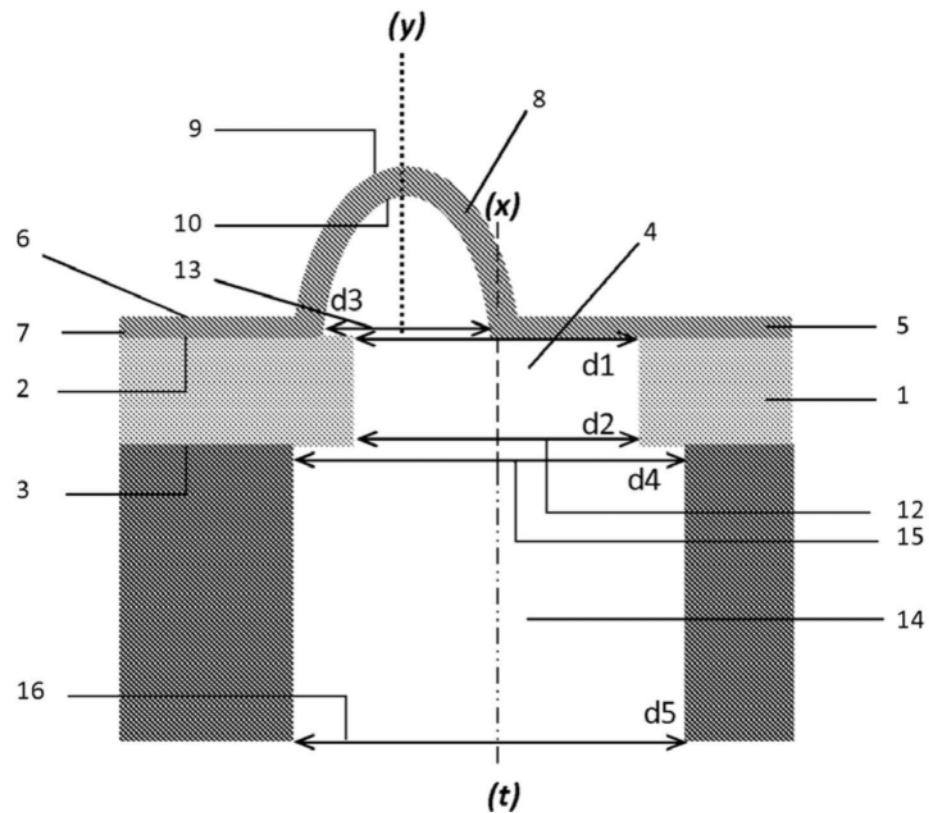


图27

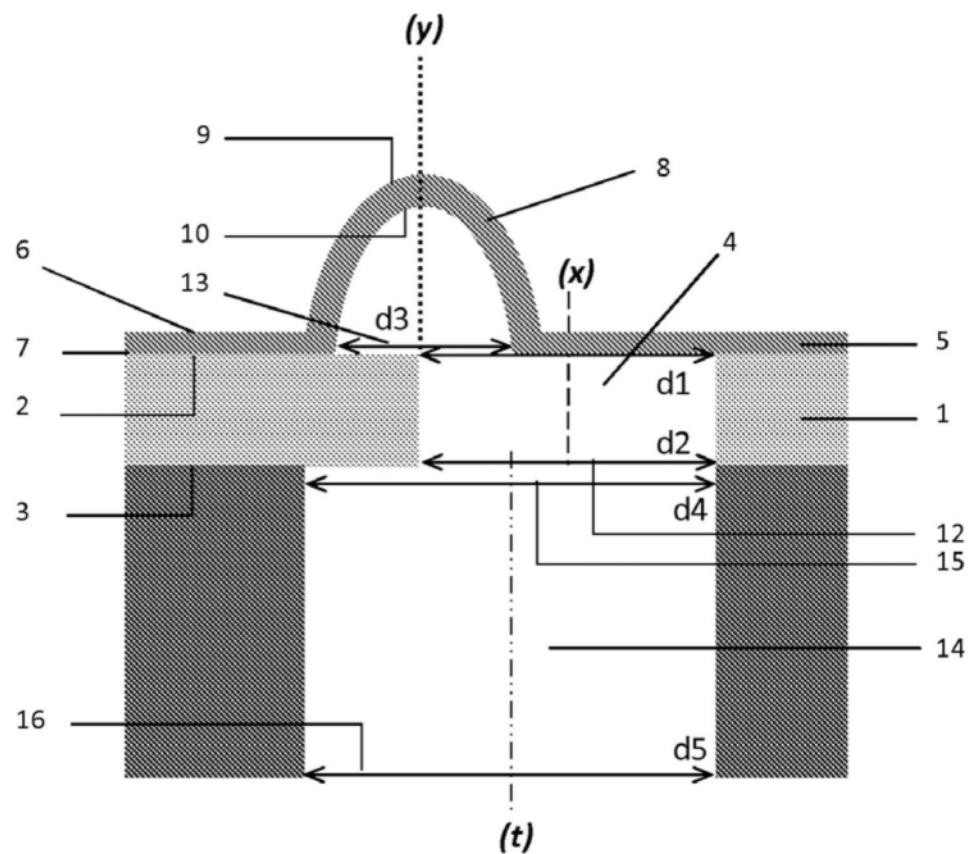


图28

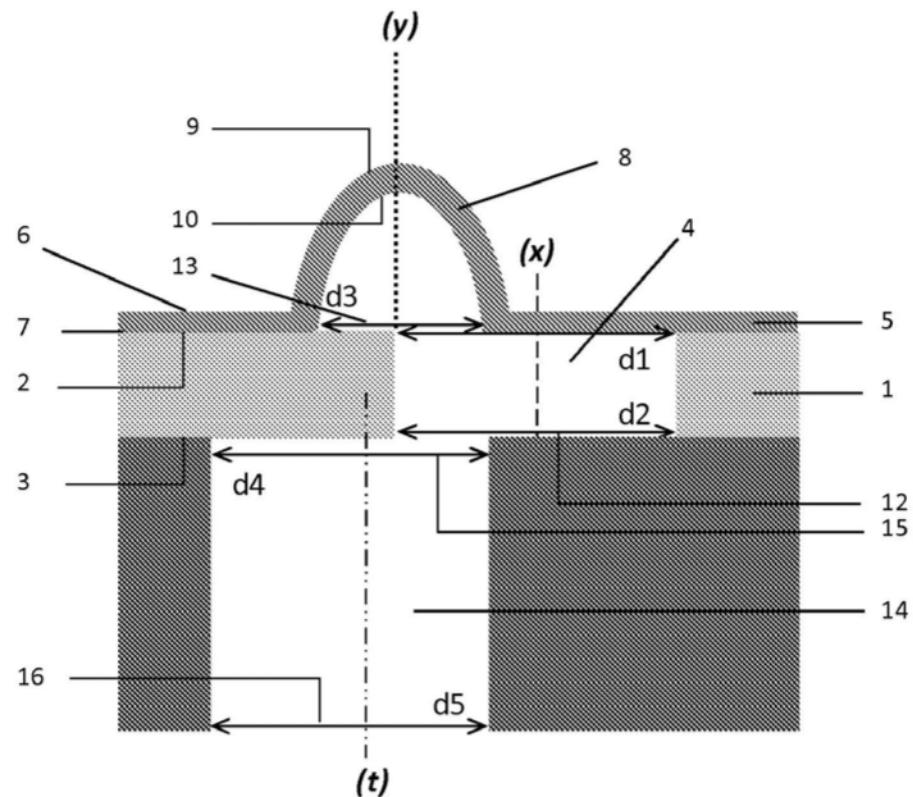


图29

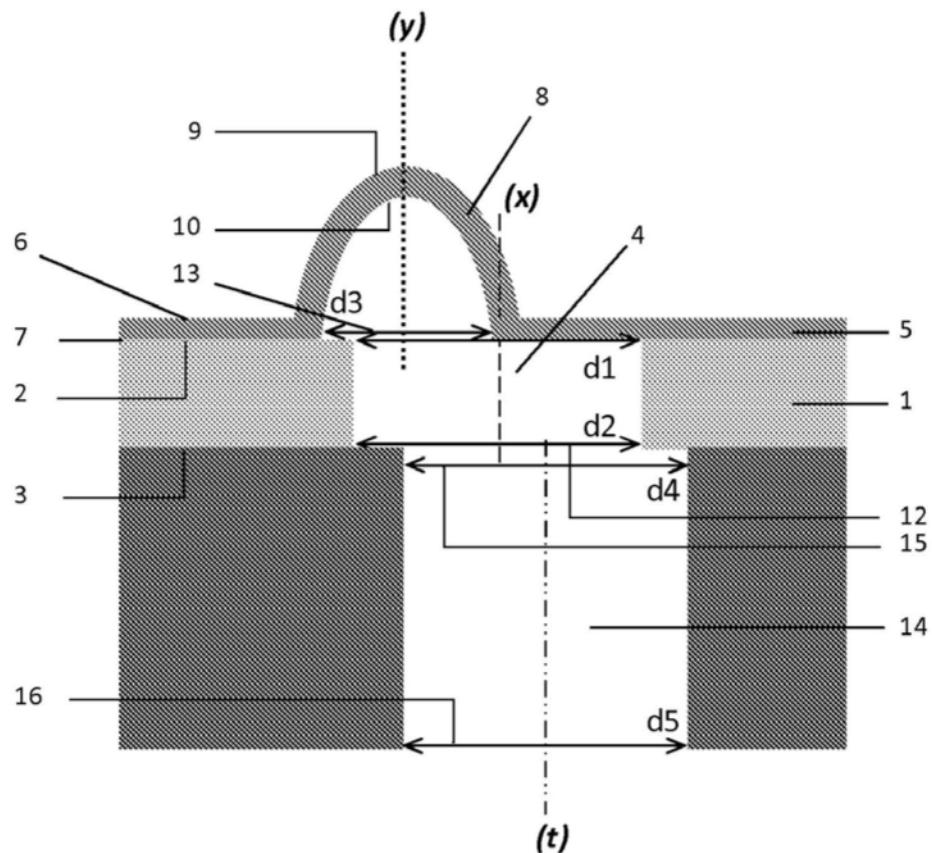


图30

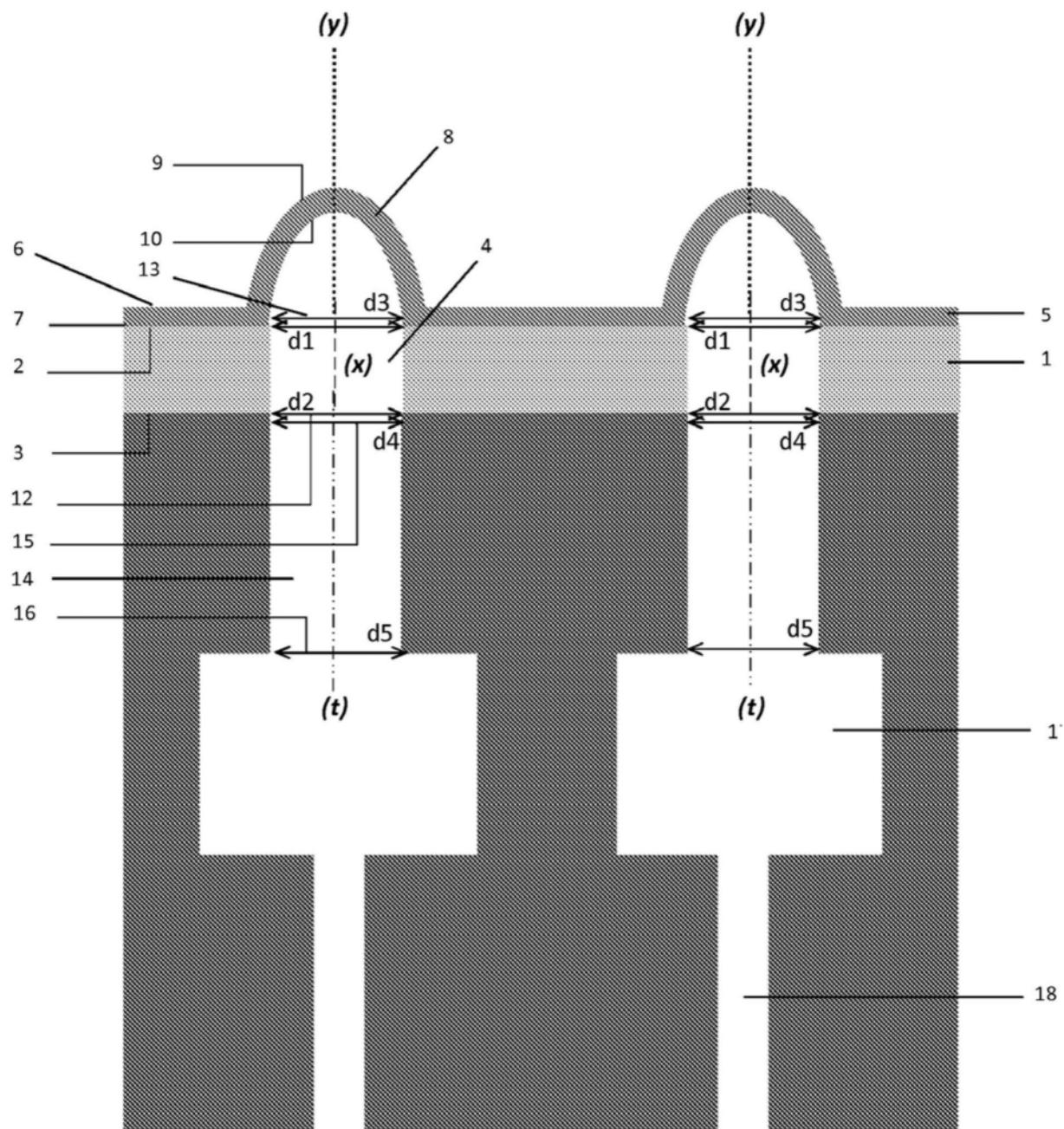


图31

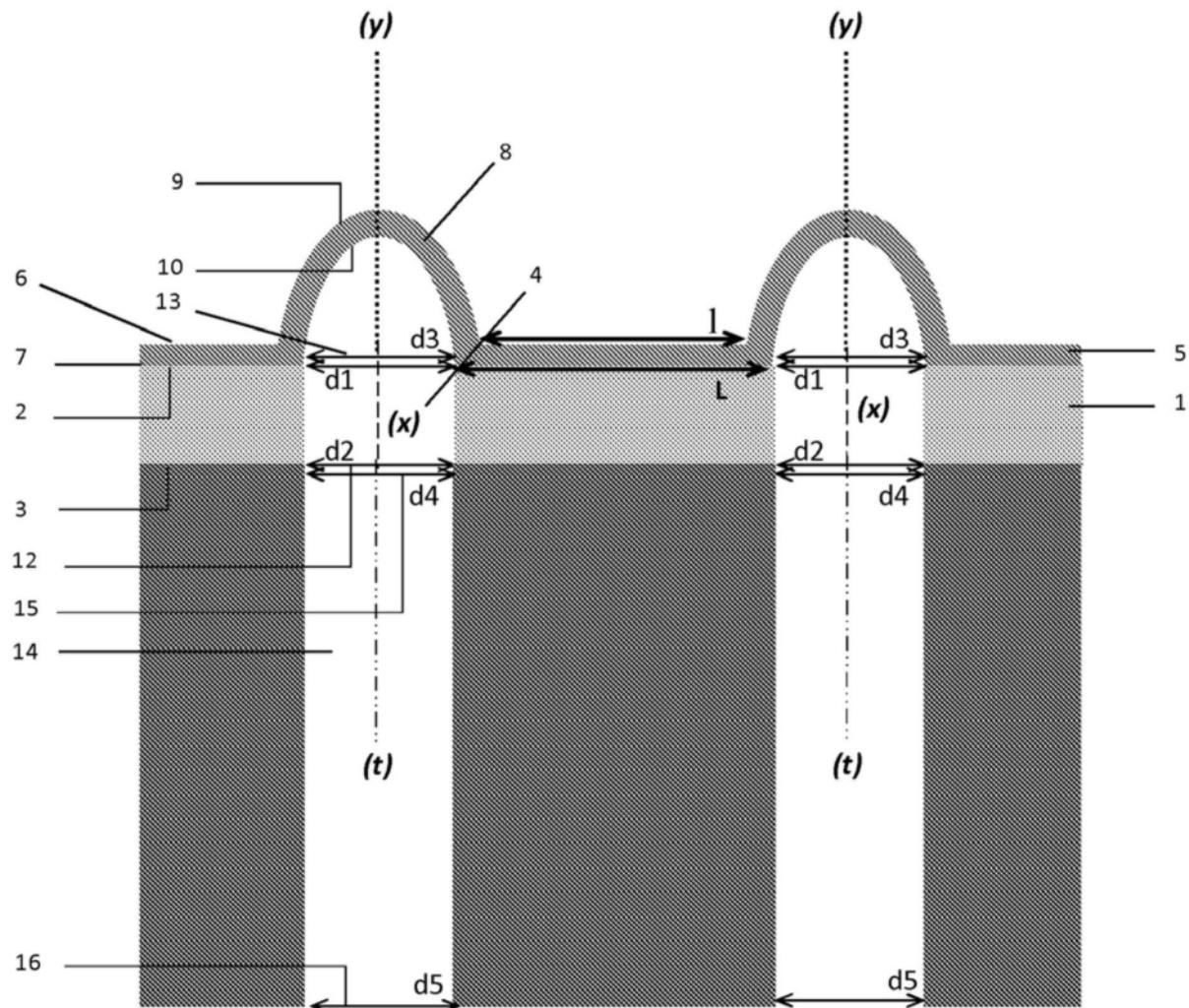


