

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-522166
(P2015-522166A)

(43) 公表日 平成27年8月3日(2015.8.3)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	T
	GO 1 N 33/53	D
	GO 1 N 33/53	K

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁)

(21) 出願番号	特願2015-520711 (P2015-520711)	(71) 出願人	515000926
(86) (22) 出願日	平成25年7月5日 (2013.7.5)		アビバ バイオサイエンシーズ コーポレ イション
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月18日 (2015.2.18)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 921 21-3220, サンディエゴ, ナン シー リッジ ドライブ 6330, ス イート 103
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/049476	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開番号	W02014/008487		弁理士 山本 秀策
(87) 国際公開日	平成26年1月9日 (2014.1.9)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	61/668,990		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成24年7月6日 (2012.7.6)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
(31) 優先権主張番号	13/844,085	(74) 代理人	100181641
(32) 優先日	平成25年3月15日 (2013.3.15)		弁理士 石川 大輔
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

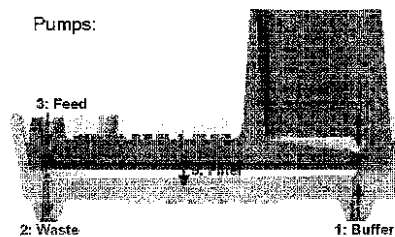
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞を分離または富化するための方法および組成物

(57) 【要約】

本発明は、筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを含む濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する濾過チャンバ、および流体サンプルの細胞を分離する方法であって、a) 本明細書に開示の濾過チャンバに流体サンプルを分注すること、b) 濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらすことを含み、流体サンプルの成分が成分のサイズ、形状、または変形能に基づき、フィルタを通して通流し、またはフィルタに保持される、方法を提供する。

FIGURE 33



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、該濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備え、該前方チャンバの流体流路が該濾過後サブチャンバの流体流路と実質的に対向する、濾過チャンバ。

【請求項 2】

前記前方チャンバおよび該濾過後サブチャンバのそれぞれが流入ポートおよび/または流出ポートを有する、請求項 1 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 3】

前記前方チャンバが少なくとも 2 つの流入ポートを備える、請求項 2 に記載の濾過チャンバ。 10

【請求項 4】

前記前方チャンバが上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを作製する、請求項 3 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 5】

前記前方チャンバと前記上方チャンバとの間の前記上方フィルタがゆっくりした流動条件下において平坦度を維持するのに十分な硬さがある、請求項 4 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6】

前記上方フィルタが約 5 ミクロンより小さい開口部を有する孔またはスロットを備える、請求項 4 または 5 に記載の濾過チャンバ。 20

【請求項 7】

前記流入ポートおよび流出ポートを交換可能に使用することができる、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 8】

前記微細加工されたフィルタが 1 つまたは複数のテーパ状のスロットを備える、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 9】

前記微細加工されたフィルタが約 1 0 0 ~ 5 , 0 0 0 , 0 0 0 個のテーパ状のスロットを備える、請求項 8 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 10】 30

前記微細加工されたフィルタの厚さが約 2 0 ~ 約 2 0 0 ミクロンである、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 11】

前記微細加工されたフィルタの厚さが約 4 0 ~ 約 7 0 ミクロンである、請求項 10 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 12】

前記テーパ状のスロットがおよそ 2 0 ミクロン ~ 2 0 0 ミクロン長および約 2 ミクロン ~ 約 1 6 ミクロン幅であり、該スロットのテーパリングが約 0 度 ~ 約 1 0 度であり、該テーパ状のスロットのスロットサイズのばらつきが約 2 0 % 未満である、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。 40

【請求項 13】

前記テーパ状のスロットのサイズが 2 0 % 超で変化する、請求項 8 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 14】

前記テーパ状のスロットのサイズが 5 0 % 超で変化する、請求項 13 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 15】

前記テーパ状のスロットのサイズが 1 0 0 % 超で変化する、請求項 14 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 16】 50

前記テーパ状のスロットのサイズが前記前方チャンバの流体流路に沿って変化する、請求項 13 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 17】

前記濾過後サブチャンバが少なくとも 2 つの流出ポートを備える、請求項 2 ~ 16 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 18】

前記少なくとも 2 つの流出ポートが前記前方チャンバの流体流路に沿って配列される、請求項 17 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 19】

