



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104147853 A

(43) 申请公布日 2014. 11. 19

(21) 申请号 201410260357. 3

C12N 5/078 (2010. 01)

(22) 申请日 2014. 03. 17

G01N 33/49 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/48 (2006. 01)

61/794, 468 2013. 03. 15 US

G01N 33/53 (2006. 01)

14/077, 811 2013. 11. 12 US

(71) 申请人 粒子分离技术股份有限公司

地址 美国宾夕法尼亚

(72) 发明人 G·维恰

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 曹珂琼

(51) Int. Cl.

B01D 43/00 (2006. 01)

B01D 49/00 (2006. 01)

B01L 3/00 (2006. 01)

B01J 19/00 (2006. 01)

C12M 1/00 (2006. 01)

C12N 5/09 (2010. 01)

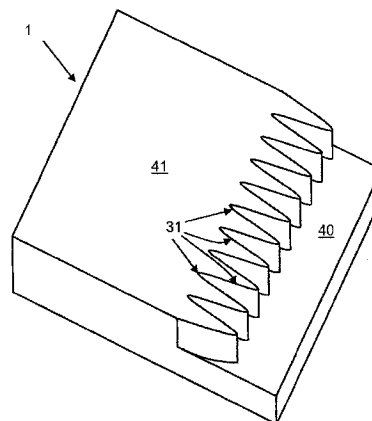
权利要求书3页 说明书14页 附图14页

(54) 发明名称

用设有带长形前导边缘的尺寸差别分离元件的设备隔离颗粒的方法

(57) 摘要

本公开涉及一种基于颗粒流动通过台阶化通道的能力来隔离颗粒的设备。颗粒中的至少一些不能够通过由隔离台阶限定的较狭窄通道,从而将颗粒隔离。设备的至少一个台阶的前导边缘幅宽明显大于该台阶所在通道的总宽度,允许高而快的样本吞吐量。本文所述设备和方法能用于隔离多种类型的颗粒。作为实例,它们能用于将循环肿瘤细胞与人的血液样本隔离。



1. 一种用于将较小的颗粒与较大的颗粒隔离开的设备,所述设备包括:  
本体,和  
盖,在盖和本体之间限定出空隙,该空隙包含  
分离元件,该分离元件将空隙的入口区域与出口区域隔离开,分离元件与空隙表面一起限定出:  
通道,该通道借助分离部而流体地连接入口区域和出口区域,通道具有:  
在分离部处的总宽度;以及  
由分离元件与空隙表面之间的距离限定出的高度,  
本体、盖和分离元件中的至少一者内具有隔离台阶,该隔离台阶布置通道内,并具有基本上完全横跨通道的分离部延伸的前导边缘,由此通道被分成位于前导边缘的入口侧上的上游部分以及位于前导边缘的出口侧上的大致层状的下游部分,  
上游部分的高度足以便于较大的颗粒和较小的颗粒都自此通过,  
下游部分的高度足够地大而便于较小颗粒自此通过且足够地小而抑制较大的颗粒自此通过,并且  
前导边缘的幅宽明显大于通道在分离区域处的总宽度,  
由此,通过让颗粒通行经过通道而能够将颗粒隔离开,并基于颗粒越过隔离台阶的能力来回收颗粒。
2. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,所述通道的上游部分是大致层状的。
3. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘的幅宽为较大的颗粒的特征尺寸的至少 100 倍。
4. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘的幅宽为通道在分离区域处的总宽度的至少 100 倍。
5. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘的幅宽为通道在分离区域处的总宽度的至少 1000 倍。
6. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘的幅宽为通道在分离区域处的总宽度的至少 10000 倍。
7. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,下游部分的高度抑制循环肿瘤细胞自此通过。
8. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,下游部分的高度抑制人的红血细胞自此通过。
9. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,下游部分的高度抑制人的胚胎类干细胞自此通过。
10. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,本体、盖和分离元件中的至少一者具有聚集台阶,该聚集台阶布置在位于分离台阶的入口侧上的通道中,并基本完全横跨该通道延伸,通道在所述聚集台阶的入口侧上的高度比在聚集台阶的出口侧上的高度更大。
11. 根据权利要求 10 所述的设备,其中,聚集台阶大致垂直地横跨通道延伸。
12. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,本体、盖和分离元件中的至少一个具有多个隔离台阶,这些隔离台阶串联地布置在分离部内,每个隔离台阶:
  - a) 具有前导边缘,该前导边缘基本横跨所述分离部延伸,并且该前导边缘具有的幅宽明显大于通道在分离部处的总宽度;和
  - b) 将通道相对于隔离台阶的前导边缘分成上游部分和大致层状的下游部分,通道在紧

随隔离台阶的下游部分处的高度小于通道在隔离台阶紧前的上游部分处的高度。

13. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘具有带角度的形状。

14. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘具有弯曲的形状。

15. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘具有波纹形的形状。

16. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘具有凹入的形状。

17. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,前导边缘具有不规则的形状。

18. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,隔离台阶在其入口侧上具有上游面,该上游面大致垂直于隔离台阶的限定下游部分的部分。

19. 根据权利要求 1 所述的设备,其中,分离元件与本体和盖中的至少一者整合。

20. 根据权利要求 1 所述的设备,进一步包括用于保持通道高度的支撑件,该支撑件布置在通道内,并在分离元件与空隙表面之间延伸。

21. 一种用于将较小的颗粒与较大的颗粒分离开的方法,该方法包括在根据权利要求 1 所述的设备的入口处提供较大和较小颗粒的流体悬浮液,促动该流体通过通道并收集如下的至少一者:

i) 在出口区域处的较小颗粒;以及

ii) 在隔离台阶的前导边缘上游的较大的颗粒。

22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中,较大的颗粒是循环肿瘤细胞,而较小颗粒是血细胞。

23. 根据权利要求 22 所述的方法,其中,血细胞是红血细胞。

24. 一种诊断脊椎动物对象中出现肿瘤的方法,所述方法包括:

向根据权利要求 1 所述的设备的入口区域提供从对象获得的血液样本,其中层状部分的高度小于循环肿瘤细胞的尺寸,

使样本通过设备的通道,

之后检查设备的位于隔离台阶的前导边缘上游的部分以确定细胞的存在,由此至少一个细胞的存在表明在对象中出现了肿瘤。

25. 根据权利要求 24 所述的方法,进一步包括之后对样本通行经过通道后存在于隔离台阶的前导边缘上游的至少一种细胞执行诊断测试,确定肿瘤细胞的特性。

26. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,诊断测试与组织特有抗体结合。

27. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,诊断测试与肿瘤特有抗体结合。

28. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,诊断测试包括对从存在于前导边缘上游的至少一个细胞获得的核酸进行分析。

29. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,诊断测试是确定细胞的增殖能力。

30. 根据权利要求 25 所述的方法,其中,诊断测试是对细胞的形态学进行微观观察。

31. 一种确定对患有肿瘤的对象进行的肿瘤治疗的功效的方法,该方法包括利用根据权利要求 22 所述的方法从治疗之前和之后的对象获得的血液样本隔离出循环肿瘤细胞,并对与从样本隔离的循环肿瘤细胞的至少一个特性进行比对,由此,在从血液样本隔离的循环肿瘤细胞的特性方面的差别指示出治疗的功效。

32. 根据权利要求 31 所述的方法,其中所述特性是样本中的循环肿瘤细胞浓度。

33. 一种降低脊椎动物对象中的循环肿瘤细胞载量的方法,所述方法包括:

在根据权利要求 1 所述的设备的入口处提供从对象获得的血液,其中层状部分的高度小于循环肿瘤细胞的尺寸,

促使血液通行经过通道以减少血液中的循环肿瘤细胞,

在出口区域处收集循环肿瘤细胞减少的血液,以及

将循环肿瘤细胞减少的血液返回至对象。

## 用设有带长形前导边缘的尺寸差别分离元件的设备隔离颗粒的方法

### 背景技术

[0001] 预期用于处操纵生物细胞和其它小颗粒并具有从数十微米（生物细胞尺寸）到数纳米（某些生物大分子尺寸）的尺寸范围的结构元件的机械装置已被描述。例如，US 专利 No. 5928880、US 专利 No. 5866345、US 专利 No. 5744366、US 专利 No. 5486335 和 US 专利 No. 5427946 描述了用于处理细胞和生物分子的装置。PCT 申请公布 No. W003/008931 描述了一种用于颗粒和细胞分离、识别、分类和操纵的微型结构。

[0002] US 专利 No. 7993908 描述了一种用于将细胞和其它颗粒基于其尺寸进行分离的微型设备。该专利中描述的设备包括阶梯式分离元件，该阶梯式分离元件插置在由盖和本体形成的空隙的两个区域之间，并且通过最初存在于一个区域中的颗粒越过该阶梯式分离元件到达另一区域的能力来控制该设备内的颗粒分离。本文公开的主题被认为是对此设备的改进。

[0003] 此处公开的主题能用于从颗粒或者细胞的混合群体将生物细胞、细胞器、细胞团和其它颗粒隔离并处理。

### 发明内容

[0004] 本公开涉及一种用于隔离较小和较大颗粒的设备。该设备包括本体和盖，在该本体和盖之间限定出空隙。该空隙包含分离元件，该分离元件隔离出空隙的入口区域和出口区域。该分离元件与空隙的一个或多个表面一起限定出通道，该通道经由分离部而与入口区域和出口区域流体地连接。该通道具有在分离部处的总宽度，并具有由分离元件与空隙的表面之间的距离限定的高度。本体、盖和分离元件中的至少一者内布置有隔离台阶，该隔离台阶具有基本上完全横跨通道的分离部延伸的前导边缘（leading edge）。该通道分成位于前导边缘的入口侧上的上游部分和位于前导边缘的出口侧上的大致层状的下游部分。该上游部分的高度足以便于较大和较小颗粒自此通过。该下游部分的高度足够地大以易于较小颗粒自此通过，但又足够地小以抑制较大颗粒自此通过。前导边缘的幅宽明显大于通道在分离区域处的总宽度（其通常与隔离台阶的宽度相同，这意味着隔离台阶的前导边缘通常比该台阶的宽度长）。通过使颗粒通过该通道能将所述颗粒隔离，并基于壳体穿越隔离台阶的能力来回收颗粒。

[0005] 在一个实施例中，通道的上游部分是大致层状的，意味着它由彼此大致平行的两个宽表面限定。

[0006] 前导边缘的幅宽会明显地（例如至少为 100 倍）大于较大颗粒的特征尺寸，从而能够在不显著阻止经过前导边缘的总流体流的情况下将许多这样的颗粒捕获在该前导边缘处。前导边缘的幅宽也会明显地（例如至少 1.5、2、3、4、5、10、20、50、100、500、1000、10000 或 100000 倍）大于通道在分离区域处的总宽度（或者隔离台阶在通道内的宽度）。作为实例，下游部分的高度（即，隔离台阶的前导边缘的通道的一部分）可以经选择成使得它足够小以抑制选定细胞类型（例如，循环肿瘤细胞或人类胚胎类干细胞）自此通过，但又足

够大以不会抑制选定细胞类型（例如，人类红血细胞）自此通过，或者这些的组合。

[0007] 任意隔离台阶的前导边缘可以具有角形的、弯曲的、波状的、凹入的或不规则的形状。隔离台阶在其入口侧上可以具有上游面，该上游面大致垂直于台阶的限定出通道下游部分的部分。

[0008] 分离元件能与本体和盖中的至少一者整合。它也可以是插置在本体与盖之间的单独物件。装置可以具有一个或更多个用于保持通道高度的支撑件。这些支撑件可以布置在通道内并例如在分离元件与空隙的表面之间延伸。

[0009] 本公开还涉及将较大和较小颗粒隔离的方法。这些方法包括在本文描述的设备的入口处提供较大和较小颗粒的流体悬浮液。流体被促动经过通道，并且人们可以至少收集以下的至少之一：i) 出口区域处的较小颗粒（例如，红血细胞），和 ii) 在隔离台阶的前导边缘上游的较大颗粒（例如，循环肿瘤细胞）。

[0010] 本公开还涉及诊断脊椎动物对象体内出现肿瘤的方法。这些方法包括如下步骤：i) 向本文所描述设备的入口区域提供从该对象获得的血液样本（通道下游部分的层状部的高度小于 CTC 的尺寸），使该样本通过设备的通道，之后检查在该设备的位于隔离台阶的前导边缘上游的部分，看是否存在细胞。至少一种细胞的存在表明在该对象中出现了肿瘤。此后，对于在使样本通过通道之后存在于隔离台阶的前导边缘上游的至少一种细胞，可以使用一个或更多个诊断测试来评估肿瘤细胞的特性。这些测试的实例包括：使细胞或其提取物与组织特有或肿瘤特有的抗体结合、对从存在于前导边缘上游的这种细胞获得的核酸进行分析或者确定细胞的增殖能力。