图32

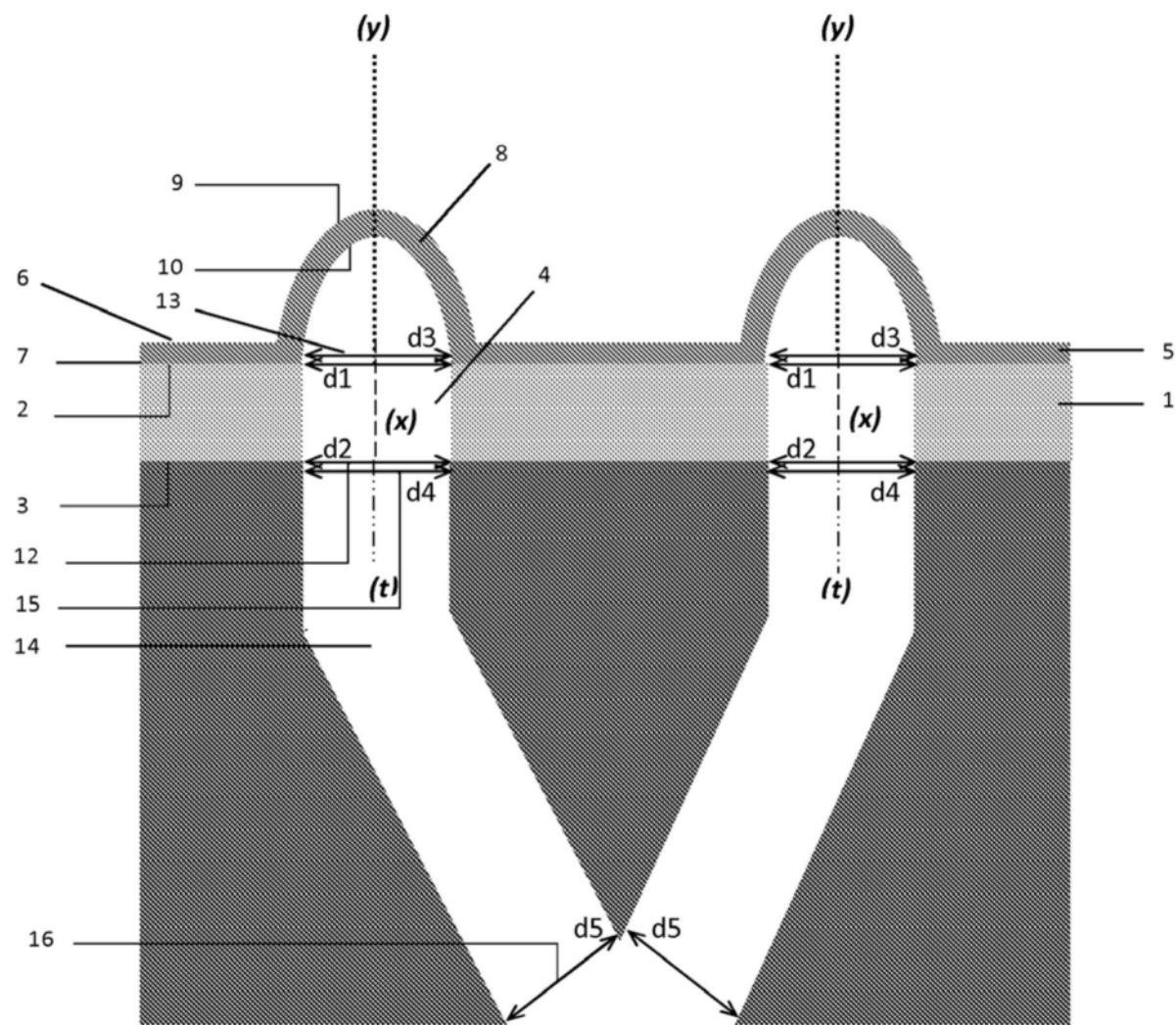


图33

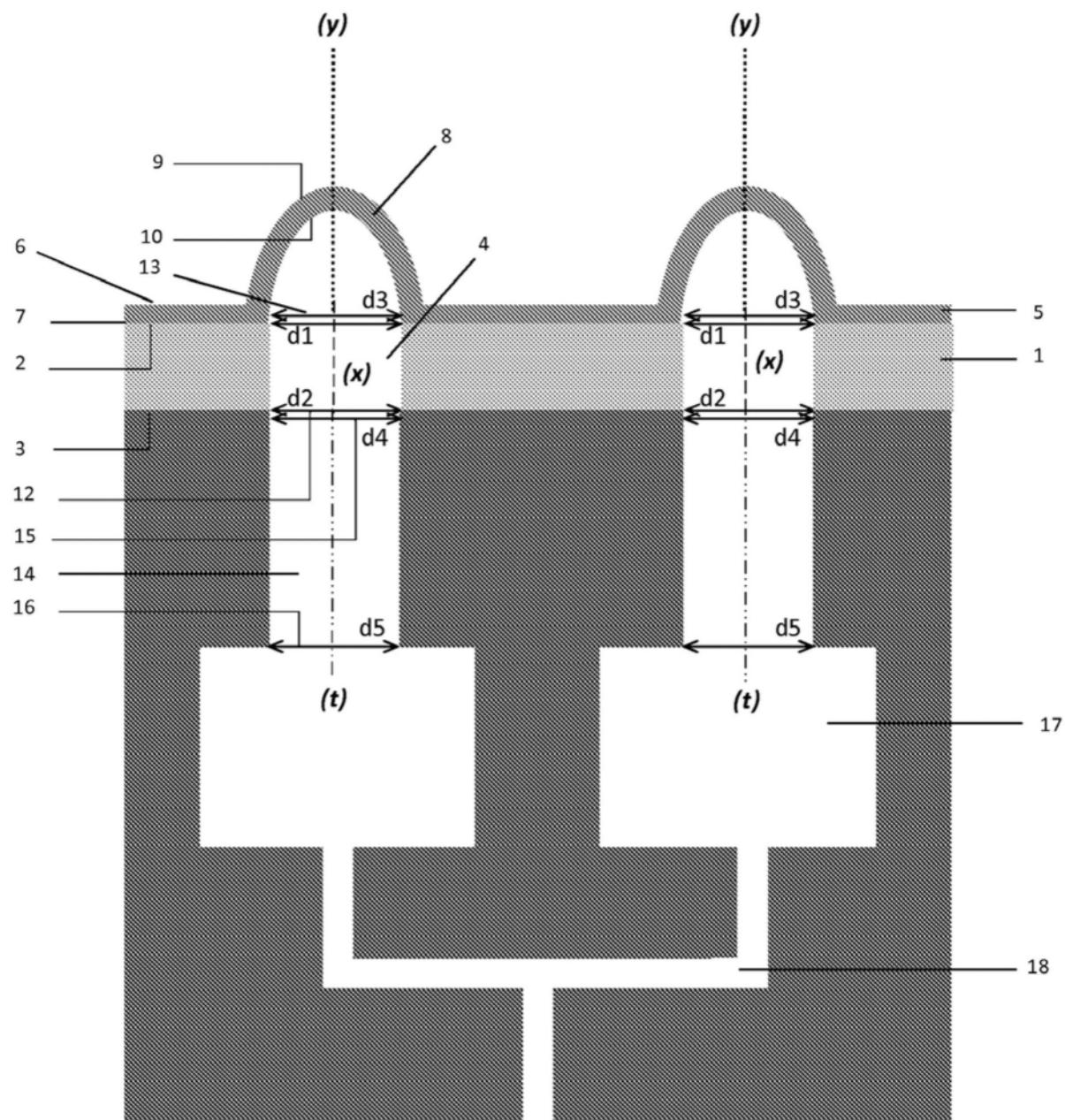


图34

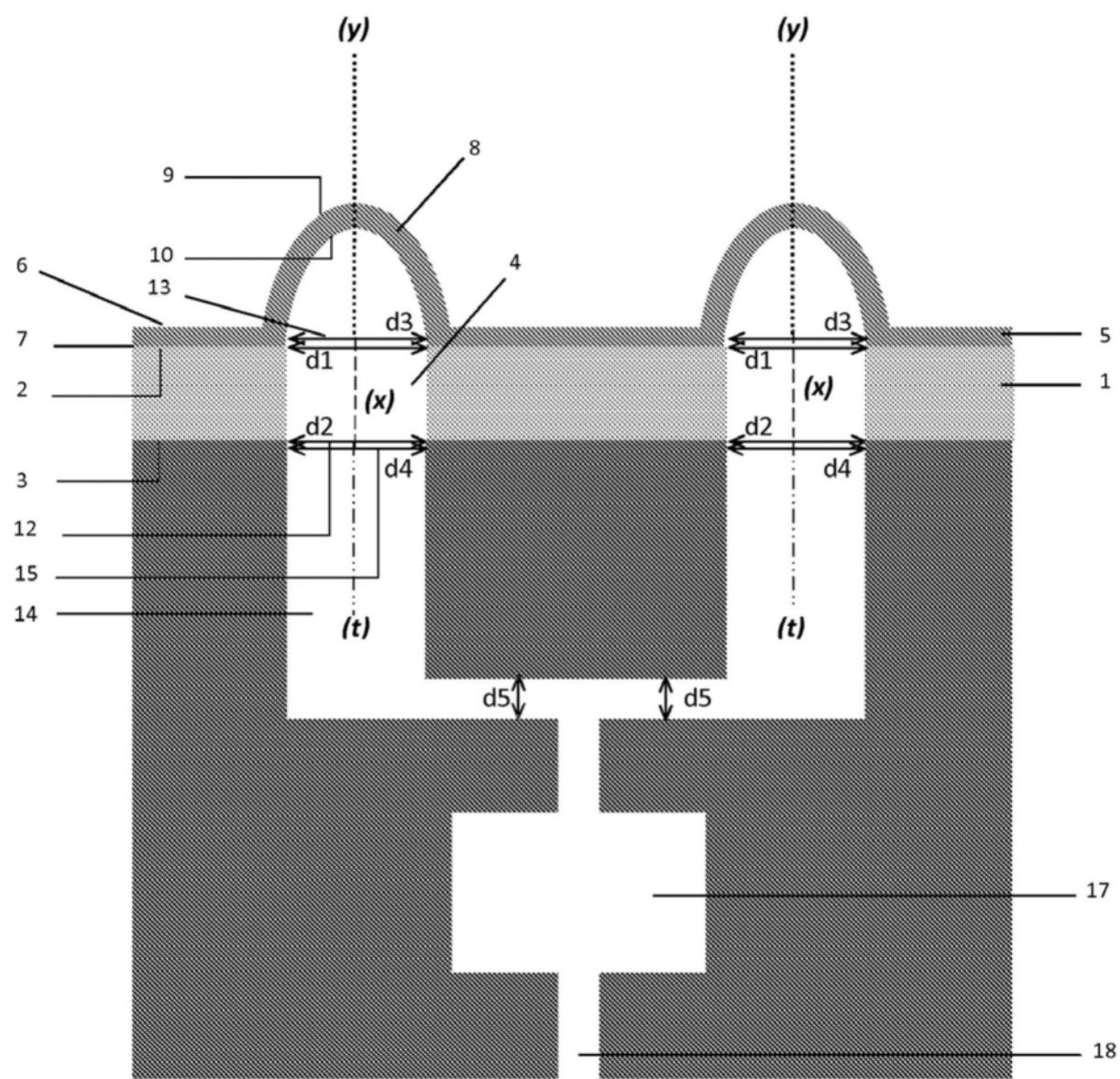


图35

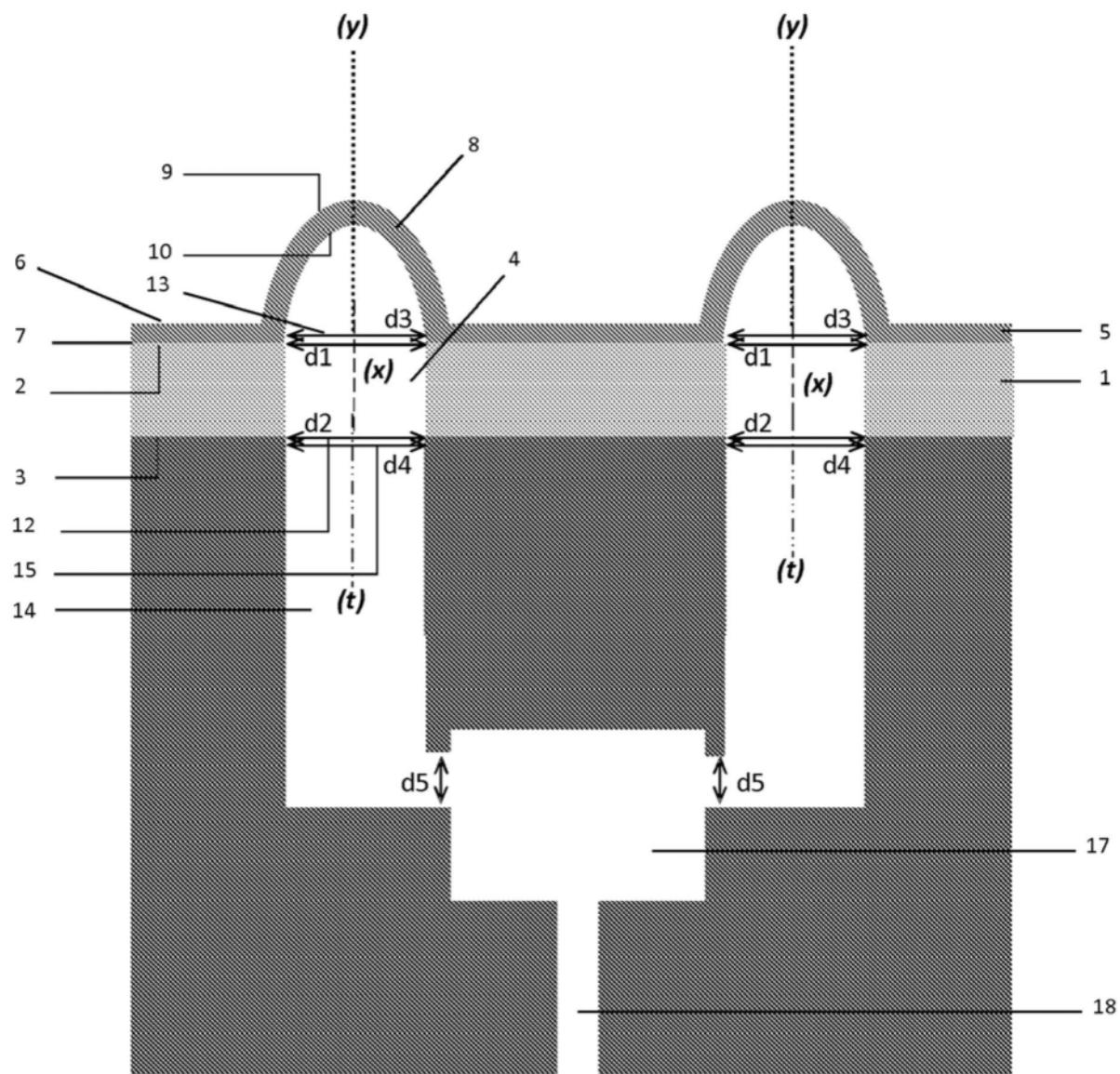


图36

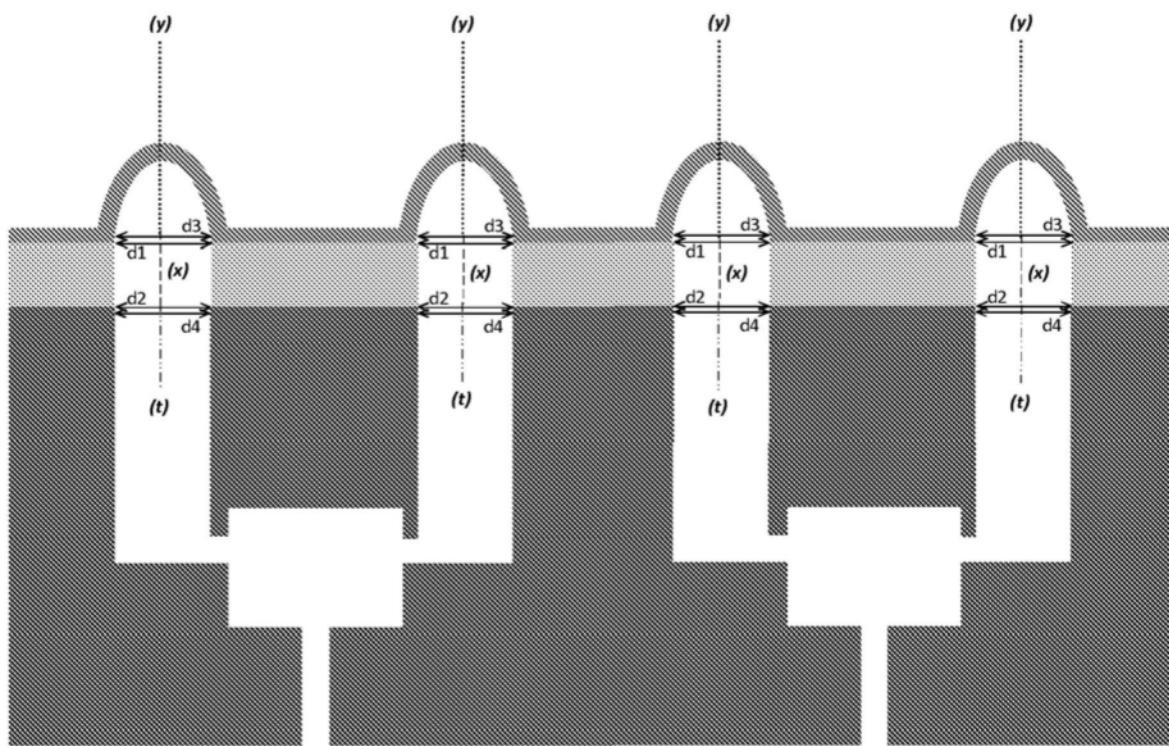


图37

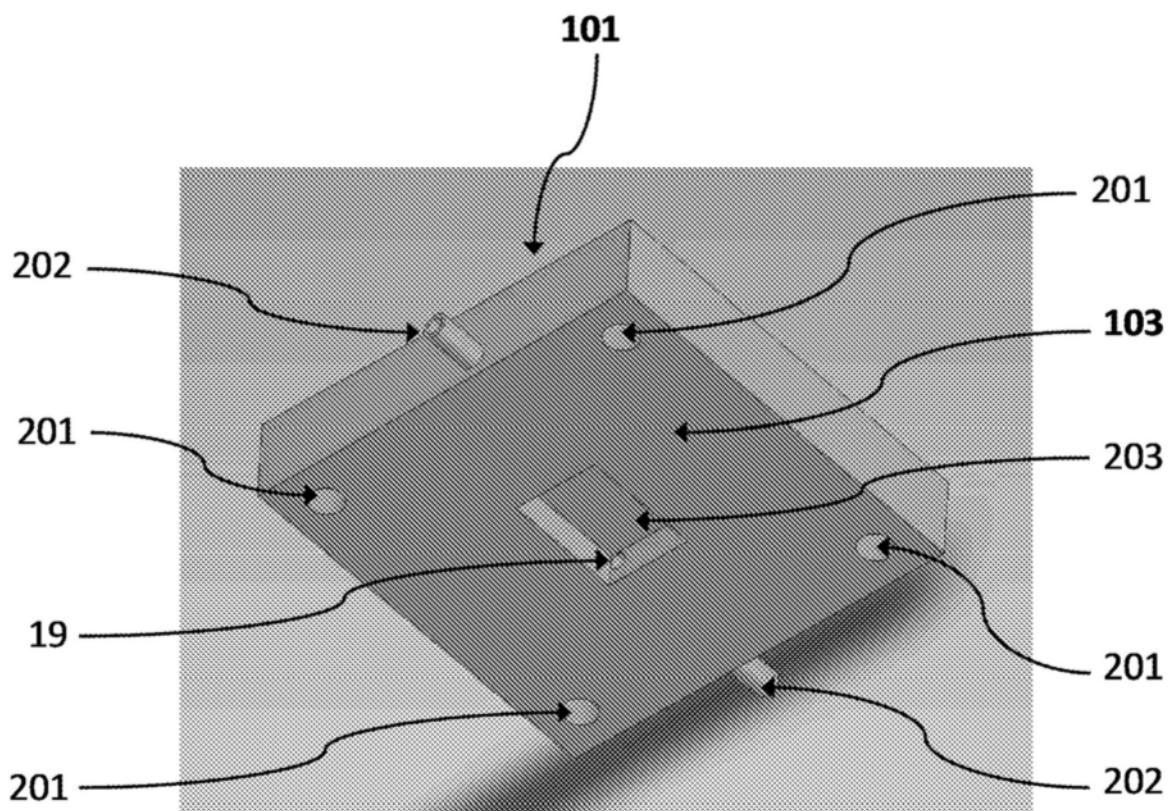