2 つ以上の電極を備える、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

10

【請求項 20】

前記電極が前記微細加工されたフィルタの反対側に配置される、請求項 19 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 21】

前記電極が前記濾過チャンバの筐体に配置される、請求項 19 または 20 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 22】

前記電極が前記前方チャンバおよび / または前記濾過後サブチャンバに配置される、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 23】

前記電極が前記前方チャンバおよび / または前記濾過後サブチャンバと相互作用する該ポートまたは接続の 1 つまたは複数に組み込まれ、または配置される、請求項 19 ~ 21 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

20

【請求項 24】

前記濾過チャンバが少なくとも 1 つの音響要素を備える、請求項 1 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 25】

前記前方チャンバの流出ポートが収集チャンバまたは収集ウェルに接続される、請求項 1 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 26】

前記筐体が頂部部分および底部部分を備え、該頂部部分および該底部部分が一緒になって係合し、または接合して前記濾過チャンバを形成する、請求項 1 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

30

【請求項 27】

前記濾過チャンバが約 1 mm ~ 約 10 cm の長さ、約 1 mm ~ 約 3 cm の幅、および約 0.02 mm ~ 約 20 mm の深さを有する、請求項 1 ~ 26 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 28】

前記濾過チャンバが約 10 mm ~ 約 50 mm の長さ、約 5 mm ~ 約 20 mm の幅、および約 0.05 mm ~ 約 2.5 mm の深さを有する、請求項 27 に記載の濾過チャンバ。

40

【請求項 29】

前記濾過チャンバが約 30 mm の長さ、約 6 mm の幅、および約 1 mm の深さを有する、請求項 28 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 30】

前記筐体が外形寸法として約 38 mm の長さ、約 12 mm の幅、および約 20 mm の深さを有する、請求項 1 ~ 29 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 31】

前記前方チャンバが約 1 mm ~ 約 10 cm の長さ、約 1 mm ~ 約 3 cm の幅、および約 0.01 mm ~ 約 10 mm の深さを有する、請求項 27 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

50

- 【請求項 3 2】
前記前方チャンバが約 1 0 m m ~ 約 5 0 m m の長さ、約 5 m m ~ 約 2 0 m m の幅、および約 0 . 0 1 m m ~ 約 1 m m の深さを有する、請求項 3 1 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 3 3】
前記前方チャンバが約 3 0 m m の長さ、約 6 m m の幅、および約 0 . 1 ~ 0 . 4 m m の深さを有する、請求項 3 2 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 3 4】
前記前方チャンバの容量が約 0 . 0 1 μ L ~ 約 5 m L である、請求項 3 1 ~ 3 3 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。 10
- 【請求項 3 5】
前記前方チャンバの容量が約 1 μ L ~ 約 1 0 0 μ L である、請求項 3 4 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 3 6】
前記前方チャンバの容量が約 4 0 ~ 8 0 μ L である、請求項 3 5 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 3 7】
前記濾過後サブチャンバが約 1 m m ~ 約 1 0 c m の長さ、約 1 m m ~ 約 3 c m の幅、および約 0 . 0 1 m m ~ 約 1 c m の深さを有する、請求項 2 7 ~ 3 6 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。 20
- 【請求項 3 8】
前記濾過後サブチャンバが約 1 0 m m ~ 約 5 0 m m の長さ、約 5 m m ~ 約 2 0 m m の幅、および約 0 . 2 m m ~ 約 1 . 5 m m の深さを有する、請求項 3 7 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 3 9】
前記濾過後サブチャンバが約 3 0 m m の長さ、約 6 . 4 m m の幅、および約 0 . 6 ~ 1 m m の深さを有する、請求項 3 8 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 4 0】
筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、該フィルタの表面および/または該筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する、濾過チャンバ。 30
- 【請求項 4 1】
前記濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備える、請求項 4 0 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 4 2】
前記前方チャンバが上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを作製する、請求項 4 1 の濾過チャンバ。
- 【請求項 4 3】
前記上方フィルタの表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生じる、請求項 4 2 に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 4 4】
前記修飾が物理蒸着による、請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。 40
- 【請求項 4 5】
前記修飾がプラズマ強化化学蒸着による、請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 4 6】
前記蒸着が金属窒化物または金属ハロゲン化物のものである、請求項 4 0 ~ 4 3 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。
- 【請求項 4 7】
前記金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である、請求項 4 6 に記載の濾過チャンバ。 50