[0011] 本公开进一步涉及用于对患有肿瘤的对象肿瘤治疗功效加以评估的方法。这些方法包括在治疗之前和之后使用本文所描述的方法将 CTC 与从对象获得的血液样本隔离。在样本之间比较与样本隔离的 CTC 的至少一个特性。与血液样本隔离的 CTC 特性（例如，CTC 浓度或数量）的差别是对治疗功效的指示。

[0012] 本公开还涉及用于降低脊椎动物对象中的 CTC 负荷的方法。这些方法包括如下步骤：i) 在本文所描述设备的入口处提供从该对象获得的血液（其中通道下游部分的层状部的高度小于 CTC 的尺寸），ii) 促使血液通过通道以减少血液中的 CTC，iii) 在出口区域处收集 CTC 减少后的血液，以及 iv) 将 CTC 减少后的血液返回到该对象。

## 附图说明

[0013] 本发明的上文概述以及下文的详细描述在结合附图阅读时将得以更好地理解。引入这些附图是为了对本公开进行说明。本公开不限于所示出的具体配置和器件。

[0014] 图 1 由图 1A、图 1B、图 1C 和图 1D 组成，并示出了现有技术的分离元件 1，该分离元件 1 具有两个整合的、矩形的平板状台阶，包括聚集台阶 10 和隔离台阶 11。具有此类分离元件的装置例如在 US 专利 No. 7993908 中公开。图 1A 是该分离元件 1 的正视图，其中可以看到聚集台阶 10 的矩形形状的面 20 邻近其宽面 40，而隔离台阶 11 的矩形形状的面 21 邻近其宽面 41。图 1B 是图 1A 所示的分离元件 1 的侧视图，显示了聚集台阶与隔离台阶（分别是 10 和 11）之间的高度差。图 1C 是图 1A 和图 1B 所示的分离元件 1 的正交视图。图 1D 是分离元件 1 的剖视图，该分离元件 1 布置在本文所述设备的盖 4 与本体 2 之间的间隙所限定的流体通道中。在图 1D 中显示了该流体通道的下游部分的高度 ( $h_1$ )、流体通道的上游

部分的高度 ( $h_0$ ) 以及流体通道自身的高度 ( $h_c$ )。该下游部分的高度 ( $h_1$ ) 由隔离台阶 11 与盖 4 之间的距离限定, 而该上游部分的高度 ( $h_0$ ) 由聚集台阶 10 与盖 4 之间的距离限定。

[0015] 图 2 由图 2A、图 2B 和图 2C 组成, 并示出了分离元件 1, 该分离元件 1 具有矩形的平板状聚集台阶 10, 以及具有平板形状但具有波状面 21 和前导边缘 31 的隔离台阶 11。图 2A 是该分离元件 1 的正视图, 其中可以看到隔离台阶 11 的波形面 21 邻近其宽面 41。图 2B 是图 2A 所示分离元件 1 的侧视图, 显示了聚集台阶和隔离台阶 (分别是 10 和 11) 之间的高度差。图 2C 是图 2A 和图 2B 所示分离元件 1 的正交视图。

[0016] 图 3 由图 3A、图 3B 和图 3C 组成, 并示出了分离元件 1, 该分离元件 1 具有矩形的平板状聚集台阶 10 以及具有平板形状但具有不规则面和前导边缘的隔离台阶 11。图 3A 是分离元件 1 的正视图, 其中可以看到聚集台阶 10 的矩形形状的面邻近其宽面 40, 而隔离台阶 11 的不规则形状的面邻近其宽面 41。图 3B 是图 3A 所示分离元件 1 的侧视图, 显示了聚集台阶与隔离台阶 (分别是 10 和 11) 之间的高度差。图 3C 是图 3A 和图 3B 所示分离元件 1 的正交视图。

[0017] 图 4 由图 4A、图 4B 和图 4C 组成, 并示出了分离元件 1, 该分离元件 1 具有: 矩形的聚集台阶 10; 以及在聚集台阶 10 顶上、位于其前导边缘下游 (相对于 BFF) 的三个台阶。第一隔离台阶 11、第二隔离台阶 12 和第三隔离台阶 13 中的每一个具有人字形前导边缘 (分别为前导边缘 31、前导边缘 32 和前导边缘 33)。总的流体流 BFF 方向被示出。图 4A 是分离元件 1 的正视图。图 4B 是图 4A 所示分离元件 1 的侧视图, 显示了台阶之间的高度差。分离元件 1 的位于台阶 11-13 下游的凹进部分形成了出口通道的一部分, 已越过所有台阶 10-13 的材料能通过该出口通道被从分离元件 1 带走。图 4C 是分离元件 1 的剖视图, 该分离元件 1 布置在由本文所述设备的盖 4 与本体 2 之间的间隙所限定的流体通道中。图 4C 中显示了该流体通道的连续下游部分的高度 (分别为  $h_3$ 、 $h_2$  和  $h_1$ )、流体通道的上游部分的高度 ( $h_0$ ) 以及流体通道自身的高度 ( $h_c$ )。第三下游部分的高度 ( $h_3$ ) 由第三隔离台阶 13 与盖 4 之间的距离限定。第二下游部分的高度 ( $h_2$ ) 由第二隔离台阶 12 与盖 4 之间的距离限定。第一下游部分的高度 ( $h_1$ ) 由第一隔离台阶 11 与盖 4 之间的距离限定。该上游部分的高度 ( $h_0$ ) 由聚集台阶 10 与盖 4 之间的距离限定。

[0018] 图 5 由图 5A 和图 5B 组成, 并示出了分离元件 1, 该分离元件 1 具有: 聚集台阶 10, 该聚集台阶 10 具有完全横跨分离元件 1 延伸的曲形过渡面 20; 以及在聚集台阶 10 顶上且位于其下游 (相对于 BFF) 的三个隔离台阶。第一隔离台阶 11、第二隔离台阶 12 和第三隔离台阶 13 中的每一个具有曲形前导边缘, 意味着隔离台阶 11-13 中的每一个的前导边缘的幅宽大于其宽度 (与聚集台阶 10 的前导边缘 30 的长度不同, 该长度等于其宽度)。总的流体流 BFF 方向被示出。图 5A 是分离元件 1 的正视图。图 5B 是图 5A 所示分离元件 1 的侧视图, 显示了台阶之间的高度差。分离元件 1 的位于台阶 10-13 下游的凹进部形成了出口通道的一部分, 已越过所有台阶 10-13 的材料能通过该出口通道从分离元件 1 带走。

[0019] 图 6 由图 6A 和图 6B 组成, 并示出了分离元件 1, 该分离元件 1 具有: 矩形聚集台阶 10; 以及在聚集台阶 10 顶上且位于其前导边缘下游 (相对于 BFF) 的三个隔离台阶。第一隔离台阶 11、第二隔离台阶 12 和第三隔离台阶 13 中的每一个具有蛇形前导边缘。总的流体流 BFF 方向被示出。图 6A 是分离元件 1 的正视图。图 6B 是图 6A 中所示的分离元件 1 的侧视图, 显示了台阶之间的高度差。

[0020] 图 7 由图 7A、图 7B、图 7C 和图 7D 组成（其相对于彼此近以按比例绘制），并示出了由粗实线指示的流体通道中的具有相等幅宽（ $B$ ，等于通道宽度的 5 倍）的四种台阶构造。总流体流（BFF）的方向被示出，台阶高度从台阶的上游侧向下游侧增加，这通过图中横跨流体通道延伸的线示出。在图 7A 中，台阶高度在相对上游位置处横跨一半流体通道升高，而在相对下游位置处横跨该流体通道的另一半升高，台阶面在这两个位置之间延伸。图 7A 中，该延伸的台阶面的长度（ $L$ ）等于流体通道的宽度（ $W$ ）的四倍，使得台阶的总  $B$  等于  $5W$ 。在图 7B 中，台阶具有两个在上游位置与下游位置之间延伸的部分。尽管在 BFF 方向上的台阶面延伸部的长度为仅  $2W$ ，但是具有两个此延伸部。由此图 7B 中的面的总幅宽是  $2 \times 2W + W$ ，或者说  $5W$ 。类似地，图 7C 所示台阶具有三个在上游位置与下游位置之间延伸的部分（即，四个长度为  $W$  的台阶面延伸部），呈现出  $4 \times W + W$ ，或者说  $5W$  的  $B$ 。图 7D 所示台阶具有五个在上游位置与下游位置之间延伸的部分（即，八个长度为  $W/2$  的台阶面延伸部），呈现出  $8 \times W/2 + W$ ，或者说  $5W$  的  $B$ 。值得注意的是，具有相等  $B$  的台阶的  $L$  随着凹入台阶的增加而减小。这说明台阶的颗粒分离功能的微型化能够通过增加台阶面的复杂度（ $B/L$ ）来实现。

[0021] 图 8 是本文所述颗粒隔离设备的实施例，该设备被构造成具有近似等于普通显微镜载玻片的尺寸。入口区域 52 和出口区域 58 被显示，通道的分离部 55 在入口区域 52 与出口区域 58 之间延伸。

[0022] 图 9 是用本文所述隔离设备捕获的 PC3 前列腺癌细胞的放大影像。在该影像中能看到细胞位于第一隔离台阶 11 和第二隔离台阶 12 上或上游（在图中总流体流从左向右），而在聚集台阶 10 上不存在或几乎不存在细胞。

[0023] 图 10 由图 10A 和图 10B 组成。这些图中的每一个是用本文所述隔离设备捕获的 PC3 前列腺癌细胞的放大影像。在每个影像中能看到细胞位于第一隔离台阶 11、第二隔离台阶 12 和第三隔离台阶 13 上或上游（在图中总流体流从左向右），而在聚集台阶 10 上不存在或几乎不存在细胞。

## 具体实施方式

[0024] 详细描述

[0025] 本公开涉及用于基于颗粒穿越通道的能力来隔离颗粒的设备。颗粒（例如悬浮在液体或气态流体中的颗粒，或者真空中的颗粒）移动经过由设备中的分离元件 1 限定的台阶化通道 55。台阶化通道 55 连接由本体 2 和盖 4 限定的空隙 50 的数个部分，分离元件 1 位于该空隙 50 内并将空隙 50 的入口区域和出口区域（分别为 52 和 58）分离开。分离元件 1 可以是分立的元件，或者它可附接到本体 2 和盖 4 中的一者，或者与本体 2 和盖 4 中的一者整合（integral）。

[0026] 台阶化通道 55 将空隙 50 的入口区域 52 和出口区域 58 流体地连接，并包含至少一个隔离通道 101，该隔离通道 101 具有由（第一）隔离台阶 11 的面 41 与（第一）隔离通道 101 的另一部分（诸如本体 2 或盖 4 的面）之间的距离限定的狭窄尺寸。仅有流体中的一些颗粒能够移动进入隔离通道 101 中。最终结果是一些颗粒能够移动经过整个台阶化通道 55，而其它颗粒滞留在该设备内，诸如在隔离通道 101 的上游。由此，实现了对颗粒的隔离。颗粒的移动例如可以通过流体流、重力、振动或这些方式的任意组合来启动。

[0027] 与例如在 US 专利 No. 7993908（图 1 中示出）中公开的类似装置相比，本文所述装

置的隔离台阶中的至少一个的前导边缘 31 和过渡面 41 具有明显比隔离台阶的宽度大（例如，至少 1.5、2、10、25、100、1000、10000 或 100000 倍）的幅宽（即，大于布置有隔离台阶 11 的阶梯状通道 55 的宽度）。因为流经隔离台阶 11 的总流体中的颗粒的分离往往大部分发生在台阶的前导边缘和面 21 处，所以相对于隔离台阶 11 和通道的宽度，增加前导边缘和面 21 的幅宽能具有若干有益效果。

[0028] 总流体中流经隔离台阶 11 的颗粒在至少一个尺寸上必将具有不大于隔离台阶 11 上方的隔离通道 101 高度的尺寸（即，隔离通道的狭窄尺寸；否则颗粒将不能随总流体自此通过）。同样地，具有比隔离台阶 11 上方的隔离通道 101 高度大的尺寸的颗粒将在隔离台阶 11 的前导边缘 31 或过渡面 21 处或附近停止跟随总流体流，并将趋于积聚在那里。增加过渡面 21 和前导边缘 31 的幅宽超过布置有隔离台阶 11 的通道的总宽度，这使得能够在前导边缘 31 处或沿过渡面 21 的其它位置（例如，如果该面是倾斜的）容纳多种颗粒。因而，前导边缘幅宽大于隔离通道 101 总宽度的设备能够用来在隔离台阶 11 的前导边缘 31 处或附近捕获一种或多种尺寸隔离颗粒。随着隔离台阶 11 的前导边缘 31 的幅宽增加，更大数量的经尺寸隔离的颗粒能被捕获在其过渡面 21 处，而不堵塞装置。可期望的是，隔离台阶的幅宽的比率明显比通道的界定出隔离台阶前导边缘端部的宽度大（例如为至少 1.5 倍，更优选为 2、3、4、5、10、20、50、100、500 或 1000 倍）。