图38

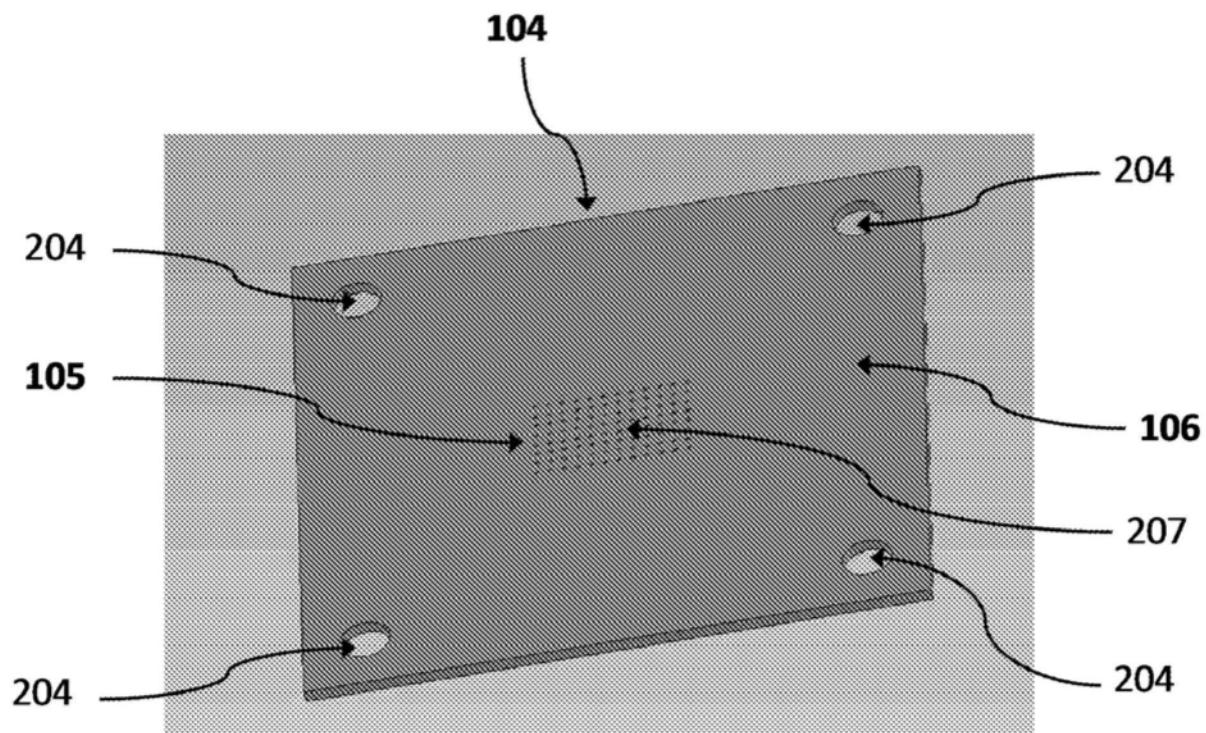


图39

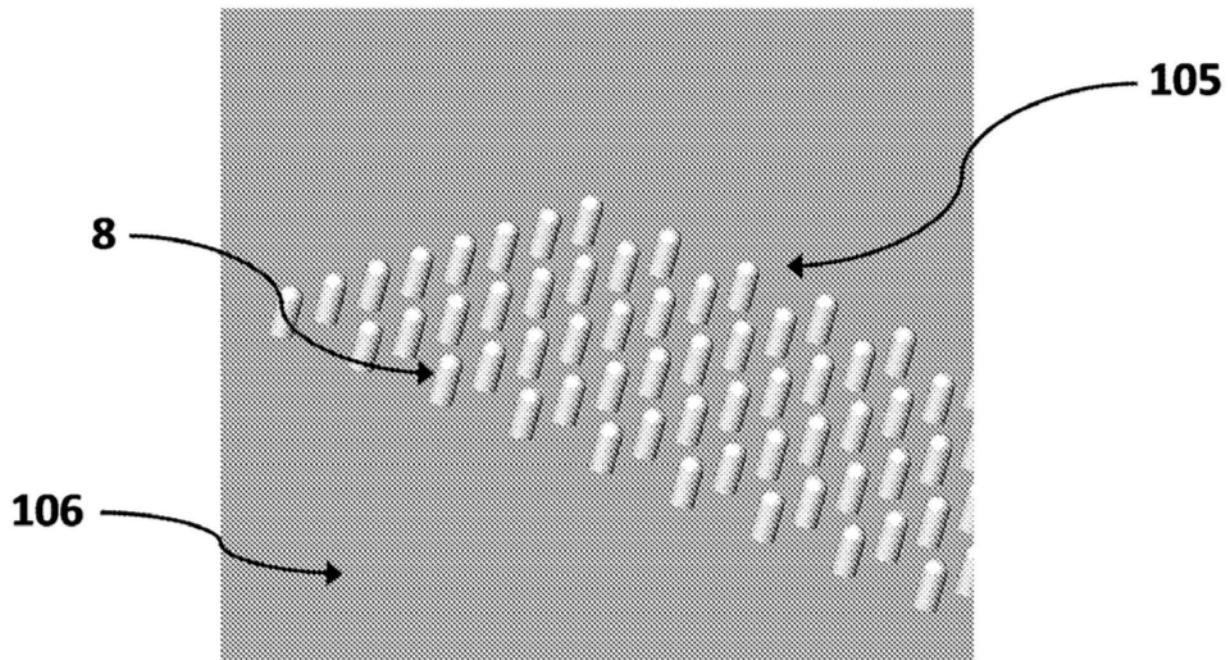


图40

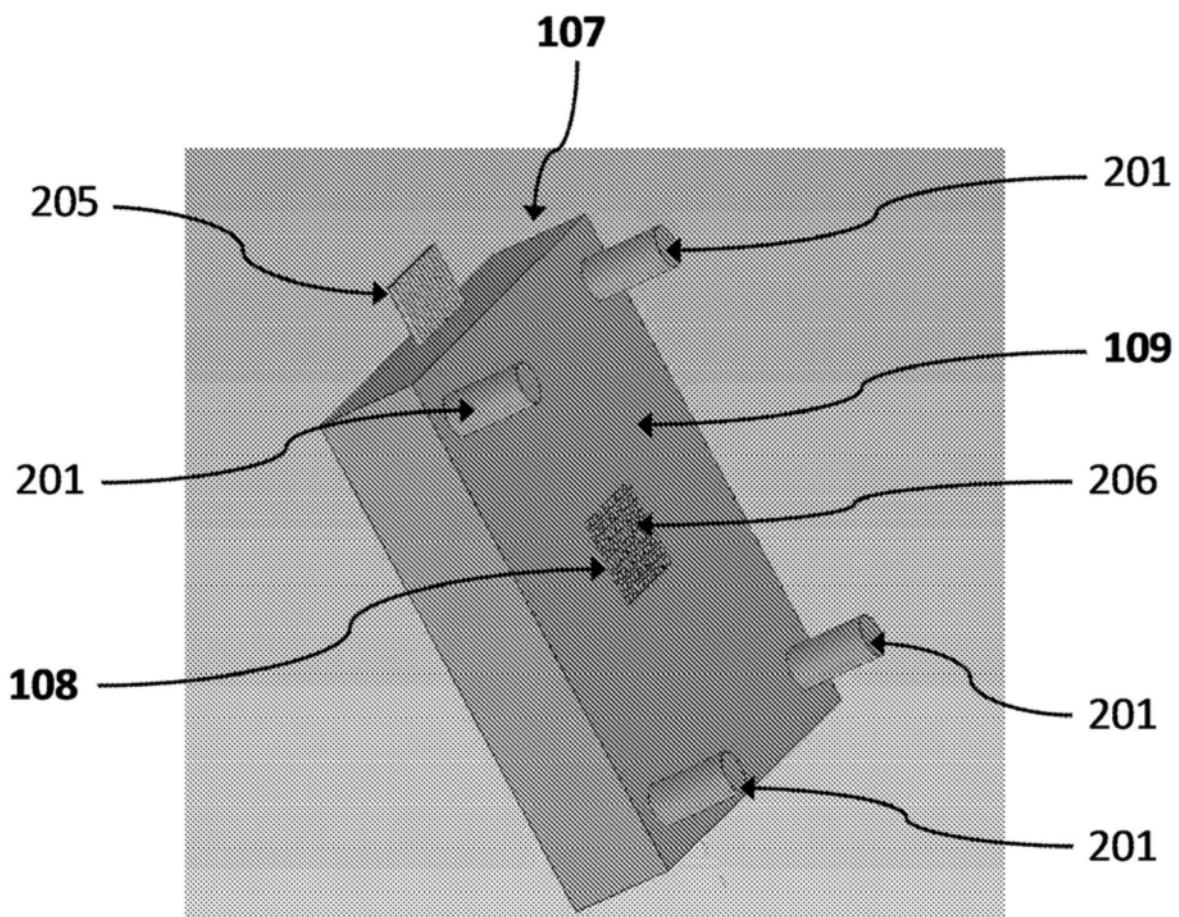


图41

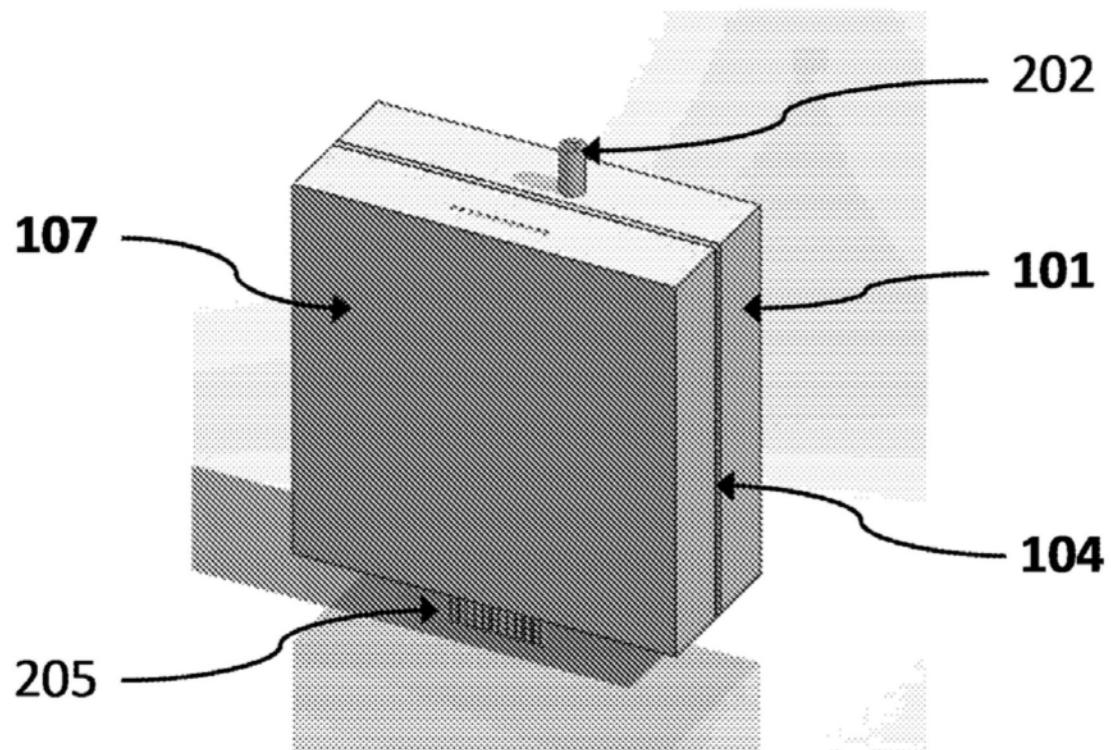


图42

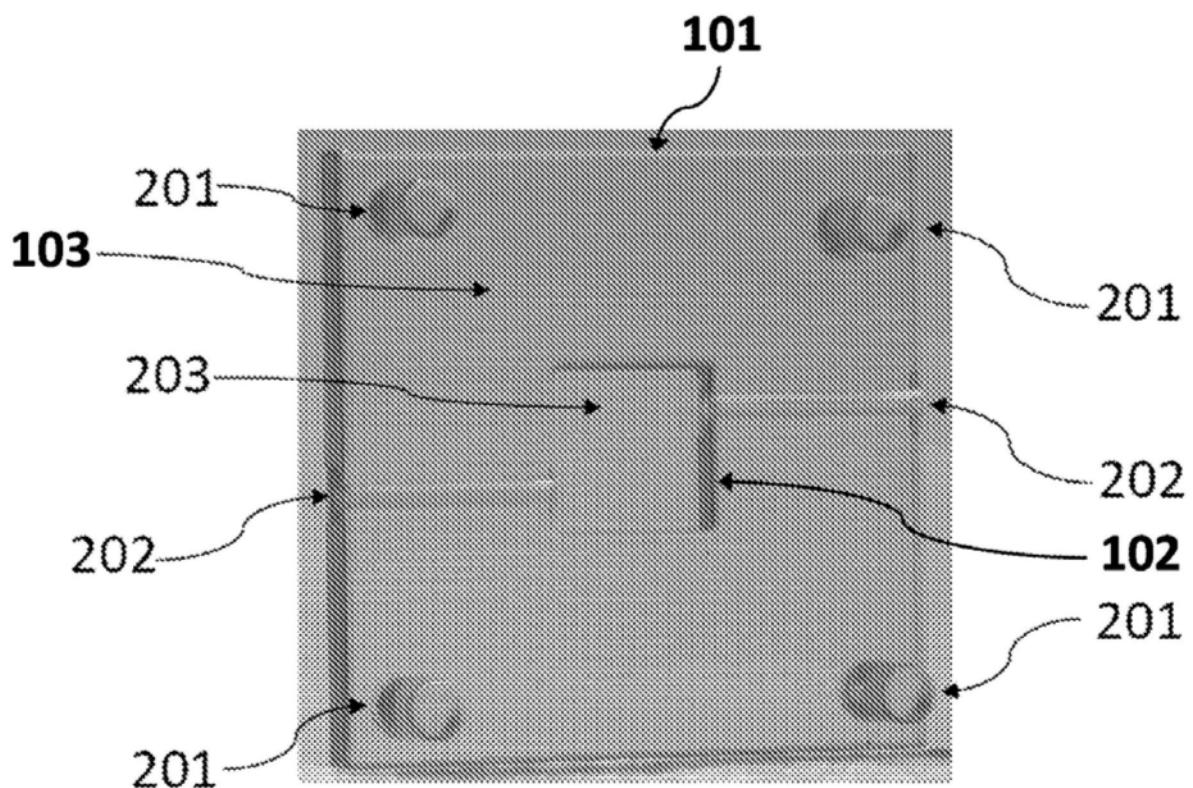


图43

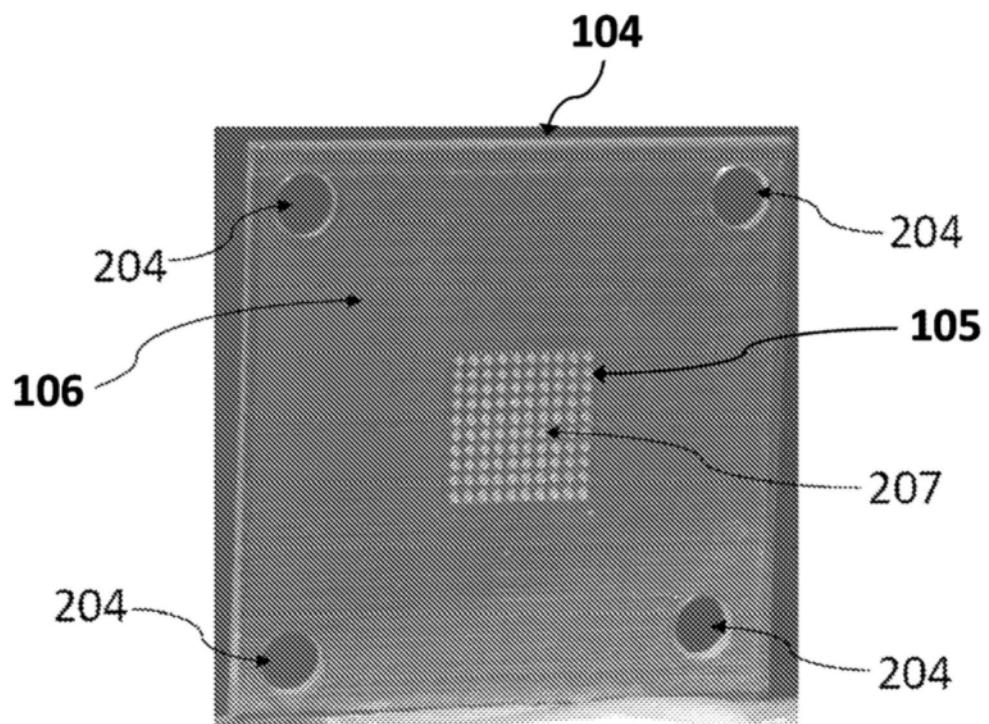