【請求項 48】

前記修飾が化学蒸着による、請求項 40～43のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 49】

前記化学蒸着がパリレンまたはその誘導体による、請求項 48 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 50】

前記パリレンまたはその誘導体がパリレン、パリレン - N、パリレン - D、パリレン A F - 4、パリレン S F、およびパリレン H T からなる群から選択される、請求項 49 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 51】

前記修飾がポリテトラフルオロエチレン (P T F E) による、請求項 48 に記載の濾過チャンバ。

10

【請求項 52】

前記修飾が T e f l o n - A F による、請求項 48 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 53】

前記修飾がパーフルオロカーボンによる、請求項 40 または 43 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 54】

前記パーフルオロカーボンが 1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ (1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチル) シランまたはトリクロロ (オクタデシル) シランであり、液体形態である、請求項 53 に記載の濾過チャンバ。

20

【請求項 55】

前記フィルタおよび / または筐体がケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、金属、炭素、セラミック、プラスチック、またはポリマーを含む、請求項 40～54 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 56】

前記フィルタおよび / または筐体が窒化ケイ素または窒化ホウ素を含む、請求項 40～54 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 57】

筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、該フィルタの表面および / または該筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレンもしくはその誘導体、ポリテトラフルオロエチレン (P T F E)、T e f l o n - A F またはパーフルオロカーボンにより修飾する、濾過チャンバ。

30

【請求項 58】

前記濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備える、請求項 57 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 59】

前記前方チャンバが上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを作製する、請求項 58 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 60】

前記上方フィルタの表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレンもしくはその誘導体、ポリテトラフルオロエチレン (P T F E)、T e f l o n - A F またはパーフルオロカーボンにより修飾する、請求項 59 に記載の濾過チャンバ。

40

【請求項 61】

前記金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および / または窒化ホウ素である、請求項 57～60 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 62】

前記パリレンまたはその誘導体がパリレン、パリレン - N、パリレン - D、パリレン A F - 4、パリレン S F、およびパリレン H T からなる群から選択される、請求項 57～60 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

50

【請求項 6 3】

前記パーフルオロカーボンが 1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ (1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチル) シランまたはトリクロロ (オクタデシル) シランであり、前記パーフルオロカーボンが前記表面に共有結合する、請求項 5 7 ~ 6 0 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6 4】

前記フィルタおよび / または筐体がケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、金属、炭素、セラミック、プラスチック、またはポリマーを含む、請求項 5 7 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6 5】

前記フィルタおよび / または筐体が窒化ケイ素または窒化ホウ素を含む、請求項 5 7 ~ 6 3 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6 6】

前記フィルタの表面および / または前記筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6 7】

前記蒸着が金属窒化物または金属ハロゲン化物のものである、請求項 6 6 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6 8】

前記金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および / または窒化ホウ素である、請求項 6 7 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 6 9】

前記修飾が化学蒸着による、請求項 6 6 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 0】

前記修飾がパーフルオロカーボンによる、請求項 6 6 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 1】

前記パーフルオロカーボンが 1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ (1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチル) シランまたはトリクロロ (オクタデシル) シランであり、液体形態である、請求項 7 0 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 2】

前記フィルタの表面および / または前記筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレン、ポリテトラフルオロエチレン (P T F E)、T e f l o n - A F またはパーフルオロカーボンにより修飾する、請求項 1 ~ 3 9 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 3】

前記金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および / または窒化ホウ素である、請求項 7 2 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 4】

前記パーフルオロカーボンが 1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ (1 H , 1 H , 2 H , 2 H - パーフルオロオクチル) シランまたはトリクロロ (オクタデシル) シランであり、該パーフルオロカーボンが前記表面に共有結合する、請求項 7 2 に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 5】

少なくとも 2 つの微細加工されたフィルタを備える、請求項 1 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバ。