[0029] 为了容纳幅宽大于隔离通道 101 宽度的前导边缘 21，隔离台阶 11 的前导边缘 21 和过渡面 31 不能直接横跨隔离通道 101 的最窄宽度延伸。该前导边缘能是直的（例如，在除了通道 101 的最窄尺寸之外的方向上横跨通道 101 倾斜地延伸）或者由多个直的节段组成（参见图 4 和图 7）。前导边缘 21 的形状也能是弯曲的（参见图 5）、凹入的（参见图 2、图 3 和 6 图）或者迂曲的（参见图 3），从而相对于隔离通道 101 的宽度增加前导边缘的幅宽（及其相应的隔离台阶 11 和过渡面 21 的幅宽）。由于这种前导边缘形状，该设备的捕获能力能够相对于隔离台阶 11 直接横跨隔离通道 101 的宽度延伸的现有技术装置得以提高。

[0030] 在一个实施例中，台阶的前导边缘高度弯曲（例如，具有很多凹入部，诸如在图 6 中的隔离台阶 11-13 中示出的凹入部），使得其幅宽显著大于容装有台阶的通道总宽度。作为实例，图 4、图 5 和图 6 示出了四级台阶分离元件 1，该分离元件 1 能够被容纳在具有大致矩形剖面的通道内。在图 4、图 5 和图 6 中，分离元件 1 具有与隔离通道 101 的宽度（即，在垂直于总流体流 BFF 的方向上）相等的总宽度。在这些附图中的一幅图中，分离元件 1 包括聚集台阶 10，该聚集台阶 10 直接横跨隔离通道 101 延伸（与现有技术装置中的台阶相同），并因而具有等于通道总宽度的幅宽。

[0031] 在图 4 中，隔离台阶 11-13 中的每一个隔离台阶的前导边缘具有比隔离通道 101 的总宽度大的幅宽——如果每个台阶的人字形前导边缘的顶点是直角的话，那么每个台阶的前导边缘长度（通过应用勾股定理）等于（通道宽度的平方除以二）的平方根的两倍（即，如果隔离通道 101 的宽度是一个单位，那么每个台阶的幅宽是大约 1.4 个单位）。

[0032] 在图 5 中，由于每个台阶的前导边缘的弯曲，隔离台阶 11-13 中的每一个隔离台阶的前导边缘的幅宽大于隔离通道 101 的总宽度。

[0033] 在图 6 中，由于每个台阶的弯曲和凹入，隔离台阶 11-13 中的每一个隔离台阶的前导边缘的幅宽会更长。

[0034] 图 4-图 6 中所示的几何形状是用于说明的目的。台阶前导边缘能够具有无数的几

何形状。这些附图中所示的形状仅仅说明如下概念：增加前导边缘的复杂度（尤其是“折叠部”或凹入部）能够导致任一台阶的前导边缘幅宽显著地超过该台阶所在的通道的总宽度。在图 4-图 6 所示分离元件的另一实施例中，分离元件没有聚集台阶 10，而隔离台阶 11-13 与布置有分离元件 1 的大致矩形的隔离通道 101-103 的三个邻壁整合。

[0035] 不能够穿越隔离台阶的颗粒会在总流体流的方向上沿着隔离台阶的前导边缘被促动。因而，例如能够越过聚集台阶但不能穿越图 6 所示装置的隔离台阶的颗粒将趋于被总流体流朝着隔离台阶中的中央凹入以及朝着这些台阶的外缘促动。尽管未示出，图 4 和图 5 所示隔离台阶的前导边缘形状能相对于这些图中所示的 BFF 方向反转（即，使得人字形和弯曲台阶的顶点位于台阶边缘的下游）。因而，台阶能够成形为有助于或促进颗粒沿其前导边缘在选定位置处积聚。

[0036] 在隔离台阶 11（即这样的台阶：总流体中的一些但不是全部颗粒能够跟随流经该台阶的总流体移动经过该台阶）的前导边缘 31 处或沿着过渡面 21 被捕获的颗粒将趋于堵塞经过该台阶的流体流，在该台阶处或上捕获有颗粒（即，在该位置处，颗粒随总流体的移动停止或明显被抑制）。如果经捕获的颗粒堵塞住经过阶梯状通道的相当大一部分（例如， $> 0.01\%$ 、 $> 0.1\%$ 、 $> 1\%$ 、 $> 10\%$ 、 $> 50\%$ 、 $> 90\%$  或  $> 99\%$ ），这将降低隔离通道 101 的吞吐量（即在单位时间内，在横跨该台阶的选定流体压降下能够通过狭窄通道的流量）能被明显减少。

[0037] 通过相对于内部容纳有隔离通道 101 的空间的总宽度增加至少一个隔离台阶 11 的前导边缘 31 的幅宽，经捕获的颗粒将各个地占据隔离通道 101 的较小、比例的流动区域，减小流动阻塞并增加设备的用以保持几乎恒定流量的能力。只要吞吐量保持基本恒定，则横跨设备上的压降应保持基本恒定，从而恒定的流量能够减小对于复杂或昂贵的流体流控制设备的需求。因此，对于具有大量被捕获颗粒的样品而言，非常宽的台阶前导边缘 31 能够明显地减小设备经历降低吞吐量的趋势。此设备还能够在不呈现明显降低吞吐量的情况下捕获更大数量的经尺寸隔离的颗粒。

[0038] 本文所述主题与 US 临时专利申请 No. 60/306296、No. 61/236205 和 No. 61/264918 中以及国际专利申请 No. PCT/US2002/022689、No. PCT/US2009/002421、No. PCT/US2010/046350 和 No. PCT/US2010/058172 中公开的主题互补，上述专利申请中的每一个通过参引的方式合并于此。

[0039] 定义

[0040] 如本文所用地，在此部分中下列每一个术语都具有与其相关联的意义。

[0041] 对于流动经过布置有本文所述分离元件 1 的通道的流体而言，通道的“高度”是通道的表面之间（分离元件 1 插置于通道的表面之间）的最小距离。例如，在图 1D 和图 4C 中的每一幅图中，分离元件 1 插置在主体 2 与盖 4 之间。主体 2 和盖 4 的平行面之间的最小距离限定了通道的高度 ( $h_c$ )。此外，图中还分别看到在分离元件 1 的聚集台阶 10 上方的通道的高度 ( $h_0$ ) 和在隔离台阶 11、12 和 13 上方的隔离通道 101、102 的高度 ( $h_1$ 、 $h_2$  和  $h_3$ )。在操作本文所述装置期间，不必将“高度”尺寸相对于重力而竖直地定向。

[0042] “聚集”台阶就是布置在通道中（并优选为绝大部分地或完全地横跨该通道延伸）、在隔离台阶的入口侧上。聚集台阶实质上引导流体经该通道流向由隔离台阶限定的狭窄通道，减小没有或几乎没有局部流体流出现的可能的“死流量”区域。该通道应在聚集台

阶的入口侧上的高度应比其出口侧更大,诸如具有倾斜的聚集台阶,或者聚集台阶可以具有更加类似于楼梯的构造,包括有多个台阶。本文所描述的装置不需要包括聚集台阶,但是在期望将死流量区(其中滞留有意欲超过隔离台阶的颗粒)最小化的实施例中引入分离台阶是重要的。

[0043] 布置有本文所描述的分离元件 1 的通道 1 的“宽度”是在垂直于流经通道的总流体流方向(即,此流的总体方向,忽略掉由台阶几何形状所引起的局部化流动再定向)且垂直于通道高度的方向上、在通道的相对面之间的最小距离。例如,对于包含有各种几何形状台阶的四个通道中的每一个通道而言,通道的宽度在图 7 中示为“W”。另外作为实例地,图 1D 和图 4C 所描绘的台阶化通道 55 的宽度尺寸垂直地伸出图外。台阶的“宽度”被认定为与其中布置有台阶的通道的宽度处于相同的方向上;因而,在整个通道的宽度上延伸的台阶宽度等于通道宽度(虽然台阶前导边缘的幅宽会例如由于前导边缘的弯曲或凹入而明显地大于台阶的宽度)。

[0044] 隔离台阶 11 的前导边缘 31 的“幅宽”是:跟随台阶的弯曲形状所测得的前导边缘 31 的长度。如果将前导边缘 31 假想成为没有柔性的绳索,则前导边缘的幅宽就是当该绳索被拉紧时的绳索长度。因此,弯曲或凹入的台阶前导边缘的幅宽会明显大于台阶的宽度。这在图 7A-图 7D 中示出,其中四个具有长度 5W 的前导边缘 31 以各种构造配置,每个前导边缘明显超过布置有该前导边缘的阶梯化通道 55 的宽度(W)。

[0045] 台阶的“宽面”是处在相对于台阶所在参考表面更高的地形高度处的台阶部分。本文所描述台阶的宽面将总体上是(但无需是)平面形的。

[0046] 台阶的“过渡面”是台阶的跨接其宽面和参考表面的部分。过渡面优选为具有平滑或平坦的廓形,并可以是与参考表面和宽面 41 都垂直的表面,如图 1 中的过渡面 21 所示。过渡面还可以是倾斜的平面形表面(参见图 6 中的过渡面 20),或者弯曲的表面(参见图 5 中的过渡面 20)。

[0047] 台阶的“前导边缘”31 是台阶的其宽面 41 接合其过渡面 21 的部分,例如如图 1 所示。

[0048] 通道的“流动区域”是在与通道中的总流体流方向垂直的平面中截取的通道的横截面。

[0049] 详细描述

[0050] 本公开涉及用于基于颗粒流动经过隔离通道 101 的能力来隔离颗粒的设备,该隔离通道 101 具有由分离元件 1 的隔离台阶 11 与设置该分离元件 1 的空隙 50 的表面之间的间隔限定的最小尺寸(高度)。该设备包括分离元件 1,该分离元件 1 布置在由本体 2 和盖 4 形成的空隙 50 中。在该空隙 50 内,分离元件 1 将空隙的入口区域 52 与空隙的出口区域 58 分离开。入口区域和出口区域借助台阶化通道 55 处于流体连通中,该台阶化通道 55 由分离元件 1 以及本体 2 和盖 4 中的一者或两者限定。形成在分离元件 1 中的一个或多个隔离台阶 11 限定出一个或多个隔离通道 101。在入口区域与出口区域之间流动的流体通过台阶化通道 55,包括通过至少第一隔离通道 101。

[0051] 操作时,空隙 50 的入口区域 52 中的颗粒进入台阶化通道 55 中,并且有可能通行进入隔离通道 101 中。隔离通道 101 中的颗粒能前进到空隙 50 的出口区域 58。不能够通行进入隔离通道 101 或者沿着该隔离通道通行的细胞则不能到达出口区域 58。这样一来,

能够到达出口区域 58 的颗粒与不能到达出口区域 58 的颗粒隔离。两类颗粒可以分别地从设备回收。例如,出口区域 58 处的颗粒可以在从出口区域 58 收回的液体流中回收(例如,借助出口或借助插入出口区域 58 中的导管)。不能通过隔离通道 101 到达出口区域 58 的颗粒可以通过反向冲刷它们经过台阶化通道 55 并进入入口区域 52 中而回收。这些颗粒能从入口区域 52 收回。或者,不能通过隔离通道 101 到达出口区域 58 的颗粒可以留在设备中,或者通过拆开设备来回收。

[0052] 本文所述设备能用于多种应用场合。例如,除了从混合种类的颗粒中分离颗粒之外,该装置还能用于对一个或多个被隔离颗粒种类进行鉴别或进一步操作的应用场合中。相对于先前用于颗粒分离的设备而言,本设备的构造和操作阻止了由正经隔离处理的颗粒导致的堵塞。

[0053] 作为实例,该设备可以用于将肿瘤细胞与细胞的混合悬浮液隔离,诸如隔离出在人类或其它脊椎动物对象的血液中的循环肿瘤细胞(CTC)。该设备还能用于将胎细胞与正怀有胎儿的(或先前怀有胎儿的)妇女的血液隔离。此外,该设备可以用于从细胞的混合悬浮液中隔离出基本上任何在尺寸、可压缩性或其组合上与其它细胞存在区别的细胞。