图44

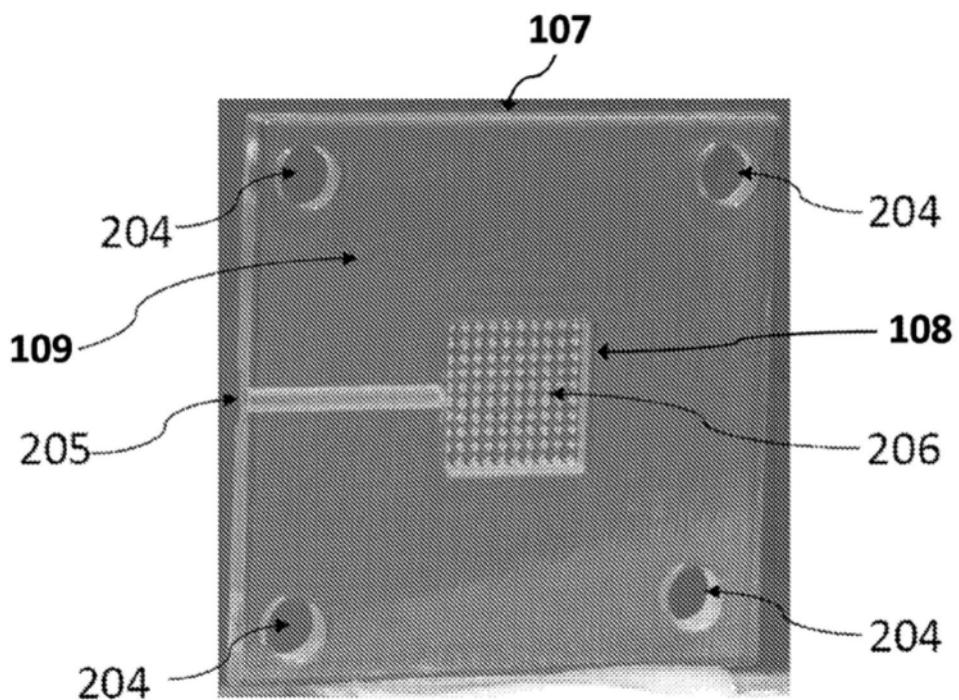


图45

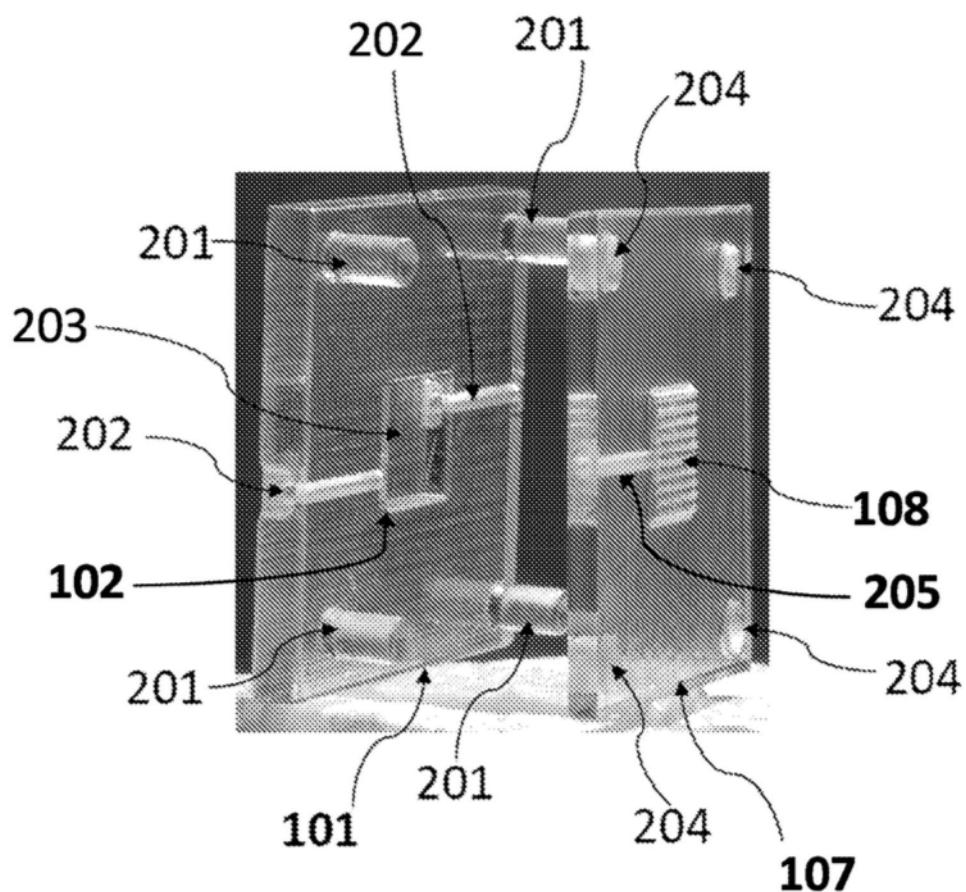


图46

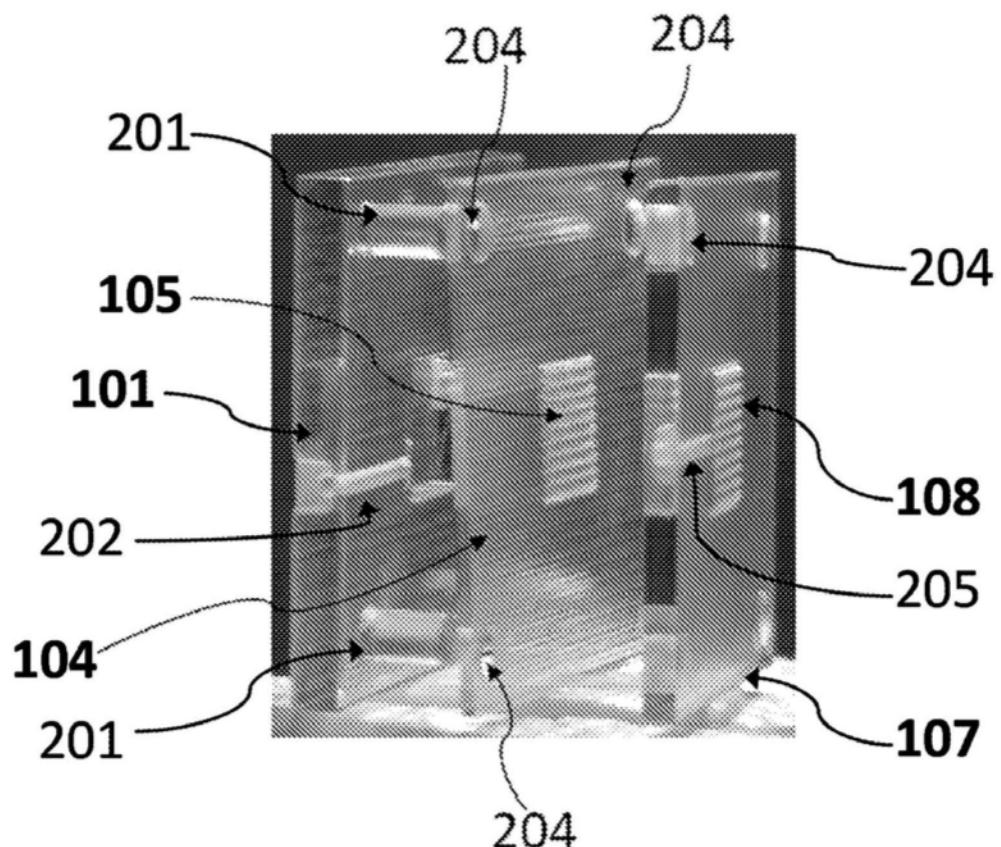


图47

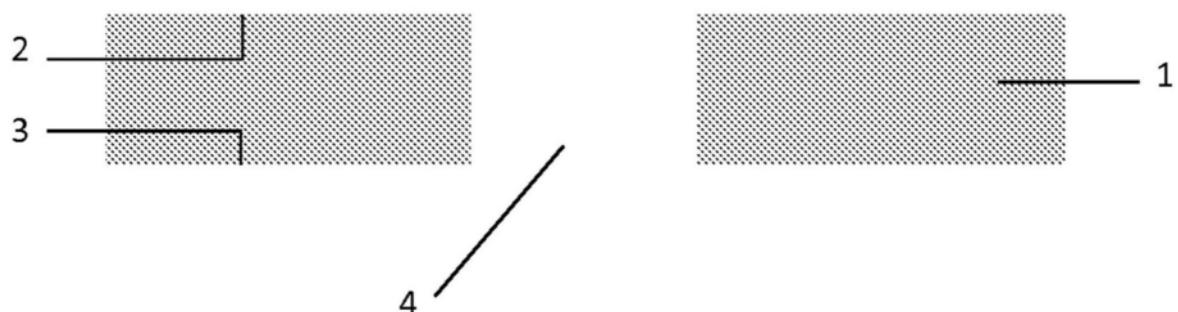


图48

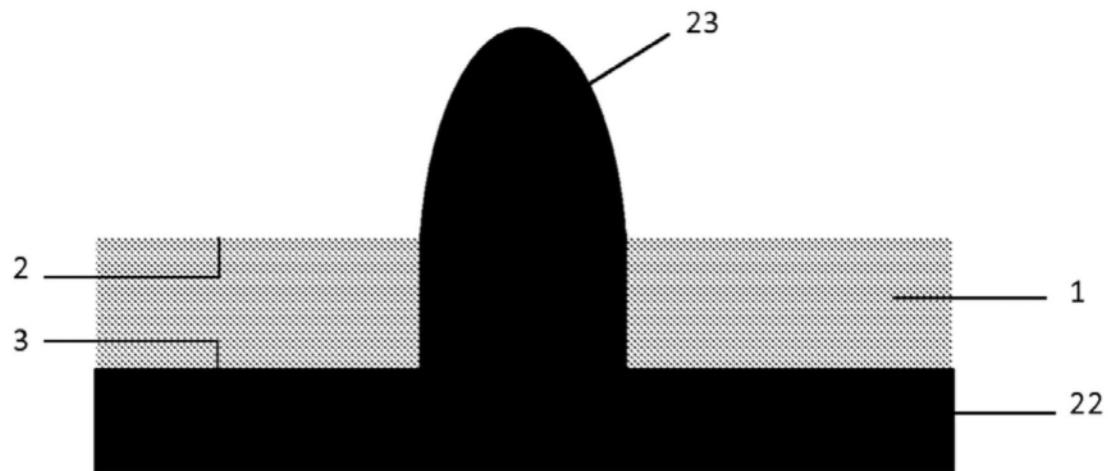


图49

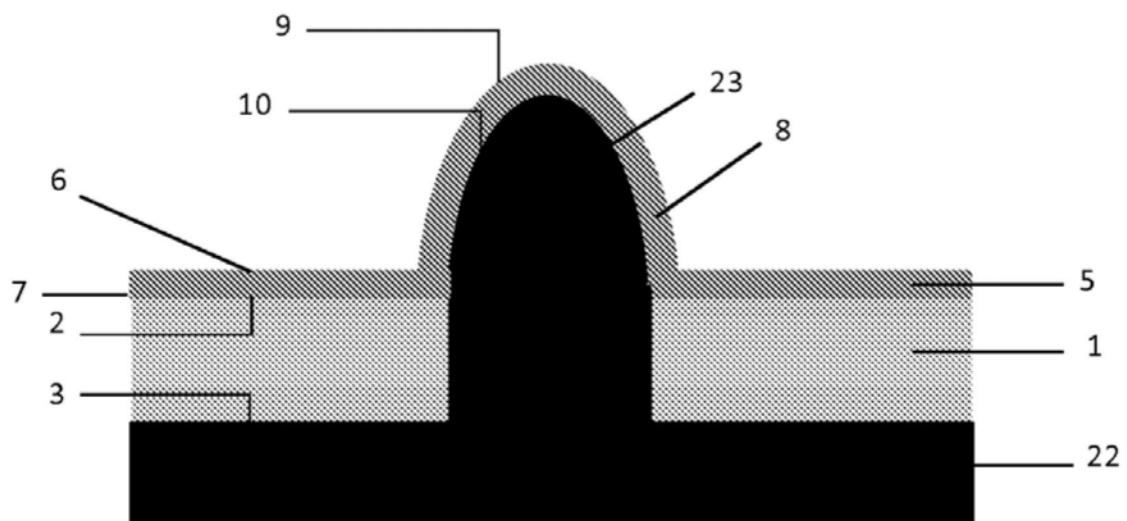