【請求項 7 6】

10

20

30

40

50

前記少なくとも2つの微細加工されたフィルタが縦一列に配列される、請求項75に記載の濾過チャンバ。

【請求項77】

縦一列に配列された請求項1～76のいずれか1項に記載の少なくとも2つの濾過チャンバを備える、濾過チャンバ。

【請求項78】

前記少なくとも2つの濾過チャンバの前方チャンバが流体接続状態にある、請求項77に記載の濾過チャンバ。

【請求項79】

前記少なくとも2つの濾過チャンバが1つの微細加工されたフィルタおよび/または上方フィルタを共有する、請求項78に記載の濾過チャンバ。

10

【請求項80】

各濾過チャンバ内の前記フィルタのスロットが様々な幅のものであり、該濾過チャンバがスロット幅が大きくなる順に配列される、請求項77または78に記載の濾過チャンバ。

【請求項81】

請求項1～80のいずれか1項に記載の濾過チャンバを備える、カートリッジ。

【請求項82】

少なくとも2つの濾過チャンバを備える、請求項81に記載のカートリッジ。

【請求項83】

8個の濾過チャンバを備える、請求項82に記載のカートリッジ。

20

【請求項84】

請求項1～80のいずれか1項に記載の濾過チャンバを備える、流体サンプル中の標的成分を分離するための自動濾過ユニット。

【請求項85】

前記濾過チャンバの流体流動を制御するための制御アルゴリズムをさらに備える、請求項84に記載の自動濾過ユニット。

【請求項86】

少なくとも2つの濾過チャンバを備える、請求項84または85に記載の自動濾過ユニット。

30

【請求項87】

前記少なくとも2つの濾過チャンバが縦一列に配列され、該濾過チャンバがスロット幅が大きくなるフィルタを備える、請求項86に記載の自動濾過ユニット。

【請求項88】

前記フィルタが前記流路に沿ってサイズが大きくなるスロット幅を含有する、請求項86または87に記載の自動濾過ユニット。

【請求項89】

上方チャンバを備える、請求項88に記載の自動濾過ユニット。

【請求項90】

前記濾過後サブチャンバが、複数の仕切りを備え、各仕切りが流出ポートを含む、請求項84～89のいずれか1項に記載の自動濾過ユニット。

40

【請求項91】

前記濾過後チャンバの各仕切りからの該流出ポートがマルチウェルプレートの個々のウェルと整列する、請求項90に記載の自動濾過。

【請求項92】

前記ウェルが約1～100mm毎に配置される、請求項91に記載の自動濾過。

【請求項93】

前記ウェルが約2.25mm毎に配置される、請求項91に記載の自動濾過。

【請求項94】

前記ウェルが約4.5mm毎に配置される、請求項91に記載の自動濾過。

50

- 【請求項 95】
前記ウェルが約 9 または 18 mm 毎に配置される、請求項 91 に記載の自動濾過。
- 【請求項 96】
8 個の濾過チャンバを備える、請求項 84 ~ 95 のいずれか 1 項に記載の自動濾過ユニット。
- 【請求項 97】
前記濾過チャンバで流体流動を生じさせるための手段を備える、請求項 84 ~ 96 のいずれか 1 項に記載の自動濾過ユニット。
- 【請求項 98】
前記流体流動を生じさせるための手段が流体ポンプである、請求項 97 に記載の自動濾過ユニット。 10
- 【請求項 99】
前記分離した標的成分を収集するための手段を備える、請求項 84 ~ 98 のいずれか 1 項に記載の自動濾過ユニット。
- 【請求項 100】
請求項 84 ~ 98 のいずれか 1 項に記載の自動濾過ユニットおよび該濾過ユニットに接続された分析装置を備える、流体サンプル中の標的成分を分離し、そして分析する自動システム。
- 【請求項 101】
前記分析装置が細胞選別デバイスまたはフローサイトメーターである、請求項 100 の自動システム。 20
- 【請求項 102】
流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、
a) 請求項 1 ~ 80 のいずれか 1 項に記載の濾過チャンバに該流体サンプルを分注する工程と、
b) 該濾過チャンバを通して該流体サンプルの流体流動をもたらす工程であって、該流体サンプルの標的成分が該フィルタに保持され、または該フィルタを通過する、工程とを含む、方法。
- 【請求項 103】
前記濾過チャンバの前方チャンバを通る前記流体サンプルの流体流動、および前記濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通る溶液の流体流動をもたらす、必要に応じて、前記濾過チャンバの上方チャンバを通る溶液の流体流動をもたらす工程を含む、請求項 102 に記載の方法。 30
- 【請求項 104】
前記流体サンプルが前記成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および / または結合特異性に基づき分離される、請求項 102 または 103 に記載の方法。
- 【請求項 105】
前記流体サンプルが前記前方チャンバの流入ポートを通して分注される、請求項 103 または 104 に記載の方法。
- 【請求項 106】
前記溶液が前記濾過後サブチャンバの流入ポートに導入される、請求項 103 ~ 105 のいずれか 1 項に記載の方法。 40
- 【請求項 107】
前記溶液が前記上方濾過チャンバの流入ポートに導入される、請求項 103 ~ 105 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 108】
前記流体サンプルが前記フィルタの外部にある構造および / または前記フィルタに組み込まれた構造を介して作用する物理的な力で操作される、請求項 102 ~ 107 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【請求項 109】 50