[0054] 现在将分别对设备的部件或部分进行更详细地讨论。

[0055] 本体和盖

[0056] 该设备具有本体 2 和盖 4,之间限定出空隙 50。空隙 50 的由分离元件 1 部分地限定的一部分是台阶化通道 55。台阶化通道 55 也由本体 2 的表面、盖 4 的表面或其组合限定,所述表面与分离元件 1 的一个或多个台阶化表面(例如 31 和 32)相对。为了简化设备的构造,大部分或全部的由台阶化通道限定的表面可以成形或机加工成分离元件 1,该分离元件 1 是形成在盖 4 或本体 2 的凹陷部中的整合部件,该凹陷的部分由平坦的表面围绕,使得本体 2 或盖 4 的相对表面只需为另一个平坦的表面以便形成空隙 50 并在本体 2 和盖 4 的平坦表面之间接触时将分离元件 1 包围于其中。

[0057] 插入有分离元件 1 的本体 2 和盖 4 的总体形式在通过参引合并于此的文献中进行了总体讨论,并且明显的是,其中所述的任何配置都能用于本文所述设备。本文所描述的是未在那些文献中公开的分离元件 1 的元件。

[0058] 本体 2、盖 4 或两者都能限定出入口端口,流体能够经该入口端口引入空隙 50 中或从空隙 50 收回。例如,本体 2 能限定出与入口区域 52 处于流体连通的入口端口。被引入该入口端口中的流体可以流入入口区域 52 中,使已经在那里的流体移入(因为空隙是密封的)台阶化通道中,并自此顺序地进入第一通道 51、第二通道 52 和出口区域 58。悬浮于这些区域和通道的一者中的流体中的颗粒会被携载到下游区域或通道中,如果所述颗粒能够流动经过现存的介入通道和区域的话。类似地,借助于形成在本体 2 中的出口端口从出口区域 58 收回流体会引起从与出口区域 58 处于流体连通的通道以及从与其处于流体连通的通道和区域的流体流动。

[0059] 端口可以是简单的孔,其延伸经过盖或本体,或者它们可以具有与其相关联的固定件(垫片、环、轴座或其它配件),以便将流体流动装置与端口连接。本体 2、盖 4 或两者都能限定出位于空隙 50 的入口区域 52 中的入口端口、位于空隙 50 的出口区域 58 中的出口端口、或者入口端口以及出口端口二者。流体可以经该入口端口引入入口区域 52 中。流体可以经出口端口从出口区域 58 收回。连续将流体引入入口区域 52 中同时连续将流体从

出口区域 58 中收回或放出可以产生经过设备的连续流体流动。类似地,连续将流体从出口区域 58 收回同时连续将流体流入或引入入口区域 52 中可以产生连续流动。

#### [0060] 空隙

[0061] 本体 2 和盖 4 在组装时形成空隙 50。空隙 50 具有入口区域 52、出口区域 58 和介于入口区域 52 与出口区域 58 之间的分离区域。分离元件 1 布置在分离区域内,与本体 2、盖 4 或两者一起限定出台阶化通道 55。台阶化通道 55 包括至少第一隔离通道 101,该隔离通道 101 由分离元件 1 中的至少第一隔离台阶 11 限定。台阶化通道 55 可以包括任意数量的附加隔离台阶,这些台阶中的每一个台阶可以限定出在空隙中的附加隔离通道。优选地,连接入口区域 52 和出口区域 58 的唯一流体路径是台阶化通道 55,尽管此台阶化通道能分成多个串联的、平行的或具有一些这两种形式的组合的台阶化通道。同样地,如本文所述多个装置能串联地(例如,在选定的尺寸范围中选择性地捕获颗粒)或者平行地(例如,增强细胞捕获能力)操作。

[0062] 在操作装置期间,至少空隙 50 的入口区域 52、出口区域 58 和台阶化通道填充有流体。优选地,在操作期间,整个空隙 50 填充有流体。在一个实施例中,连接入口区域 52 和出口区域 58 的唯一流体路径是台阶化通道。存在于入口区域 52 中的颗粒可以进入台阶化通道 55。空隙(即,如由本体、盖和分离元件中的一者和更多者限定的)可以形成为在总流体流动方向上(或者相反的方向上)从入口区域朝着台阶化通道渐缩。此空隙形状可以使颗粒流动朝着台阶化通道集中,将经过该成形区域的流体线性流动速度保持在预期范围之内(例如是大致恒定的),便于观察经其通过的颗粒或者实现具有其它有益结果。

[0063] 存在于台阶化通道 55 中的颗粒可以进入并通过第一隔离通道 101,除非它们被第一隔离通道 101 的高度(即,狭窄尺寸)排除在外,或者除非它们经过第一隔离通道 101 的运动被堵住该通道的颗粒(例如,在第一隔离通道 101 的前导边缘 31 处或其上游的静止不动的细胞)抑制。经过第一隔离通道 101 的颗粒可以进入出口区域 58 并自此被回收。颗粒在设备内的移动可以由流经该设备的流体流、由细胞的固有移动性或两者的组合来引发。一段时间之后,不能进入第一通道 51 的颗粒将被隔离在入口区域 52 中;能够越过(traverse)第一隔离通道 101 的颗粒将被隔离在台阶化通道 55 中或其上游;能够进入第一隔离通道 101 但不能自由地经其通过的颗粒将被隔离在第一隔离通道 101 中;而能够移动经过第一隔离通道 101 的颗粒将被隔离在出口区域 58 中(或者在从出口区域 58 收回或放出的流体中)。

[0064] 以这种方式隔离的颗粒可以从其各自的位置处回收(使用各种已知方法中的任一种,包括本文所描述的某些方法)。作为实例,能将导管插入设备的区域或通道(例如,入口区域 52 或第一隔离通道 101)中,并且存在于其中的颗粒可以通过在导管的内腔中产生吸力而回收。作为又一实例,可以利用反向冲洗(即,从出口区域 58 朝着入口区域 52 方向的流体流)来收集存在于入口区域 52 或第一隔离通道 101 的一者或更多者中的颗粒。

#### [0065] 分离元件

[0066] 此处所描述的装置的分离元件 1 可以与与先前在 US 专利 No. 7993908 中、在 PCT 公布文献 W02011/066497 中或其它文献中描述的分离元件大致相同,但是包括增添的特征。本文所描述的装置的分离元件 1 包括至少一个隔离台阶 11,该隔离台阶 11 具有前导边缘 31,前导边缘 31 的幅宽明显大于(例如为 1.5x、2x、3x、4x、5x、10x、20x、50x、100x、500x、

1000x、10000x 或 100000x) 其中布置有隔离台阶的渠道的总宽度。换句话说,分离元件 1 的至少一个台阶的前导边缘形状为使得该前导边缘的幅宽显著大于该台阶的总宽度。换句话说,台阶前导边缘的沿其轮廓测定的幅宽大于台阶边缘的两个端点之间的最短线性距离(即,不管该台阶边缘是否顺沿该最短线成形)。作为实例,前导边缘能是弯曲的(例如参见图 5)、凹入的(例如参见图 6)、带角度的(例如参见图 4)、蜿蜒的(例如参见图 3)或不规则的(例如参见图 5)。台阶幅宽与渠道宽度的比率的上限基本上仅由用于形成台阶的制造方法的公差以及经过该台阶的颗粒的尺寸限定。

[0067] 台阶化通道 55 是在设备的操作期间让颗粒从入口区域 52 运动到出口区域 58、让流体从入口区域 52 流动到出口区域 58 或两种情况兼有的孔。分离元件 1 具有台阶化结构,其限定了台阶化通道 55 的至少一侧的台阶化形状。分离元件 1 具有至少一个隔离台阶 11,并且它能具有多个隔离台阶(例如,图 6-8 中的 11-13)。流体必须流动通过由对应的隔离台阶 11 部分地限定的隔离通道 101,以便在设备组装好时从入口区域 52 越过台阶化通道 55 到达出口区域 58。

[0068] 在本文所描述的设备操作期间,具有不同尺寸的颗粒混合物可以被驱使流过台阶化通道 55,包括至少一个隔离通道 101。所具有的特征尺寸超过隔离通道 101 的狭窄尺寸(即高度)的颗粒通行在界定出该隔离通道的隔离台阶 11 的前导边缘 31 处或附近受阻,并且这些颗粒将趋于积聚在前导边缘 31 处或附近而不是通行经过隔离通道 101。只要隔离通道 101 不完全被处于整个隔离台阶 11 幅宽上的受阻颗粒堵住,则流体和颗粒围绕或经过受阻细胞的流动就可以继续。开发本文所描述主题至少部分地归因于尝试设计比现有技术设备更不易于受到由受阻颗粒引起的阻塞和堵塞影响的设备。优选地,隔离台阶 11 的前导边缘 31 的幅宽经如此选择,使得对于预期的颗粒混合物而言,隔离通道 101 的使颗粒通行受阻的那部分(那些部分)具有充足的流动区域,当预期或可预见数量的颗粒堆积在所述部分处时,所述充足的流动区域使得通过所述部分的流体通量没有明显地(即不超过 50%、20%、10%、5%、1%、0.33%或 0.1%或更小)受阻。

[0069] 分离元件 1 可以包括聚集台阶 10(如图 1-图 6 中所示),该聚集台阶 10 用于使台阶化通道 55 内的流体流朝着第一隔离通道 101 偏转,以填充第一隔离台阶 11 上游的“死区”,从而提供用于在分离元件上承载隔离台阶的在结构上可行的基础,或者这些的某种组合。分离不需要包括聚集台阶。

[0070] 分离元件 1 的台阶能具有任意的多种形状。在一个实施例中(例如,在图 1 中示出的设备中),聚集台阶 10 和第一隔离台阶 11 都具有常见的楼梯式台阶结构,即以直角相交的两个平面形表面。也就是说,聚集台阶 10 的过渡面 20 和聚集台阶 10 的宽面 40 以直角相接,第一隔离台阶 11 的过渡面 21 和其宽面 41 也是如此。或者,例如台阶的过渡面和宽面可以以 90 度与 180 度之间的角度相接。台阶的过渡面和宽面也能以 0 度与 90 度之间的角度相接,以形成悬突体。对于本文所描述的设备,至少一个隔离台阶 11 具有弯曲的或优选为凹入的前导边缘 31 和过渡面 21,使得台阶的幅宽显著大于台阶的宽度。

[0071] 过渡面和宽面以 90 度与 180 度之间的角度相接的台阶可以阻挡具有各种尺寸的颗粒(即,那些尺寸介于台阶宽面限定的通道狭窄尺寸与台阶上游的空间狭窄尺寸之间的颗粒)通行。借助于将尺寸稍稍不同的颗粒的通行停止在台阶过渡面上的不同位置处,过渡面和宽面以 90 度与 180 度之间的角度相接的台阶可以比过渡面和宽面以 90 度或以下角

度相接的的台阶更大程度地防止对台阶宽面所限定通道的堵塞。

[0072] 如现有技术中认识到地,借助于增加台阶宽度也可以降低或避免让流经台阶的流体因台阶宽面所限定通道被颗粒阻塞而堵住。因为各个颗粒仅可以堵住被该颗粒遮蔽的流动区域的流体流动,所以更宽的台阶将必定被更大数量的堵塞颗粒堵住。然而,增加台阶的宽度并不总是实际的,尤其是当需要显著增加宽度以容纳许多颗粒或者当期望小型化时。

[0073] 本文所公开主题的显著优点在于,发明人认识到可以在不增加台阶宽度的情况下显著地提升隔离台阶 11 用以容纳受阻颗粒的能力。替代增加隔离台阶 11 的宽度这一手段地(或者除了该手段之外),借助于增加台阶的前导边缘 31(即发生颗粒受阻处)的幅宽——例如通过降低台阶的平直度——也可以增加隔离台阶的颗粒滞留能力。

[0074] 作为实例,在具有矩形横截面的流体通道中,直接横跨通道(即,与侧面成直角)延伸的台阶的幅宽前导边缘仅等于通道宽度(例如参见图 1)。如果台阶的形状是半圆形的,并且该半圆形的圆弧延伸成使得该半圆的中心位于该半圆的最上游边缘的下游,那么台阶前导边缘的幅宽等于该半圆的周长,为  $\pi$  乘以通道宽度再除以二(即,大概为  $1.57 \times$  通道的宽度)。类似地,具有类似于圆形或椭圆形圆弧的形状的前导边缘的台阶,如人字形(即类似于字母 V)、之字形、蜿蜒线或不规则线(参见图 2-图 6),都将具有比仅仅横跨具有矩形横截面的流体通道垂直地延伸的台阶幅宽更大的幅宽值。具有这些形状的前导边缘的台阶可以用在本文所描述的设备中。