图50

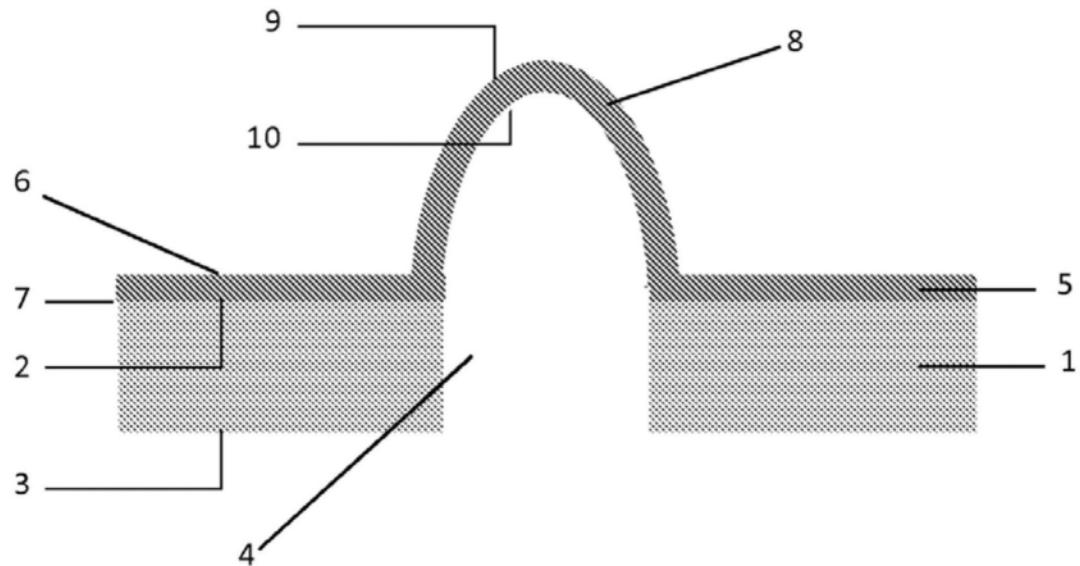


图51

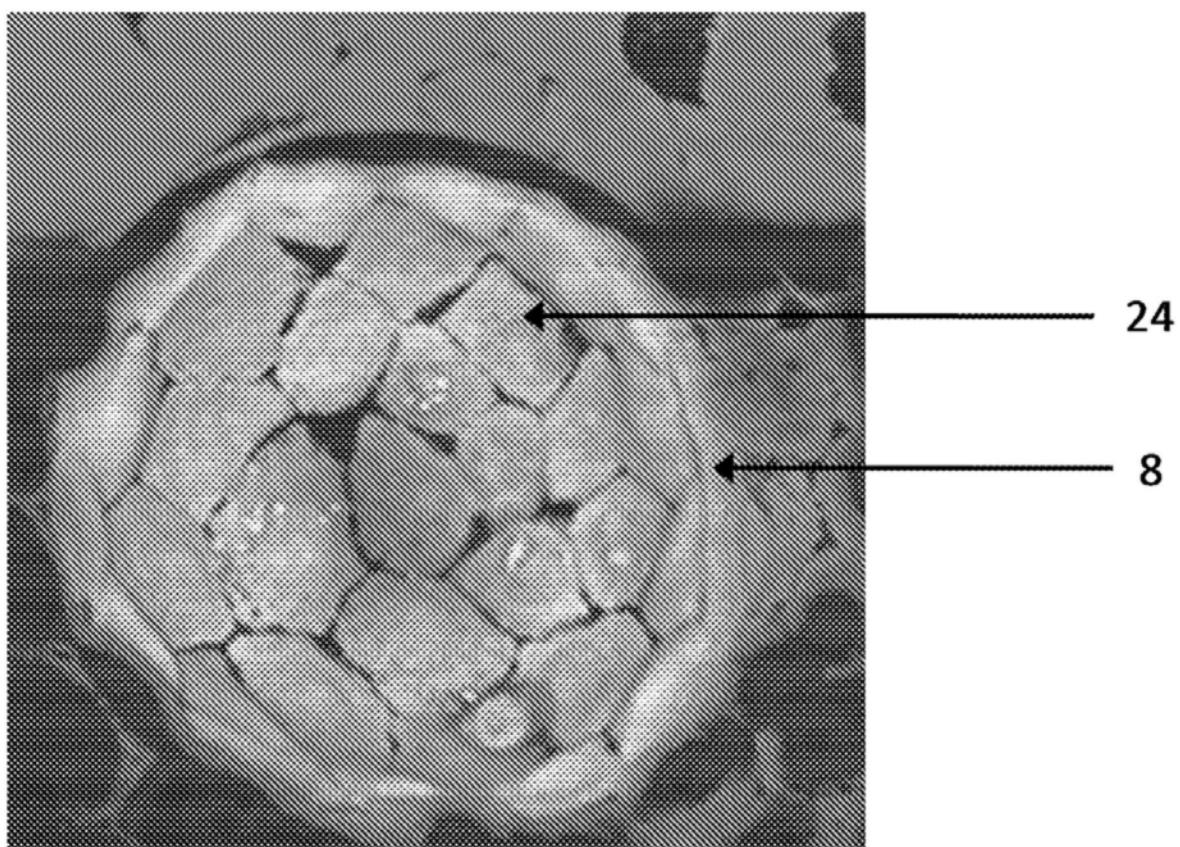


图52

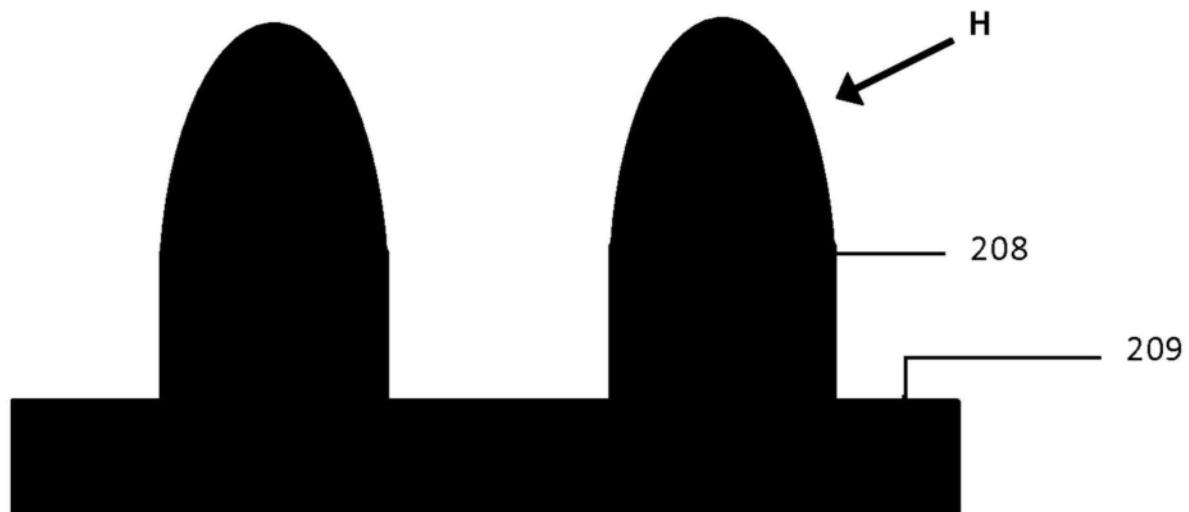


图53

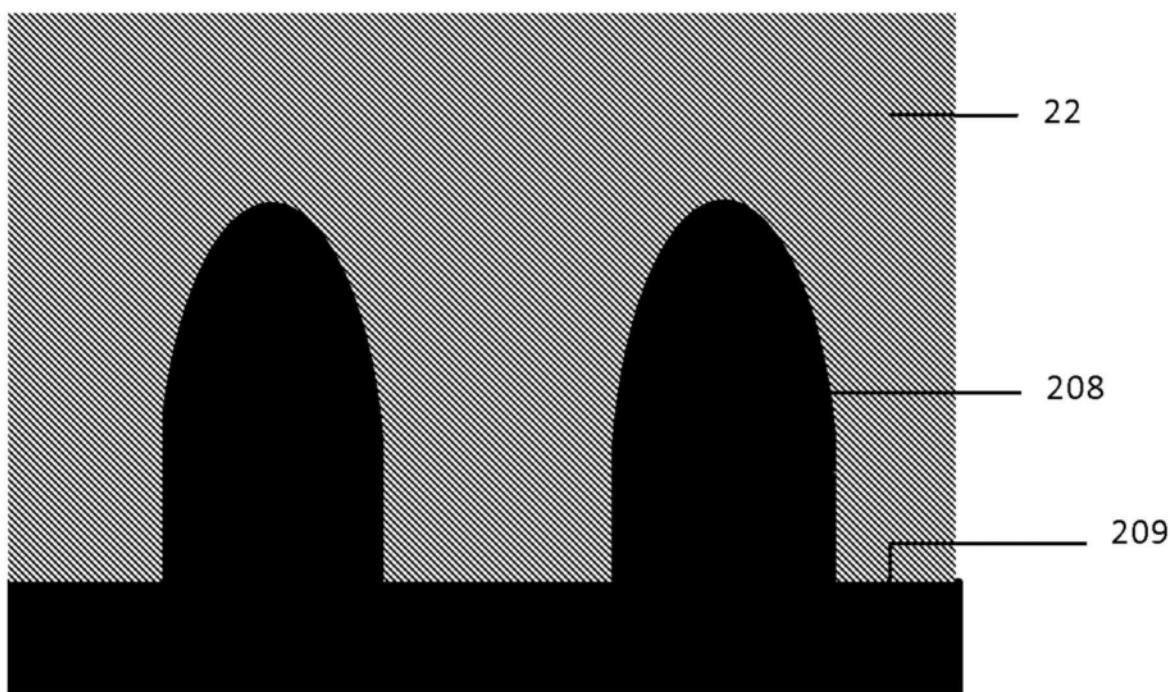


图54

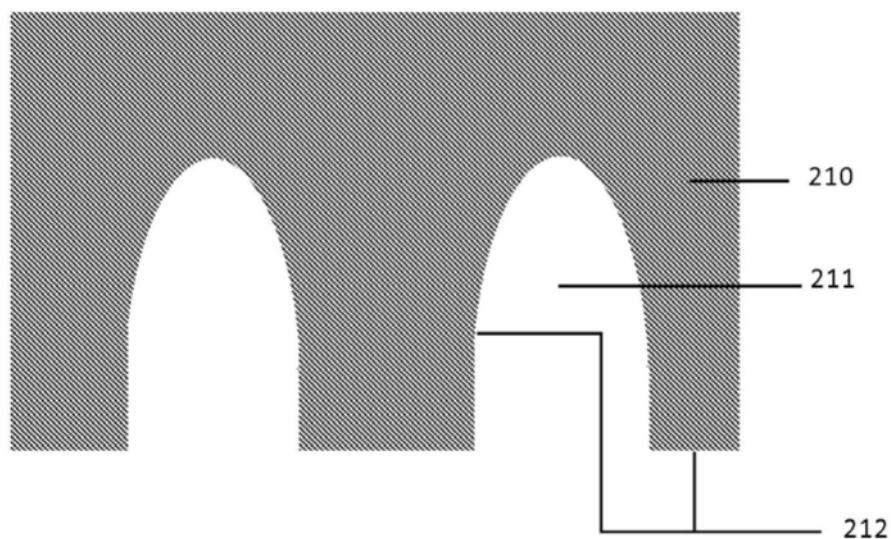


图55