前記物理的な力が誘電泳動力、進行波誘電泳動力、磁力、音響力、静電力、機械力、光学放射力および熱対流力からなる群から選択される、請求項 108 の方法。

【請求項 110】

該誘電泳動力または該進行波誘電泳動力が電極により生じる電場を介して作用する、請求項 109 の方法。

【請求項 111】

該音響力が定在波音場または進行波音場を介して作用する、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 112】

該音響力が圧電材料により生じる音場を介して作用する、請求項 109 に記載の方法。

10

【請求項 113】

該音響力がボイスコイルまたはオーディオスピーカーを介して作用する、請求項 109 の方法。

【請求項 114】

前記静電力が直流 (DC) 電場を介して作用する、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 115】

前記光学放射力がレーザーピンセットを介して作用する、請求項 109 に記載の方法。

【請求項 116】

前記流体サンプルが血液、滲出液、尿、骨髓サンプル、腹水、骨盤洗浄液、胸膜液、髄液、リンパ液、血清、粘液、痰、唾液、精液、眼液、鼻腔の抽出物、咽頭もしくは生殖器スワブ、消化組織由来の細胞懸濁液、糞便材料の抽出物、混合種および/もしくは混合サイズのいずれかの培養細胞、または除去される必要のある汚染物質または未結合の反応物質を含有する細胞である、請求項 102 ~ 115 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 117】

前記流体サンプルが血液サンプルであり、除去される成分が血漿、血小板および/または赤血球細胞 (RBC) である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 118】

前記流体サンプルが、除去される必要のある汚染物質または未結合の反応物質を含有する細胞であり、該反応物質が該細胞を標識する試薬である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 119】

前記流体サンプルが血液サンプルであり、前記標的成分が有核細胞、例えば、非造血細胞、血液細胞の亜集団、胎児赤血球細胞、幹細胞、またはがん性細胞である、請求項 116 に記載の方法。

30

【請求項 120】

前記流体サンプルが滲出液サンプルまたは尿サンプルであり、前記標的成分が有核細胞、例えば、がん性細胞または非造血細胞である、請求項 116 に記載の方法。

【請求項 121】

請求項 84 ~ 99 のいずれか 1 項に記載の自動濾過ユニットを使用する流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、

a) 前記濾過チャンバに該流体サンプルを分注する工程と、

40

b) 前記濾過チャンバを通して該流体サンプルの流体流動をもたらす工程であって、該流体サンプルの標的成分が該フィルタに保持され、または該フィルタを通して流れる、工程と

を含む、方法。

【請求項 122】

前記流体サンプルが前記成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基づき分離される、請求項 121 に記載の方法。

【請求項 123】

前記前方チャンバの流体サンプルが前記濾過後サブチャンバの溶液に実質的に逆平行に流れる、請求項 121 または 122 に記載の方法。

50

【請求項 1 2 4】

前記フィルタ速度が約 0 ~ 5 mL / 分である、請求項 1 2 1 ~ 1 2 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 5】

前記フィルタ速度が約 1 0 ~ 5 0 0 μ L / 分である、請求項 1 2 4 に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

前記フィルタ速度が約 8 0 ~ 1 4 0 μ L / 分である、請求項 1 2 5 に記載の方法。

【請求項 1 2 7】

該供給速度が該フィルタ速度の約 1 ~ 1 0 倍である、請求項 1 2 4 ~ 1 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 1 2 8】

c) 前記流体サンプルの保持成分を、さらなるサンプル非含有洗浄試薬で洗浄する工程をさらに含む、請求項 1 0 2 ~ 1 2 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