[0075] 在一个实施例中,隔离台阶 11 的前导边缘 31 成形为使得前导边缘 31 的幅宽明显大于台阶的总宽度和/或由该台阶限定的隔离通道 101 的宽度。这例如可以通过将台阶形成使得其前导边缘具有波纹状或非常不规则的边缘形状来实现,如图 2 和图 3 中所示,图 2 和图 3 分别是具有波纹状和不规则边缘的台阶的图示。在图 2 中,隔离台阶 11 是一平坦的平板,在其过渡面 21 处具有指形突出部。由指形突出部的周长形成的台阶前导边缘 31 的幅宽显著大于台阶的宽度,如图 2A 中能够清楚地看到。同样地,图 3 所示隔离台阶 11 的前导边缘中的波纹部和不规则部使得前导边缘幅宽明显大于台阶的总宽度,如图 3A 中能清楚地看到。

[0076] 多个台阶能具有相似或不同形状的前导边缘。例如,图 4-图 6 示出了分离元件 1,其中聚集台阶 10(其不必阻挡任何颗粒通行)的形状与隔离台阶 11-13 中的每一个台阶的形状不同。在这些图示中,隔离台阶 11-13 具有相同或相似的形状,但它们不必如此。不管隔离台阶 11 的前导边缘 31 的形状如何,对于细胞或其它颗粒通行经过由台阶界定的隔离通道 101 而言重要的是,由每个隔离台阶 11 限定的狭窄尺寸(高度;例如图 1D 中的  $h_1$ )。不能够通行经过由隔离台阶 11 限定的狭窄尺寸的颗粒将不能越过台阶(除非它能够变形,并且横跨台阶的压降足以诱发此变形)。

[0077] 由此限定的具有逐渐变窄通道的一系列隔离台阶、具有倾斜宽面(即使得由此限定的狭窄通道在自此通过的总流体流方向上变窄)的隔离台阶或者这些的组合可以用于捕获可变形的细胞(即能够变形而配合在由隔离台阶限定的通道中但不能经其通过的细胞)并将它们与足够小或者可充分变形而通过隔离台阶的细胞隔离。

[0078] 每个隔离台阶 11 的幅宽可以在台阶上的所期望颗粒集聚的基础上结合要用该设备处理的样品的颗粒组成以及每个对应隔离通道 101 的狭窄尺寸来选择。隔离台阶 11 的幅宽可以选择成显著大于(例如 10、1000 或 100000 倍)对应隔离通道 101 的狭窄尺寸。作

为实例,对于胚胎样细胞与母血的隔离,被认为期望的是,幅宽是对应通道的狭窄尺寸的大约至少 1000 倍(一千倍)优选为 10000 倍(一万倍)。幅宽相对大的隔离台阶 11 允许颗粒积聚在隔离通道 101 内,同时限制对隔离通道 101 的堵塞。

[0079] 尽管本文已参照单个隔离台阶 11(图 1-图 3 和图 7)以及参照三个隔离台阶 11(图 4-图 6)对设备进行了描述,但是显然在该设备中能包括任意数量的隔离台阶 11(例如,两个、四个、十个或一百个台阶),每个隔离台阶 11 限定出位于台阶化通道 55 内的对应隔离通道 101,并具有特性的狭窄尺寸。

[0080] 结构的材料和方法

[0081] 用于制造本文所描述装置的材料和方法可以与先前在 US 专利 No. 7993908、PCT 公布文献 W02011/066497 中或其它文献所描述的那些材料和方法大致相同,只要设备的至少一个隔离台阶 11 的前导边缘 31 能够如本文所描述地那样构造——例如,具有显著大于其宽度的幅宽,诸如前导边缘 31 具有波纹形形状之类。也就是说,所述方法必须能够制造出具有至少一个隔离台阶 11 的装置,该隔离台阶的前导边缘 31 的幅宽大于该台阶的总宽度(例如,大于装置内的该台阶所在通道的宽度)。

[0082] 隔离颗粒

[0083] 本文所述装置可以用于隔离与先前在 US 专利 No. 7993908、PCT 公布文献 W02011/066497 中描述的类型大致相同的颗粒。颗粒的影响其越过本文所描述设备的隔离通道 101 的能力的属性包括颗粒的尺寸、形状、表面性质和可变形性。

[0084] 在一重要的实施例中,该设备用于将肿瘤细胞(其往往明显大于相同细胞类型的相应非肿瘤细胞)与非肿瘤细胞隔离。已知的是肿瘤细胞在很多人体(以及其它脊椎动物体)的血流中循环,即使对于被认为是固态的、单式肿瘤的肿瘤(诸如卵巢、前列腺和乳腺癌)也是如此。循环肿瘤细胞(CTC)的检测和/或计算会是肿瘤的存在、属性(例如阶段或等级)、恶性以及相应治疗的重要指示。此外,CTC 的隔离允许对所存在肿瘤的类型进行鉴定。这些特征对于肿瘤的诊断、治疗以及肿瘤转移的预防都是非常重要的。

[0085] 在一个实施例中,使用本文所述设备对从个体(例如,人体)对象获得的血液进行处理以将 CTC 与血液隔离。隔离的 CTC 能通过任何已知的方法进行回收和分析以获得针对于该个体对象的重要的诊断、治疗和预防信息。因为 CTC 被认为存在于肿瘤形成的早期阶段,所以 CTC 的检测和表征能实现较早的、有效干预以防止肿瘤发展和扩散。

[0086] 基本上任何适于使用隔离细胞的诊断程序都能使用本文所描述装置获得的细胞来执行。这些方法的实例包括利用这些细胞或由这些细胞制备的提取物来确定抗体标本的亲水性、确定这些细胞内含有的核酸或者确定细胞在有特定媒质情况下的生长或与其它细胞相互作用的能力。使用本文所描述装置获得的细胞因而能用于确定基因表达、遗传变化、生物标志或细胞的其它形态学或生物化学特征(或者这些特征的变化)。

[0087] 在另一实施例中,本文所述设备用于将循环内皮细胞(CEC)与包括这些细胞的样本(诸如采自患者的血液样本)隔离。具有增大尺寸的 CEC(相对于正常 CEC)也能借助于选择设备中的适当狭窄通道尺寸来隔离。作为实例,可以使用这样一种设备,该设备所具有狭窄的通道尺寸倍选择成使得增大的 CEC 与正常 CEC 隔离。作为另一实例,可以使用这样一种设备,该设备所具有的狭窄通道尺寸被选择成将所有的 CEC(或者仅仅增大的 CEC)与正常存在于血液中的细胞隔离。众所周知地,CEC 用于指示个体中的创伤的存在或出现,而增

大 CEC 的存在则尤其能指示特定的状况,诸如急性心肌梗塞或即将发生的心肌梗塞(例如参见 Damani 等人于 2012 年发表于 Sci. Transl. Med. 4 :126ra33 的文章)。使用本文所描述设备隔离的 CEC 也能如本文所描述的方式回收和 / 或通过常规方法进行分析(例如,通过检测免疫细胞表面标记)来识别其原始组织并从而进一步指示引发其循环的创伤类型和 / 或身体部位。作为实例,心源性增大 CEC 的隔离指示出患者近来已经历心肌梗塞、正经历心肌梗塞或即将发生心肌梗塞的迫切风险。

[0088] 流体移位装置

[0089] 本文所述设备能使用与先前在 US 专利 No. 7993908、PCT 公布文献 W02011/066497 中或在与其它微流体装置有关的文献中描述的基本相同类型的流体移位装置。

[0090] 使用该设备

[0091] 对本文所描述设备的使用和操作与先前通过参引合并于此的文献中描述的基本相同。本文所描述设备具有如下的明显优点:更不易于发生堵塞、流动 / 流量减损、以及其它因细胞被捕获在该设备的隔离台阶 11 上而引起的不期望现象。

[0092] 实例

[0093] 现在参照如下实例对本公开主题进行描述。这些实例仅仅是为了说明的目的而提供,并且所述主体不限于这些实例,而是包括所有作为此处所提供教导的结果的变形。

[0094] 在一个实施例中,台阶化通道具有 2.5 厘米的总宽度,并包括第二台阶 62,该第二台阶 62 具有幅宽为 8.0 厘米的波形前导边缘。在第二台阶 62 与相对的盖 4 之间的第二通道 52 的狭窄尺寸为 10 微米。

[0095] 当让细胞的悬浮液(例如,10 毫升的其中包括有选定量的肿瘤细胞的人体血液)通行经过该台阶化通道并继而让不溶解肿瘤细胞的冲洗溶液通行经过该台阶化通道时,基本所有的血细胞通过该设备而大部分或全部肿瘤细胞被保留在该设备内。

[0096] 表 1. 部件列表

[0097] 1 分离元件

[0098] 2 本体

[0099] 4 盖

[0100] 10 聚集台阶

[0101] 11 (第一)隔离台阶

[0102] 12 第二隔离台阶

[0103] 32 第二隔离台阶的前导边缘

[0104] 13 第三隔离台阶

[0105] 20 聚集台阶的过渡面

[0106] 21 (第一)隔离台阶的过渡面

[0107] 22 第二隔离台阶的过渡面

[0108] 23 第三隔离台阶的过渡面

[0109] 30 聚集台阶的前导边缘

[0110] 31 (第一)隔离台阶的前导边缘

[0111] 32 第二隔离台阶的前导边缘

[0112] 33 第三隔离台阶的前导边缘

- [0113] 40 聚集台阶的宽面
- [0114] 41 (第一)隔离台阶的宽面
- [0115] 42 第二隔离台阶的宽面
- [0116] 43 第三隔离台阶的宽面
- [0117] 50 由本体和盖限定的空隙
- [0118] 52 空隙的入口区域
- [0119] 53 通道的上游部分
- [0120] 54 连接空隙的入口区域和出口区域的通道
- [0121] 55 通道的分离部
- [0122] 56 通道的下游部分
- [0123] 58 空隙的出口区域
- [0124] 60 分离部的由聚集台阶限定的部分
- [0125] 61 分离部的由(第一)隔离台阶限定的部分
- [0126] 62 分离部的由第二隔离台阶限定的部分
- [0127] 63 分离部的由第三隔离台阶限定的部分
- [0128] 101(第一)隔离通道
- [0129] 102 第二隔离通道
- [0130] 103 第三隔离通道
- [0131] 表 2. 缩写词列表
- [0132] BFF 总流体流
- [0133] hc 通道的高度
- [0134] h0 在由聚集台阶限定的部分中的通道高度
- [0135] h1 在由(第一)隔离台阶限定的部分中的通道高度
- [0136] h2 在由第二隔离台阶限定的部分中的通道高度
- [0137] h3 在由第三隔离台阶限定的部分中的通道高度
- [0138] W 分离部中的通道的总宽度
- [0139] L 分离部的长度
- [0140] B 隔离台阶的前导边缘的幅宽
- [0141] D 比率 B/L
- [0142] W 隔离台阶的宽度
- [0143] 此处引用的每个专利、专利申请和公布的公开通过参引的方式将其全部内容合并于此。
- [0144] 尽管本文已参照具体实施例对本发明主题进行了披露,但是明显的是在不偏离本主题的真正精神和范围的情况下,本领域技术人员还能设想此主题的其它实施例和变形。所附权利要求书包括所有这些实施例和等同变形。