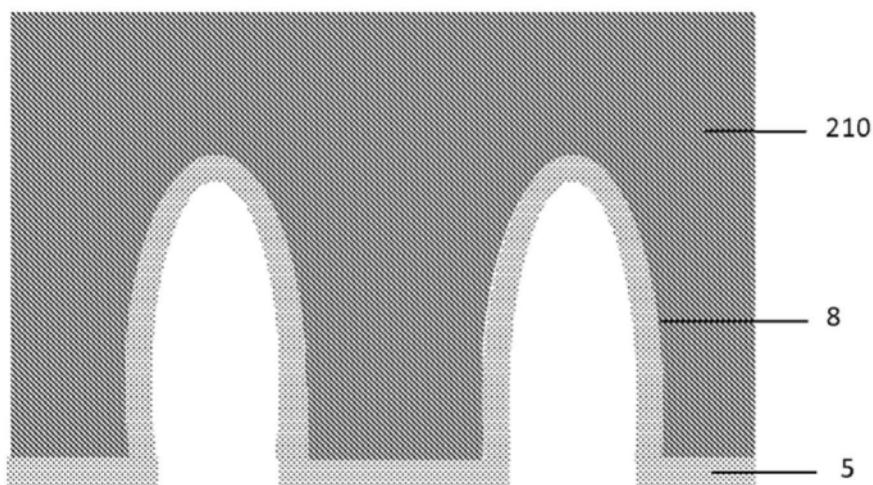


图56

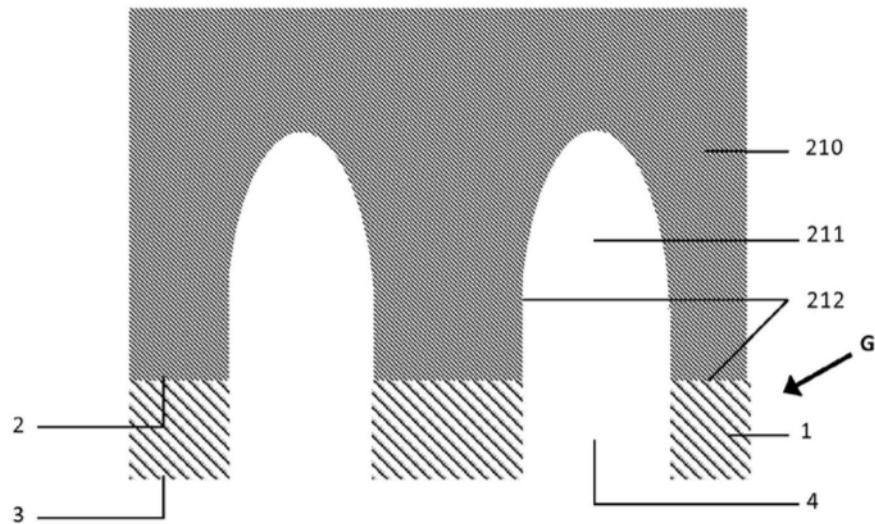


图57

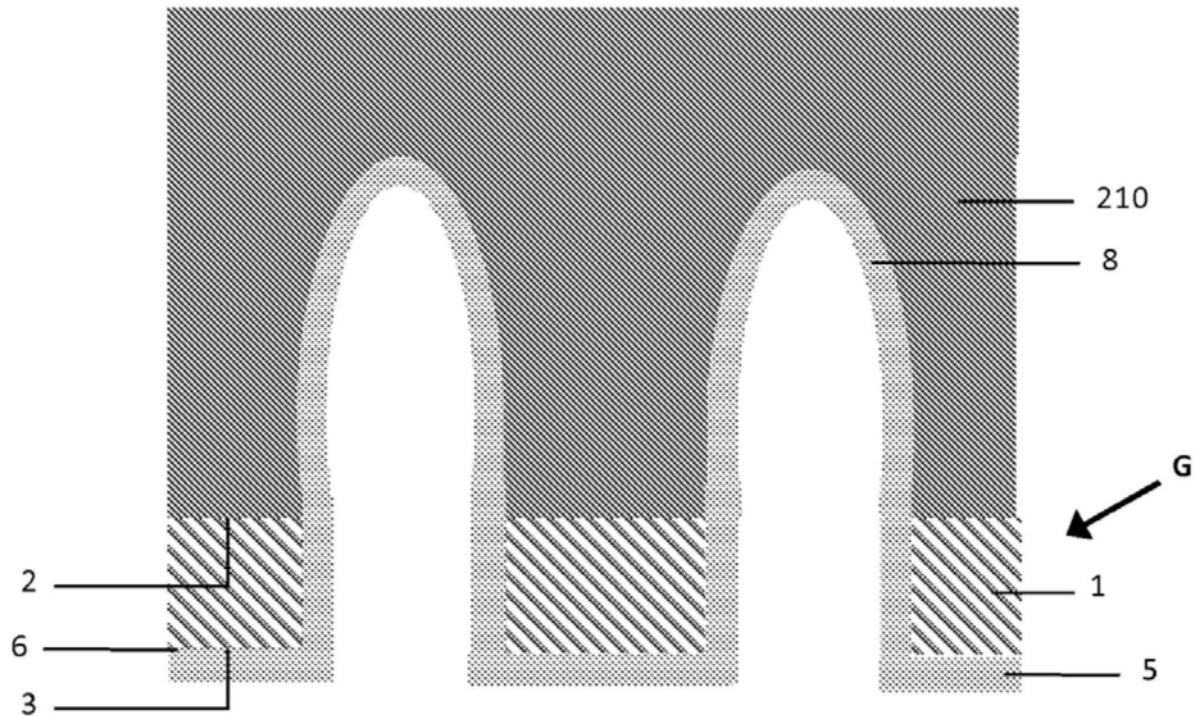


图58

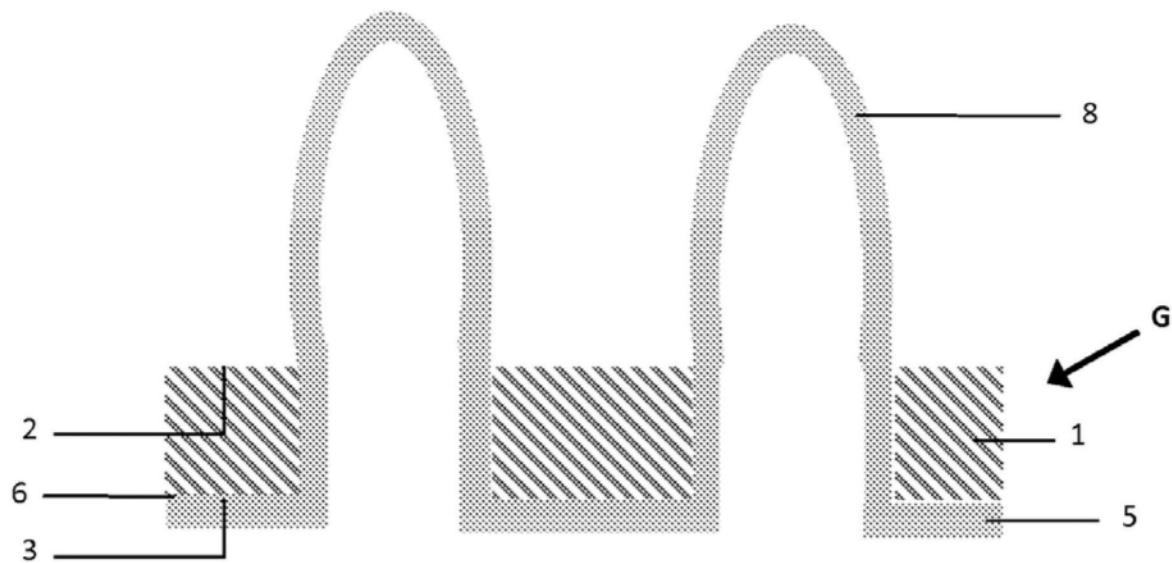


图59

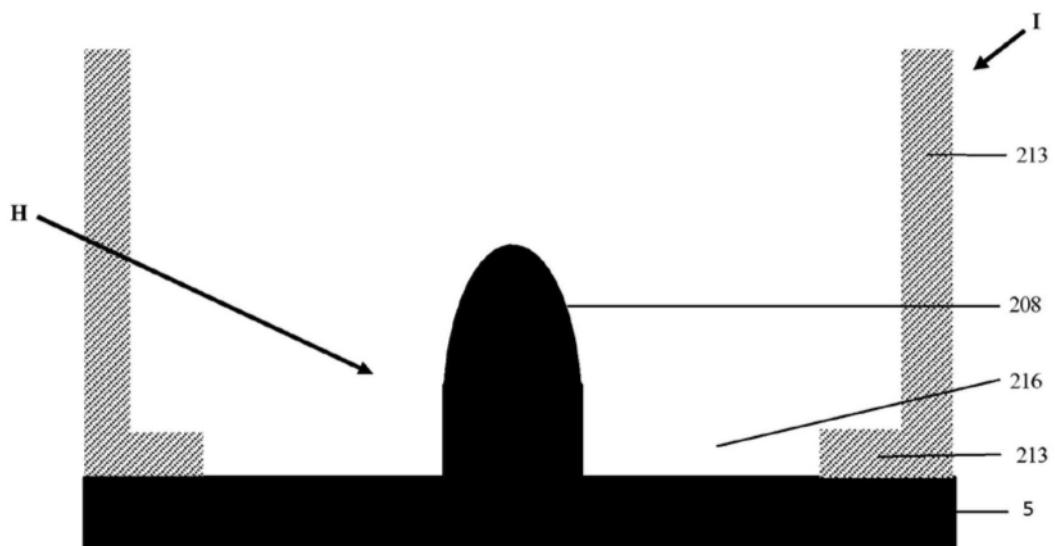


图60

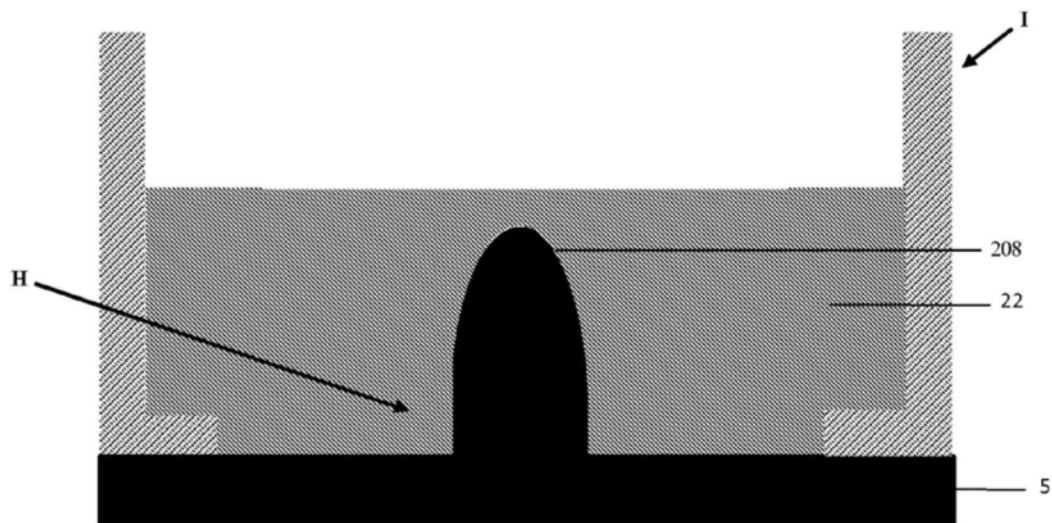


图61