现有技术

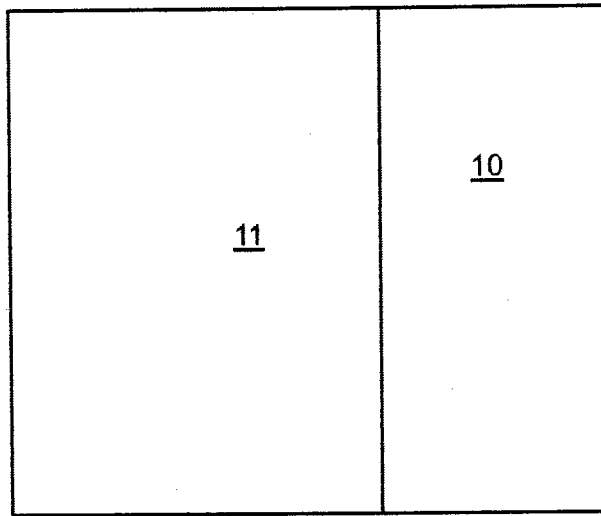


图 1A

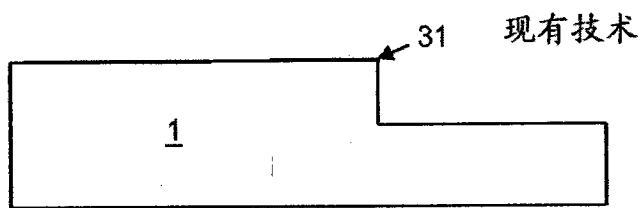


图 1B

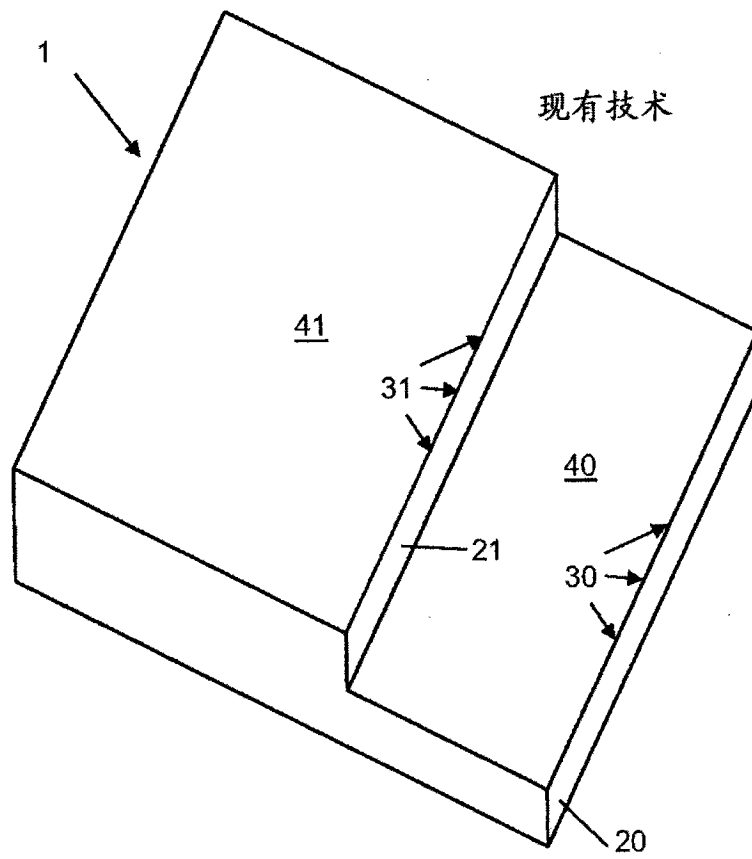


图 1C

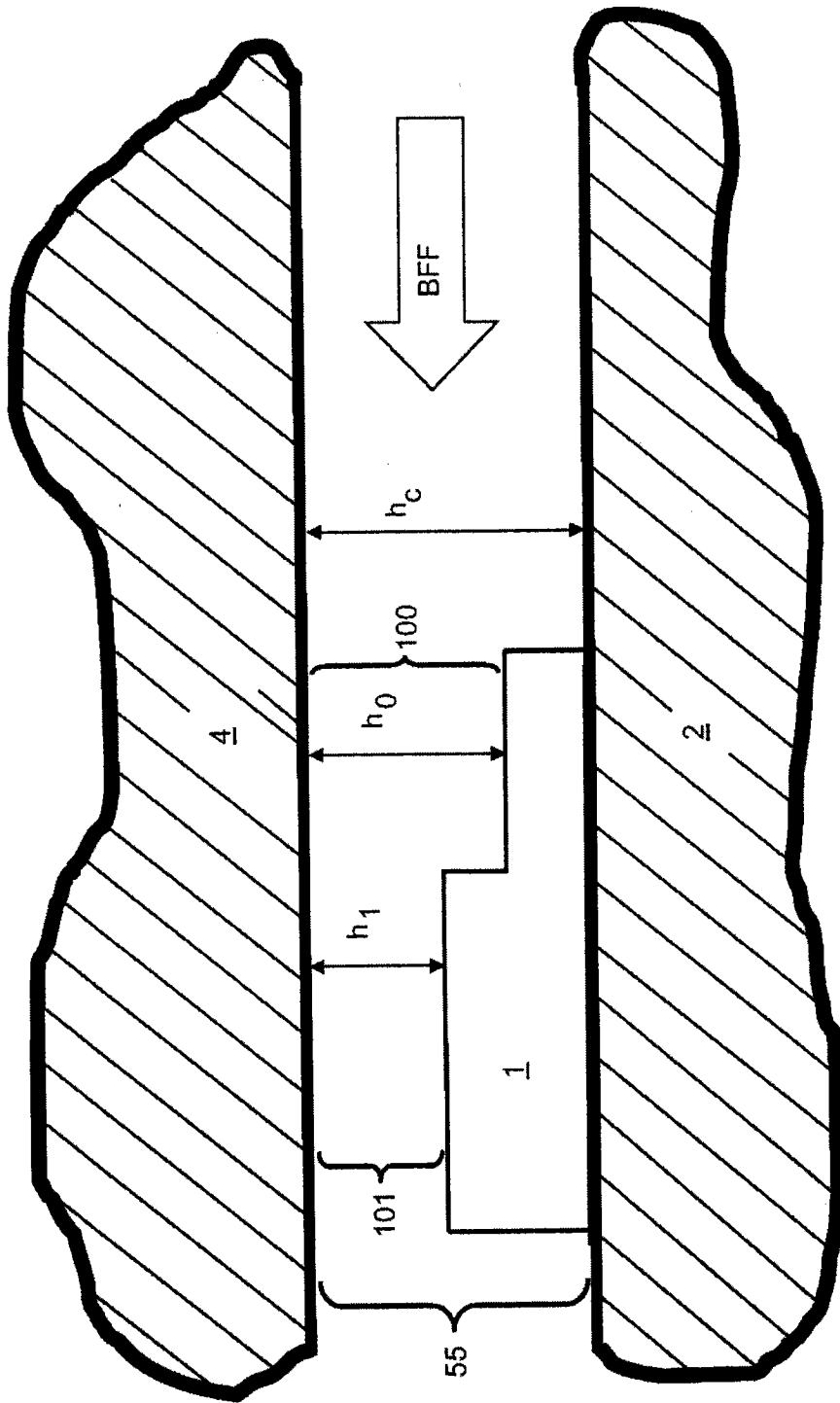


图 1D

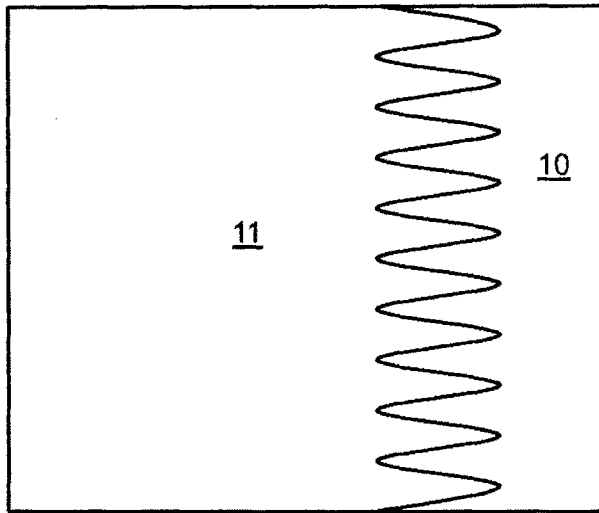


图 2A



图 2B

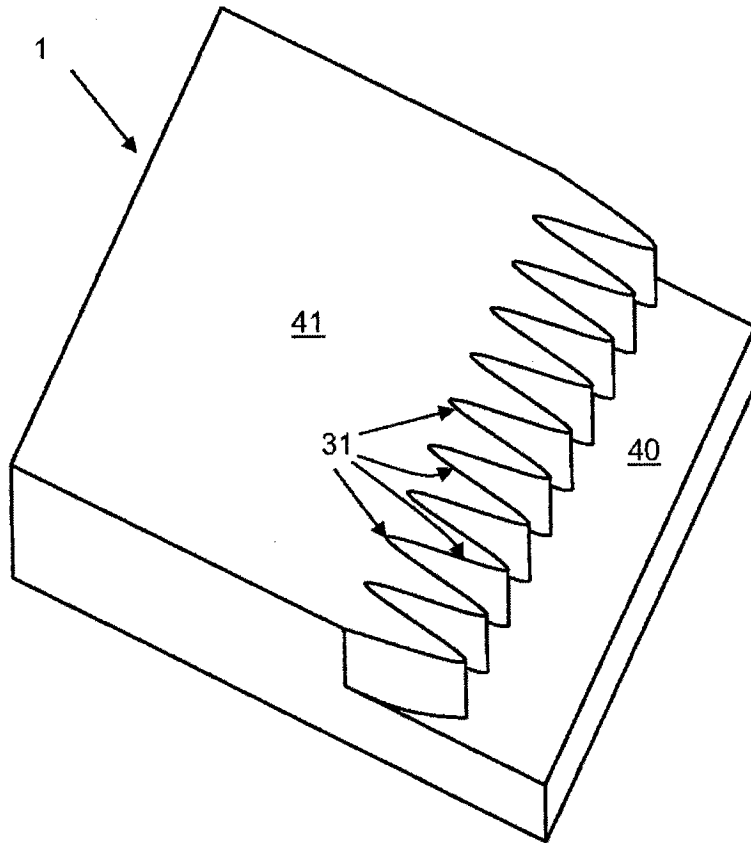


图 2C

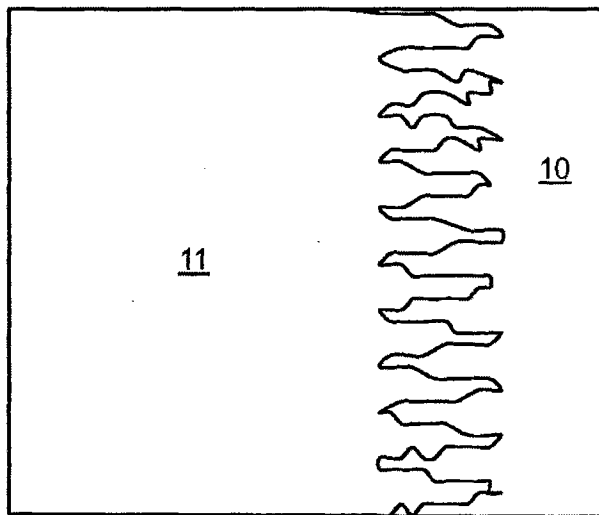


图 3A

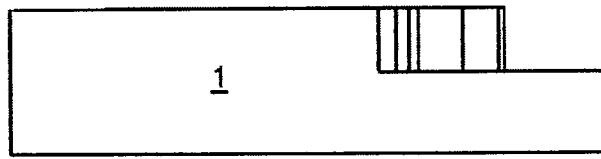


图 3B

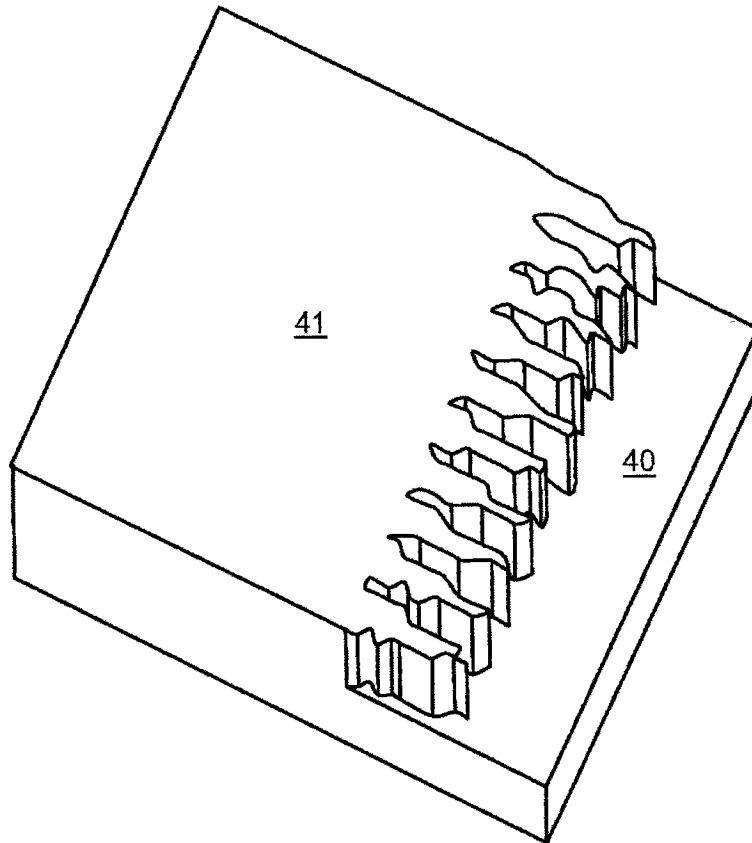
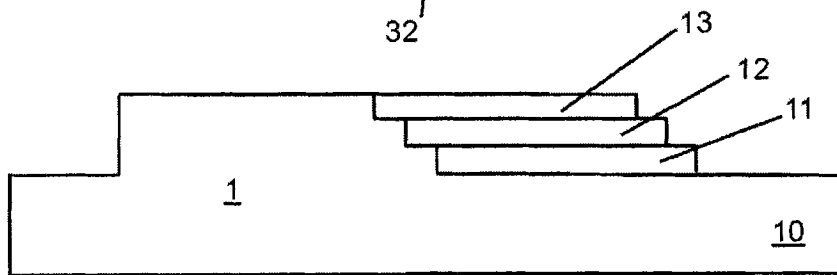
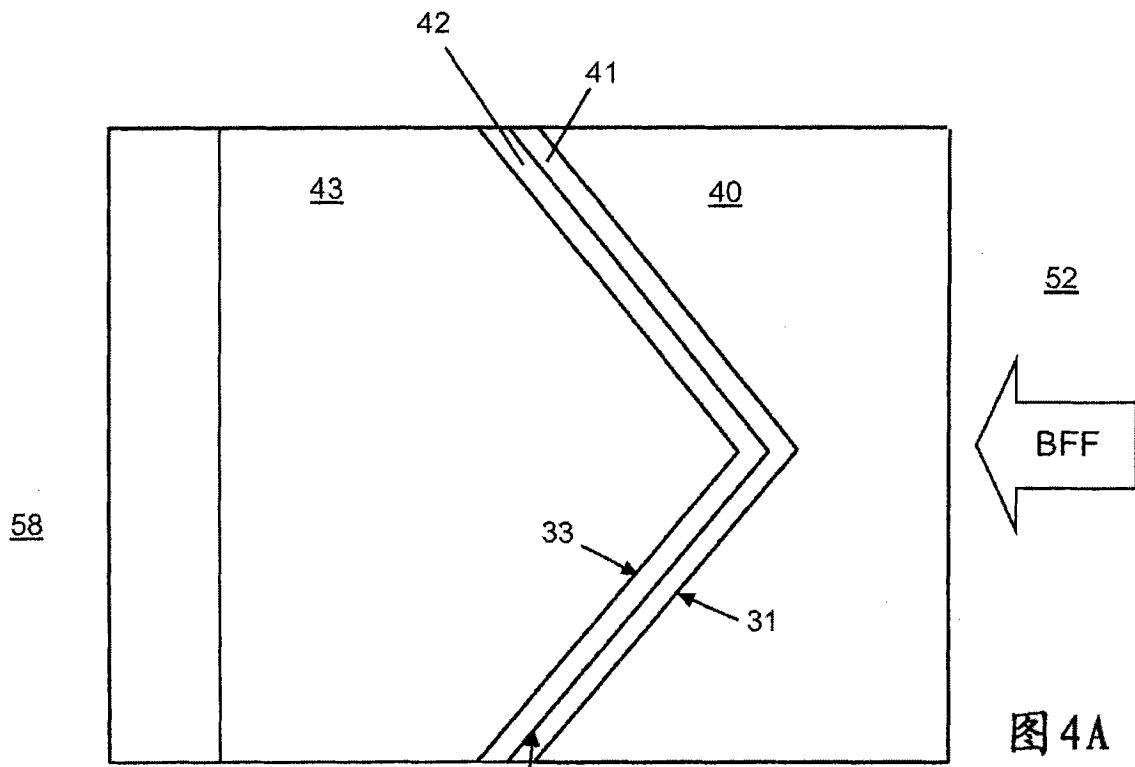


图 3C



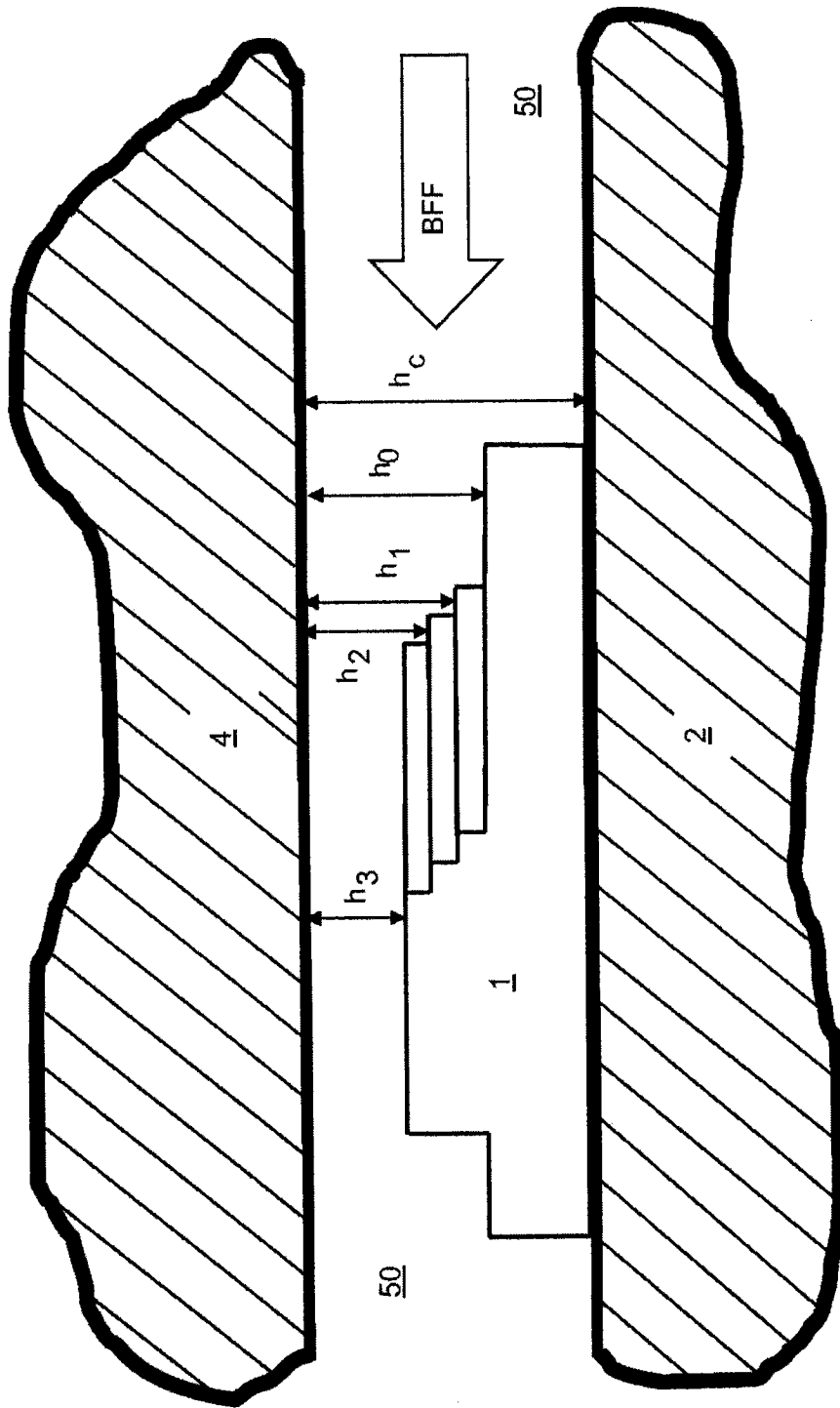


图 4C

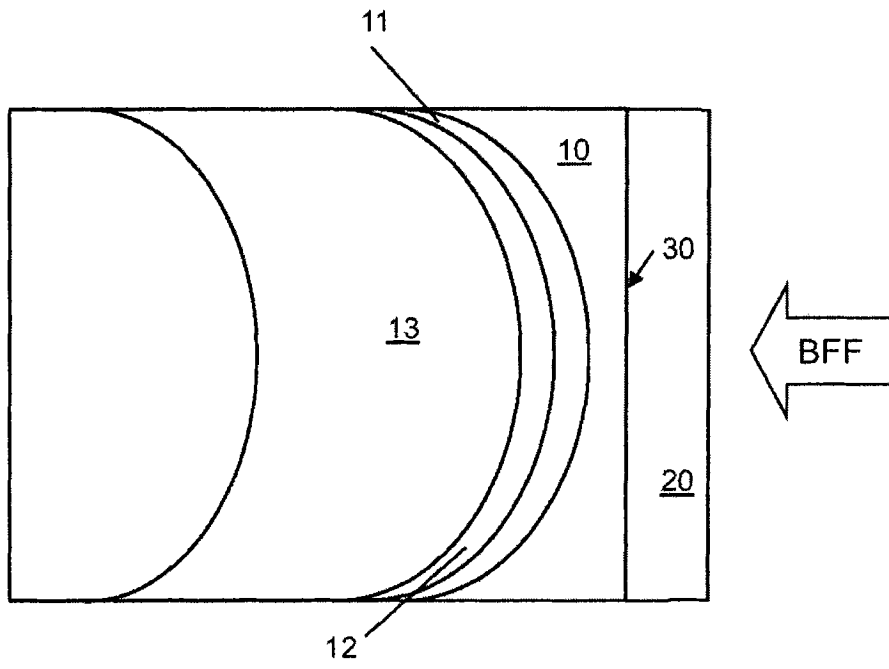


图 5A

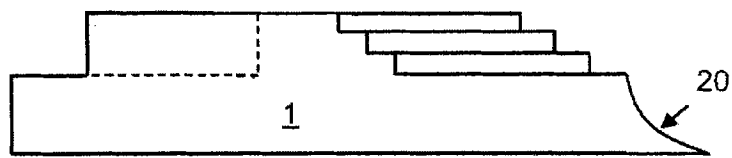


图 5B

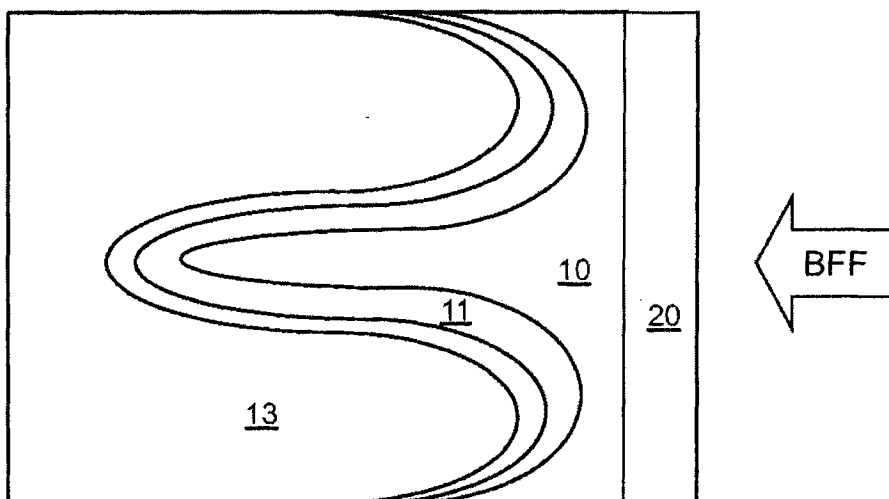


图 6A

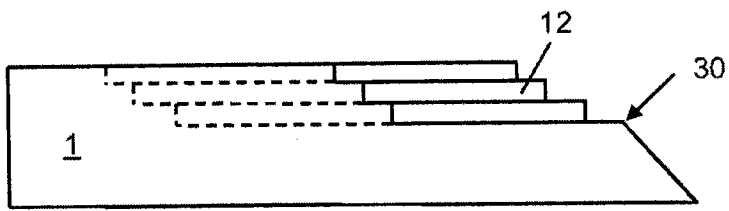


图 6B

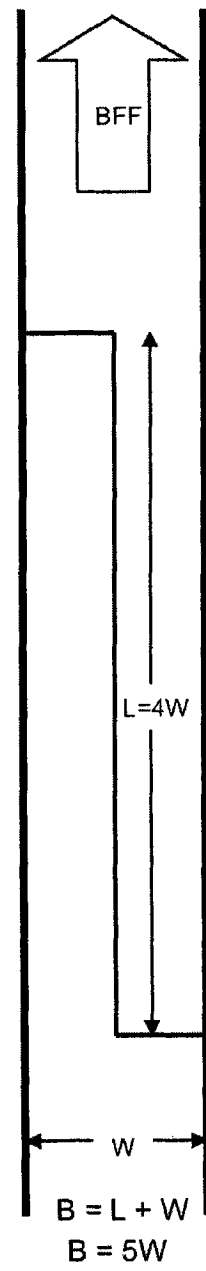


图 7A

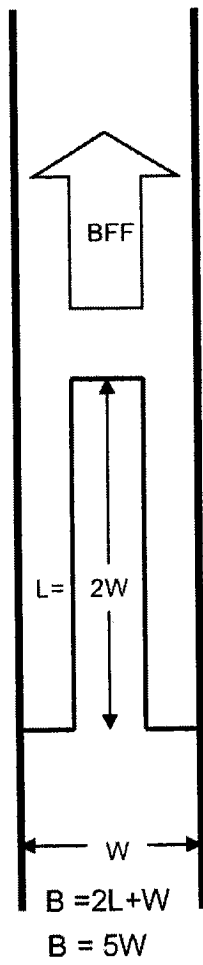


图 7B

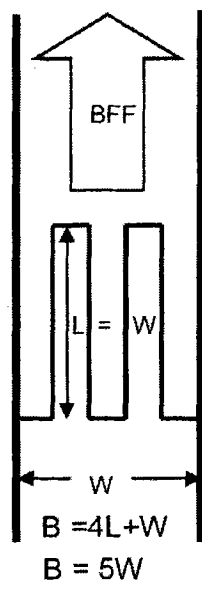


图 7C

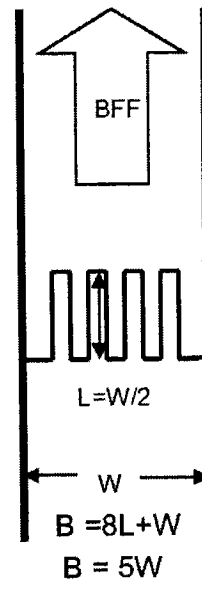


图 7D

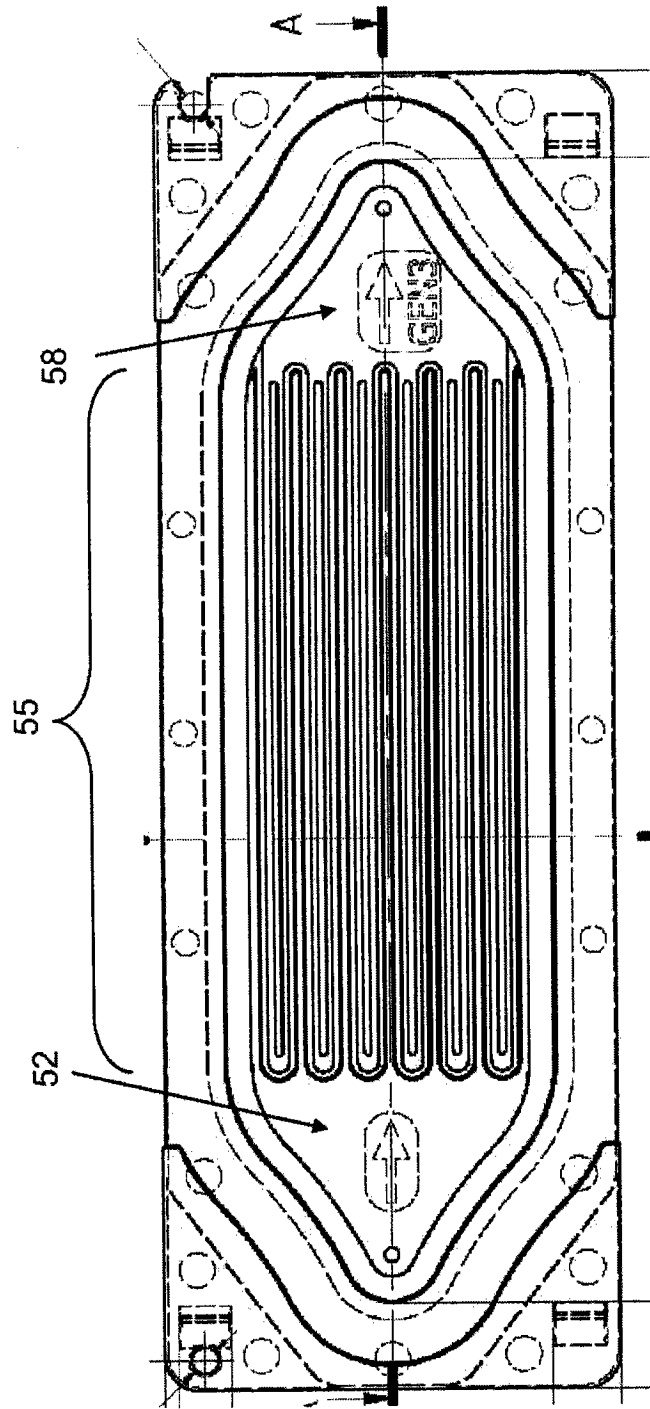


图 8

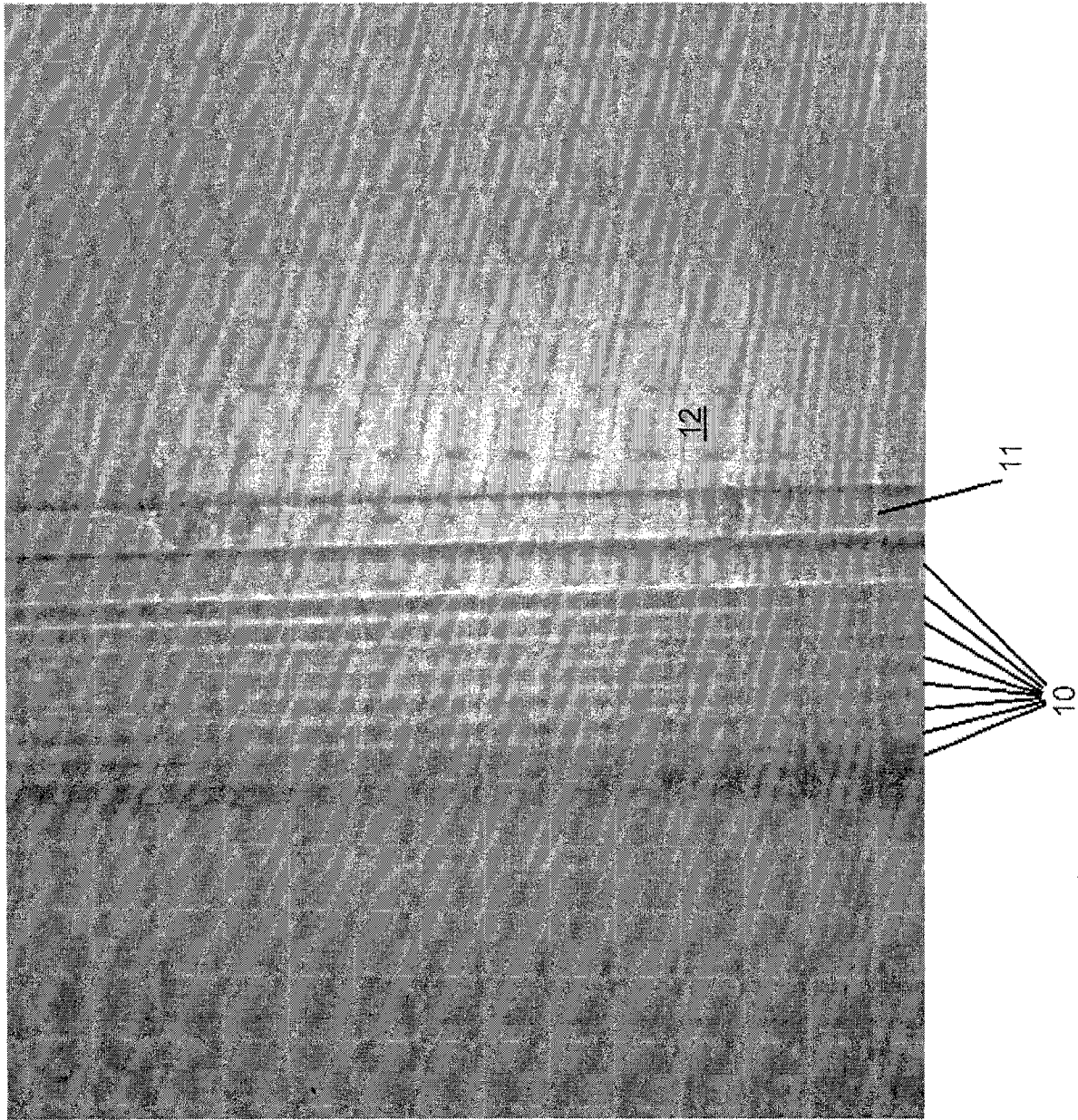


图 9

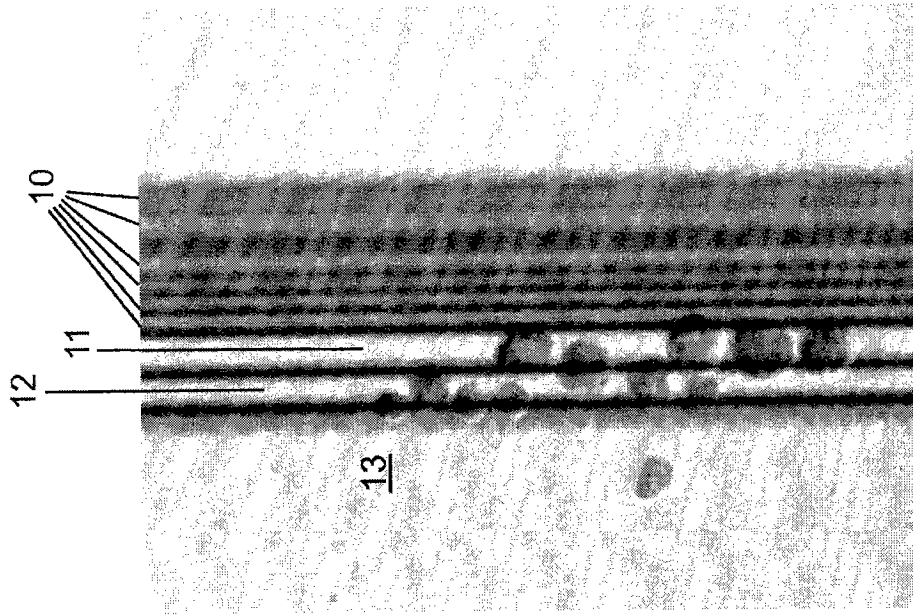


图 10A

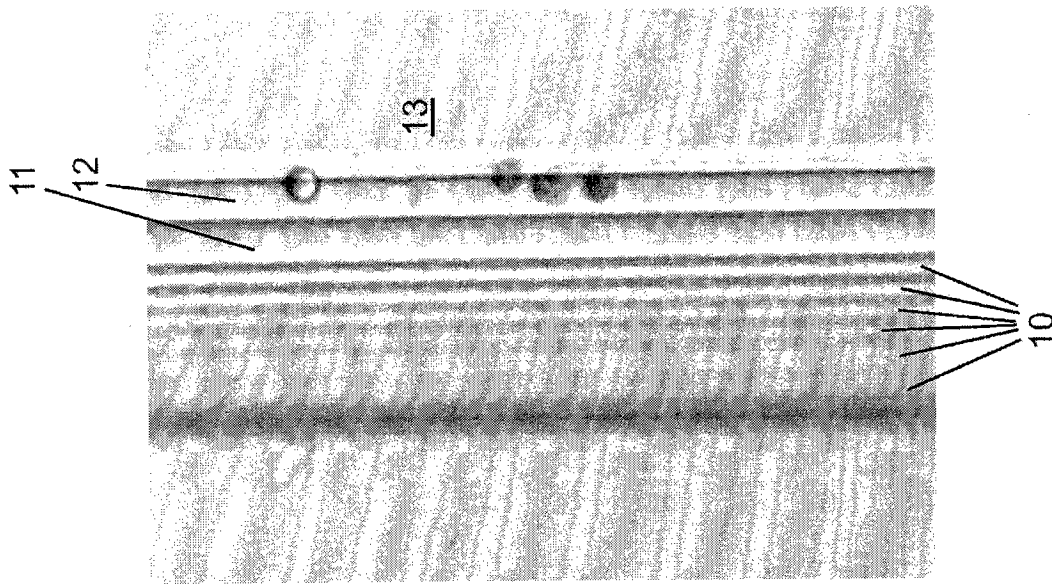


图 10B

专利名称(译)	用设有带长形前导边缘的尺寸差别分离元件的设备隔离颗粒的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN104147853A</a>	公开(公告)日	2014-11-19