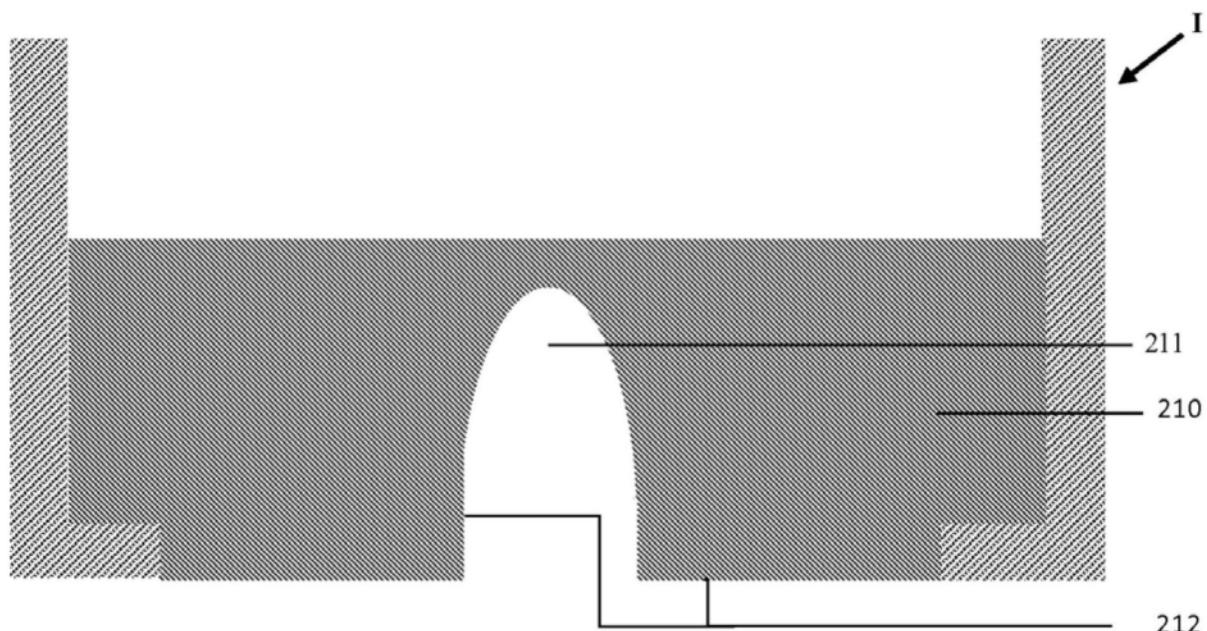


图62

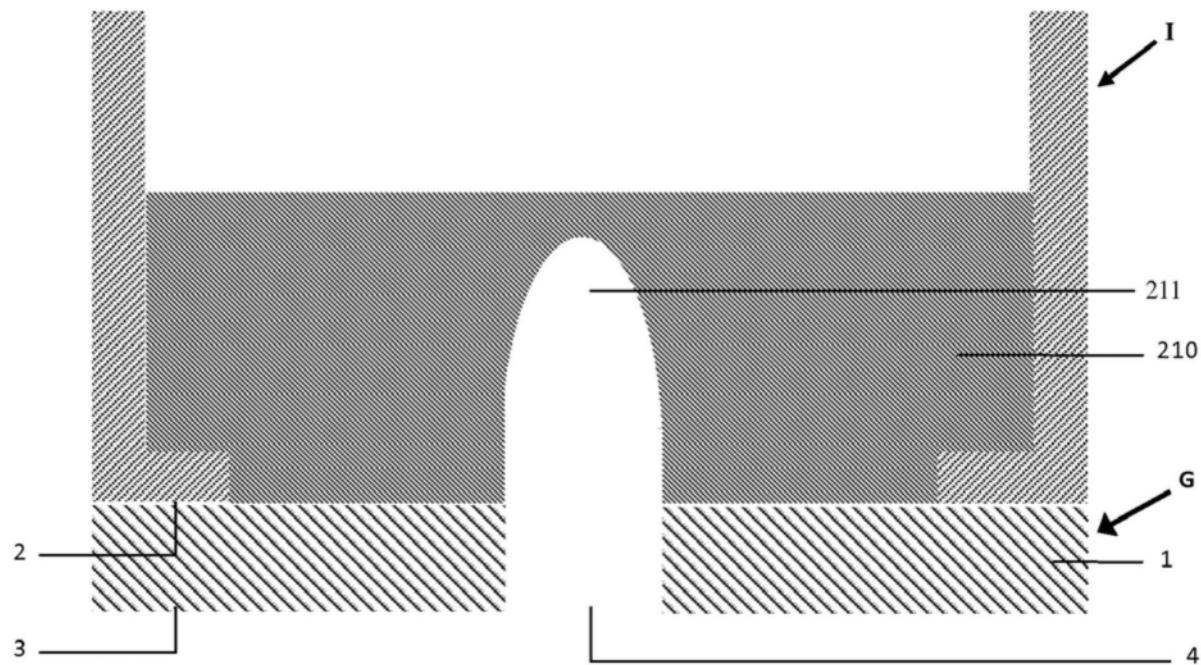


图63

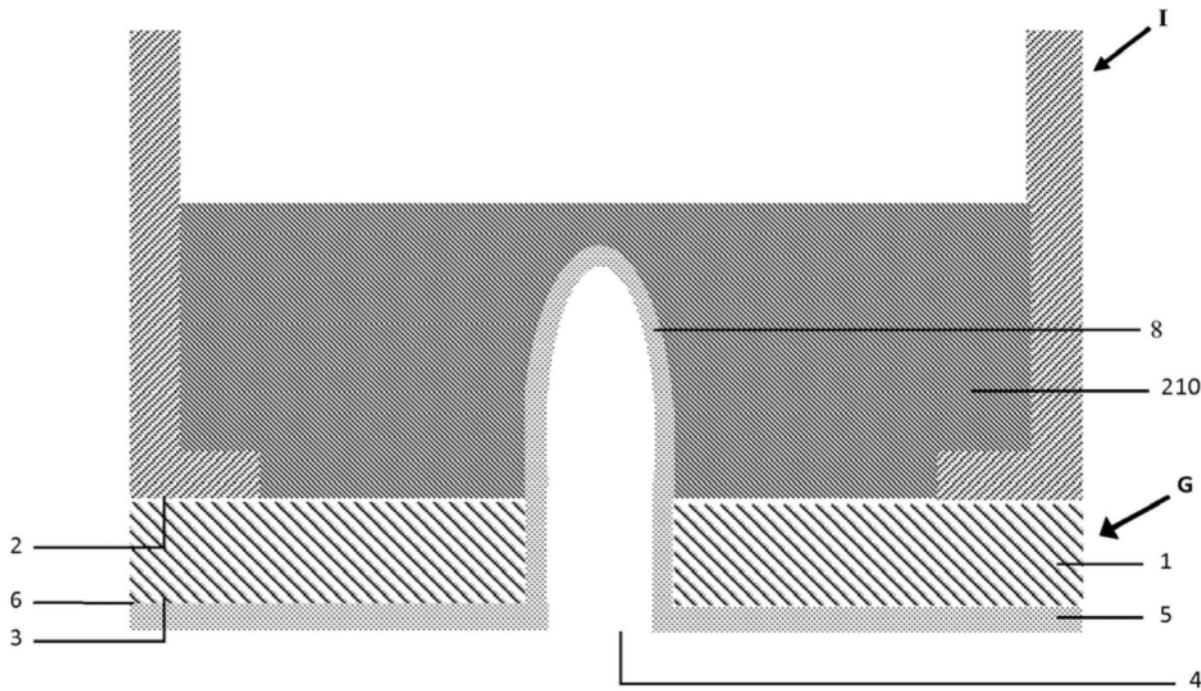


图64

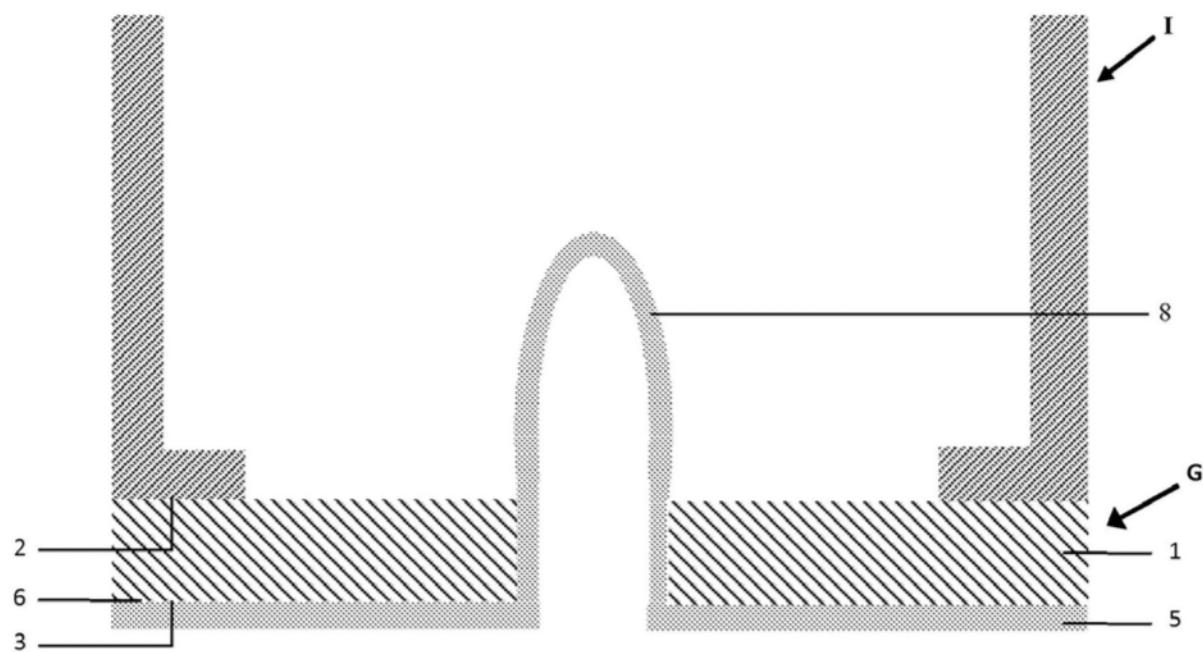


图65

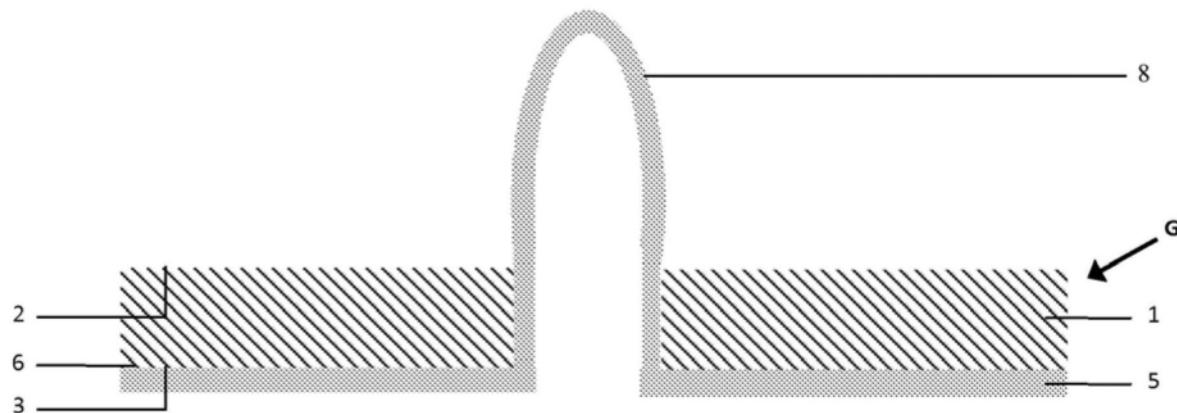


图66

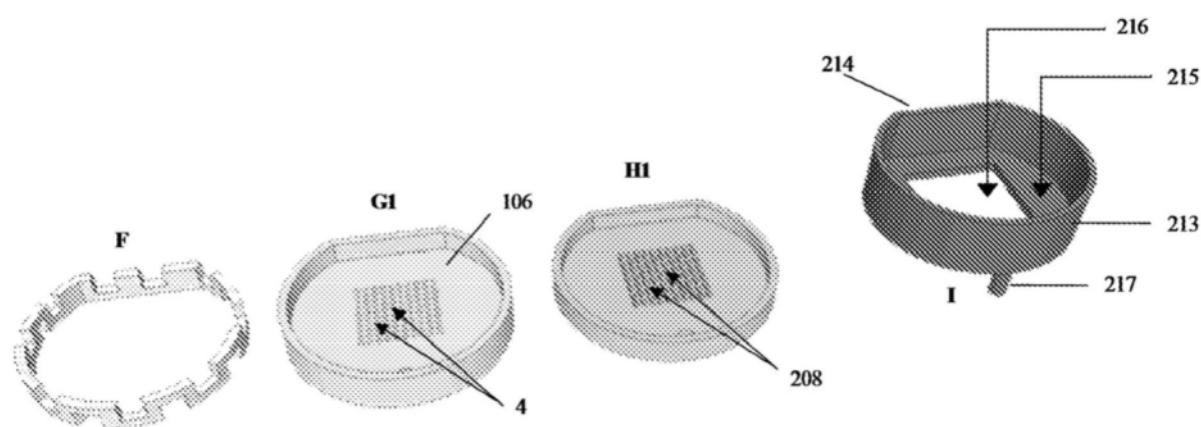


图67