申请号	CN201410260357.3	申请日	2014-03-17
[标]申请(专利权)人(译)	粒子分离技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	粒子分离技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	粒子分离技术股份有限公司		
[标]发明人	G·维恰		
发明人	G·维恰		
IPC分类号	B01D43/00 B01D49/00 B01L3/00 B01J19/00 C12M1/00 C12N5/09 C12N5/078 G01N33/49 G01N33/48 G01N33/53		
CPC分类号	B01L2200/12 G01N33/574 C12Q1/24 G01N2015/0288 B01L2300/0864 C12N5/0694 G01N15/0272 G01N33/49 B01L3/502753 B01L2300/0816 B01L3/502761 G01N33/491 B01L2200/0652		
优先权	61/794468 2013-03-15 US 14/077811 2013-11-12 US		
其他公开文献	CN104147853B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本公开涉及一种基于颗粒流动通过台阶化通道的能力来隔离颗粒的设备。颗粒中的至少一些不能够通过由隔离台阶限定的较狭窄通道，从而将颗粒隔离。设备的至少一个台阶的前导边缘幅宽明显大于该台阶所在通道的总宽度，允许高而快的样本吞吐量。本文所述设备和方法能用于隔离多种类型的颗粒。作为实例，它们能用于将循环肿瘤细胞与人的血液样本隔离。