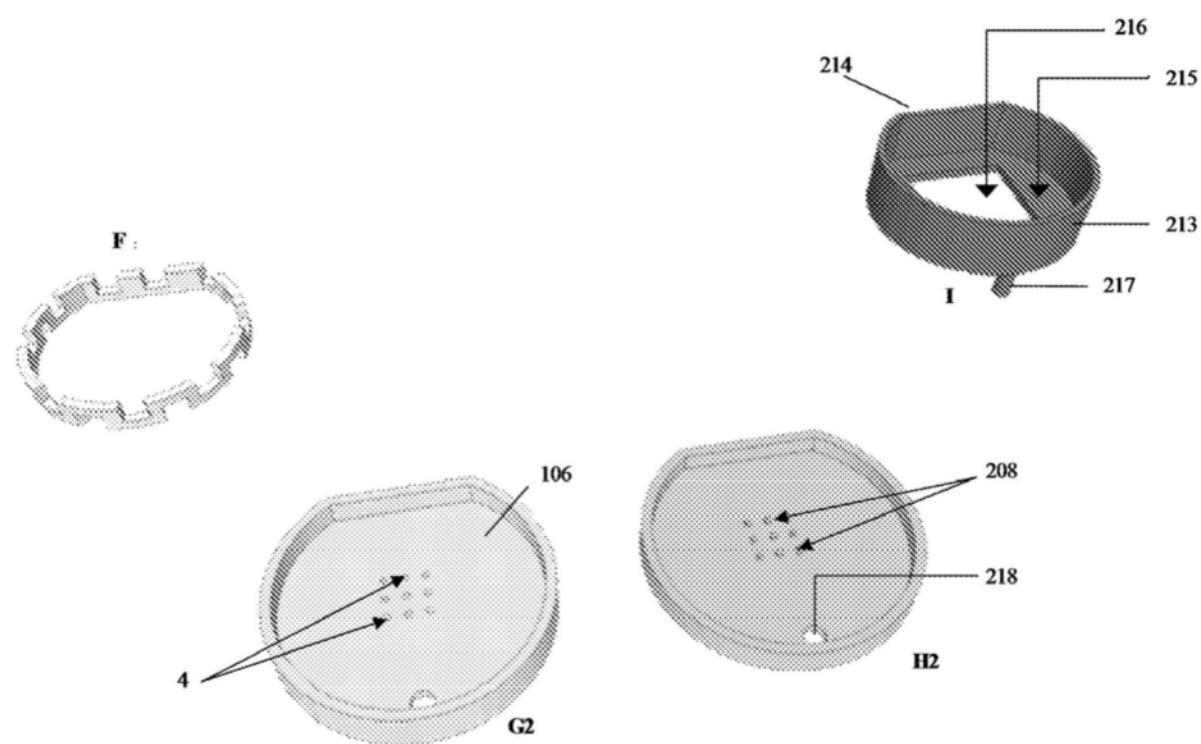


图68

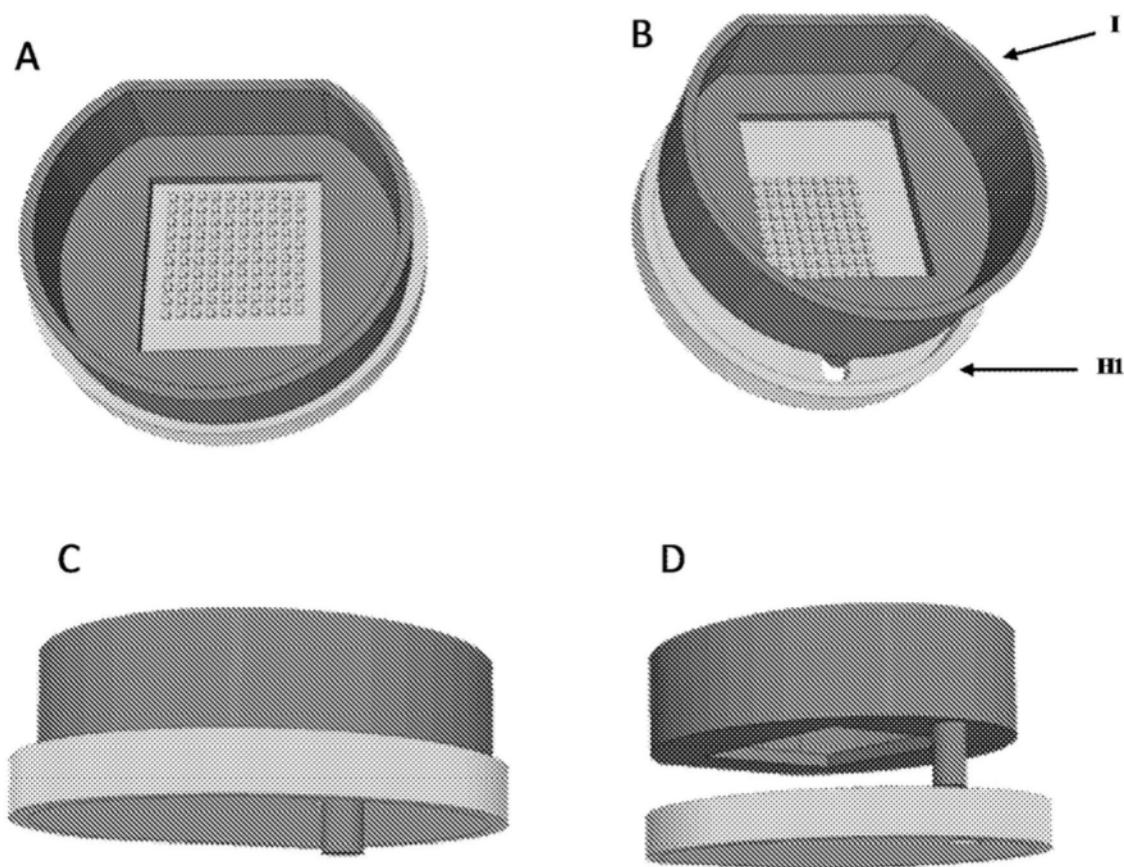


图69

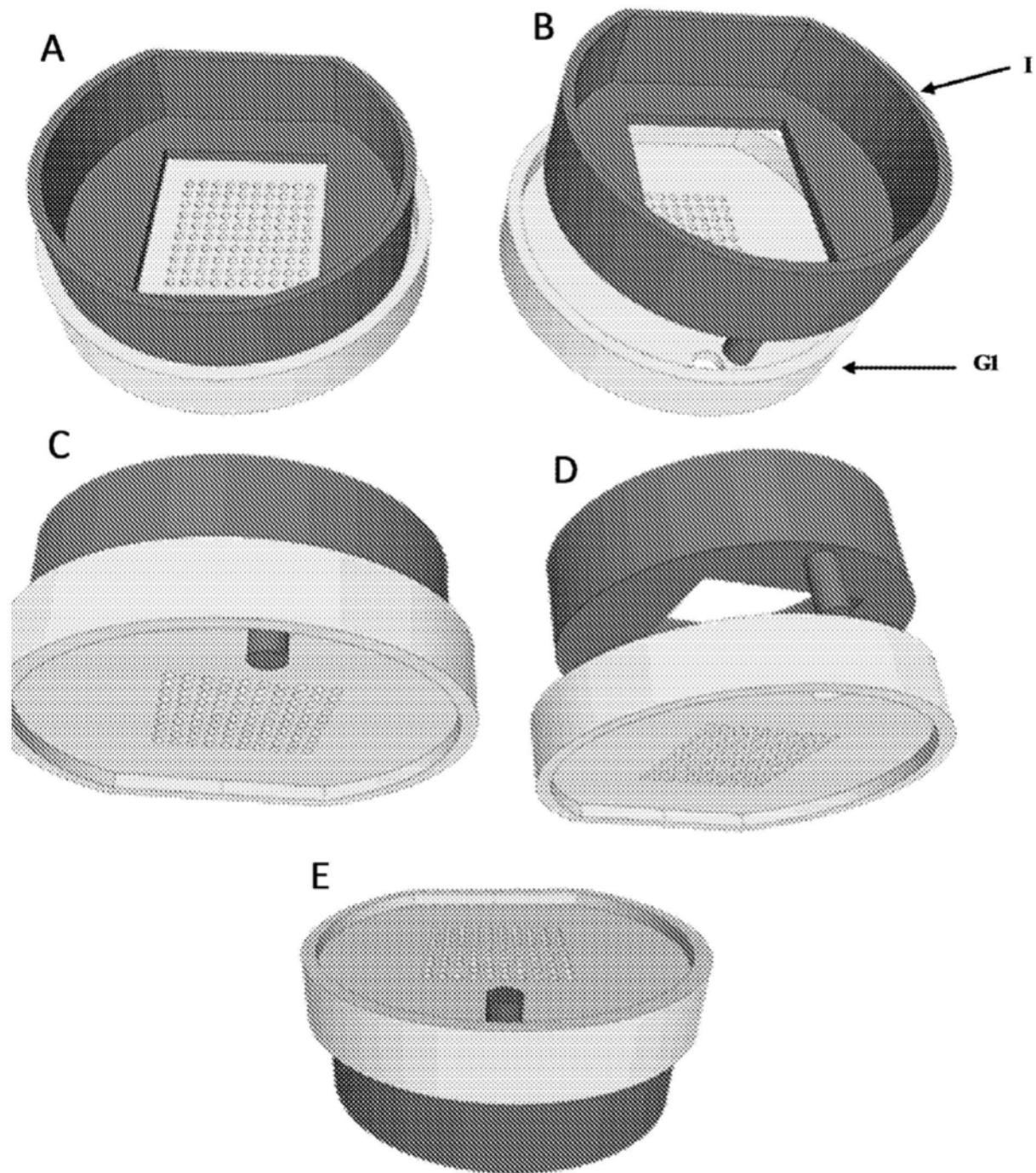


图70

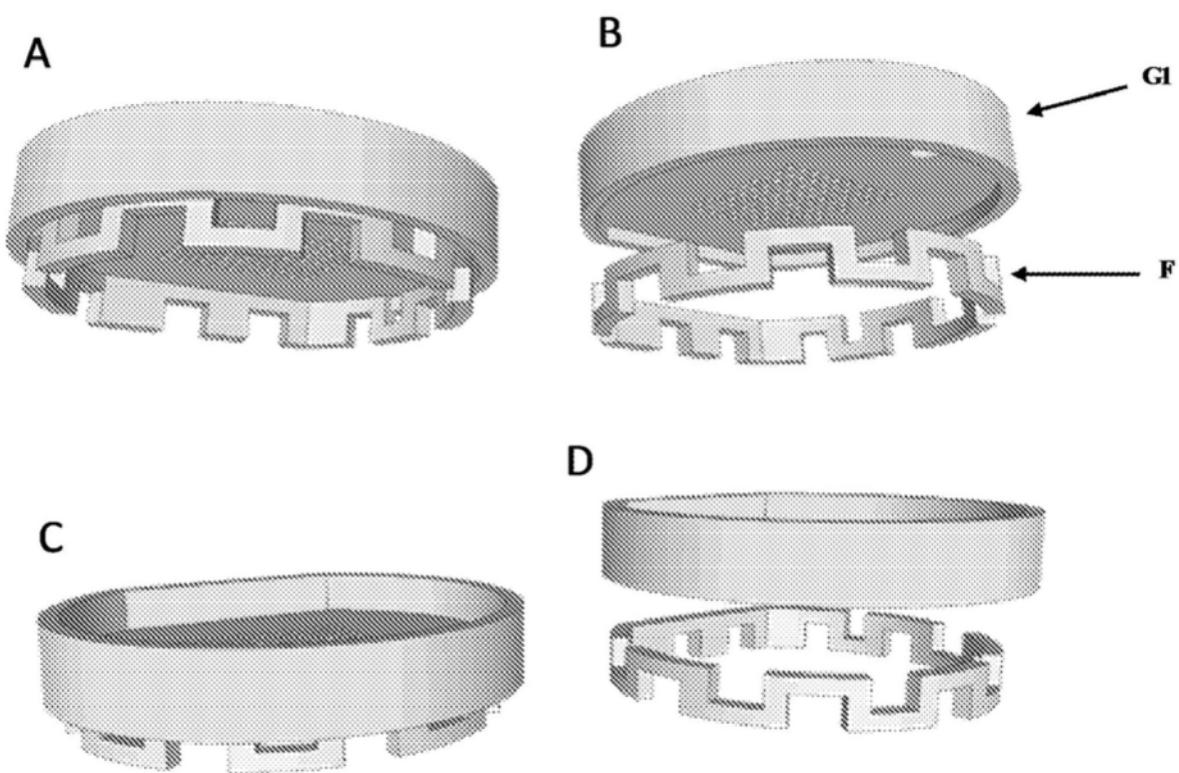


图71

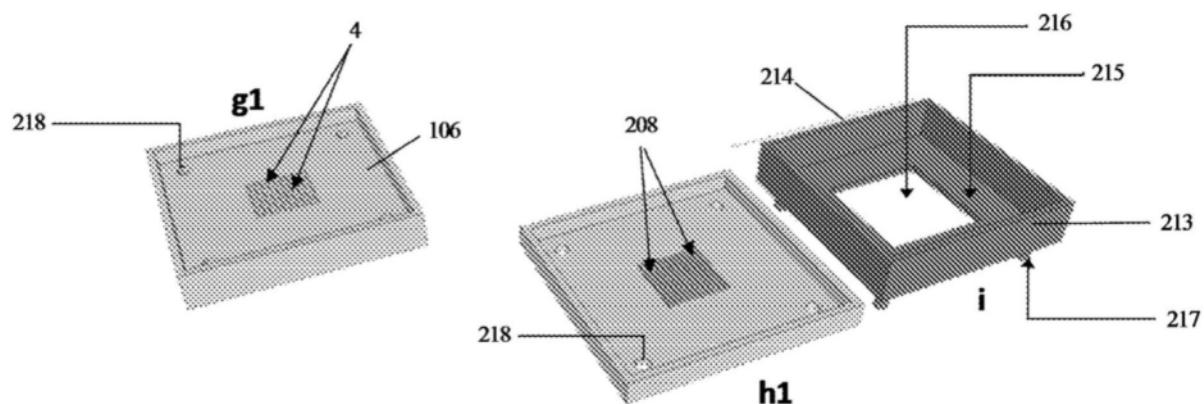


图72

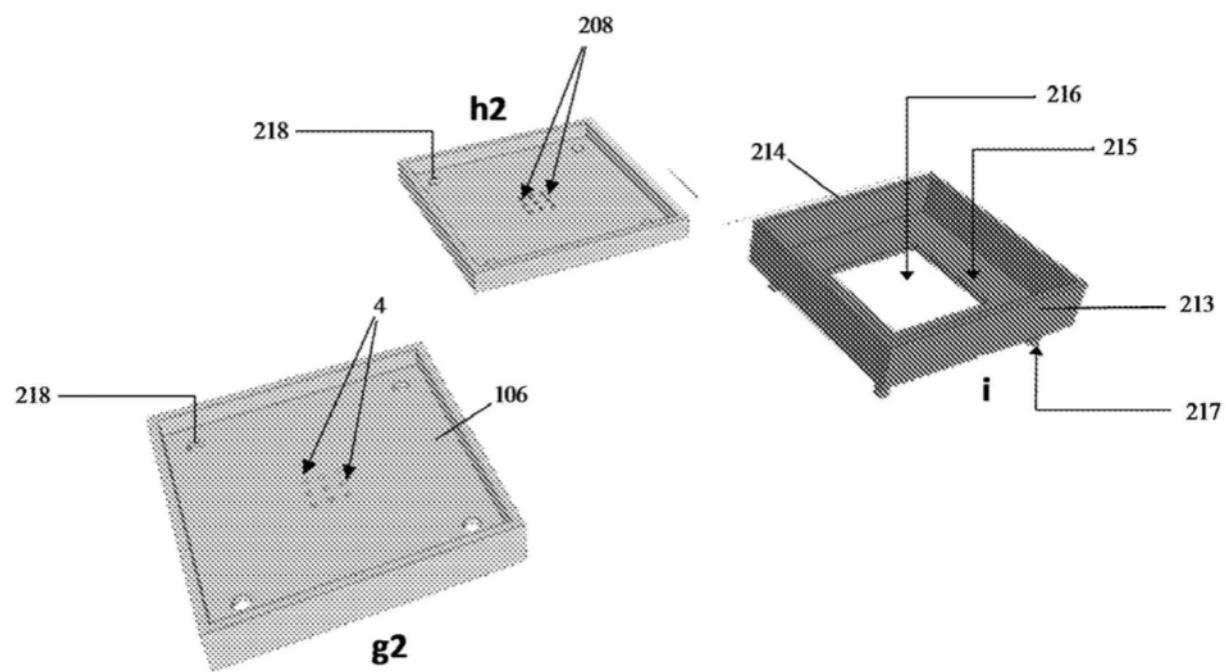


图73