前記洗浄工程中、前記供給速度が前記フィルタ速度未満またはこれに等しい、請求項 1 2 8 に記載の方法。

【請求項 1 3 0】

洗浄試薬が前記濾過後サブチャンバに導入される、請求項 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。

【請求項 1 3 1】

前記洗浄試薬が前記前方チャンバおよび / または前記上方チャンバに導入される、請求項 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。

20

【請求項 1 3 2】

d) 前記標的成分に結合させるための標識試薬を提供する工程をさらに含む、請求項 1 0 2 ~ 1 3 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 3】

前記標識試薬が抗体である、請求項 1 3 2 に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記標識試薬が前記収集チャンバに添加される、請求項 1 3 2 または 1 3 3 に記載の方法。

30

【請求項 1 3 5】

前記標識試薬が前記前方チャンバおよび / または前記上方チャンバに添加される、請求項 1 3 2 または 1 3 3 に記載の方法。

【請求項 1 3 6】

前記標識工程中、前記濾過後サブチャンバの流体流動が休止する、請求項 1 3 2 ~ 1 3 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 7】

e) 前記未結合の標識試薬を除去する工程をさらに含む、請求項 1 3 2 ~ 1 3 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 3 8】

f) 該収集チャンバの該標的成分を回収する工程をさらに含む、請求項 1 0 2 ~ 1 3 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 1 3 9】

前記回収工程中、前記供給速度が約 5 ~ 2 0 mL / 分である、請求項 1 3 8 に記載の方法。

【請求項 1 4 0】

前記回収工程中、前記流出速度が前記濾過後サブチャンバの前記流入速度に等しい、請求項 1 3 8 または 1 3 9 に記載の方法。

【請求項 1 4 1】

前記回収工程中、前記流出が約 5 0 m 秒間停止する、請求項 1 3 8 ~ 1 4 0 のいずれか

50

1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 2】

前記流体サンプルが血液サンプルであり、特異的結合メンバーを使用して望ましくない成分の少なくとも 1 種を除去することを含む、請求項 1 2 1 ~ 1 4 1 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 3】

前記少なくとも 1 種の望ましくない成分が白血球細胞 (W B C) である、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【請求項 1 4 4】

前記特異的結合メンバーが W B C に選択的に結合し、固体支持体に連結する、請求項 1 4 3 に記載の方法。

【請求項 1 4 5】

前記特異的結合メンバーが W B C に選択的に結合する抗体または抗体フラグメントである、請求項 1 4 4 に記載の方法。

【請求項 1 4 6】

前記特異的結合メンバーが C D 3、C D 1 1 b、C D 1 4、C D 1 7、C D 3 1、C D 4 5、C D 5 0、C D 5 3、C D 6 3、C D 6 9、C D 8 1、C D 8 4、C D 1 0 2 または C D 1 6 6 に選択的に結合する抗体である、請求項 1 4 5 に記載の方法。

【請求項 1 4 7】

前記特異的結合メンバーが C D 3 5 および / または C D 5 0 に選択的に結合する抗体である、請求項 1 4 6 に記載の方法。

【請求項 1 4 8】

前記血液サンプルを第 2 の特異的結合メンバーと接触させる工程をさらに含む、請求項 1 4 2 ~ 1 4 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 4 9】

前記第 2 の特異的結合メンバーが C D 3 1、C D 3 6、C D 4 1、C D 4 2 (a、b または c)、C D 5 1 または C D 5 1 / 6 1 に選択的に結合する抗体である、請求項 1 4 8 に記載の方法。

【請求項 1 5 0】

請求項 1 0 0 または 1 0 1 に記載の自動システムを使用する流体サンプルの標的成分を富化し、そして分析する方法であって、

a) 前記濾過チャンバに該流体サンプルを分注する工程、

b) 前記濾過チャンバの前方チャンバを通る該流体サンプルの流体流動、および前記濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通る溶液の流体流動をもたらす工程であって、該流体サンプルの標的成分が該前方チャンバに保持され、非標的成分が該濾過後サブチャンバに該フィルタを通して流れる、工程、

c) 該標的成分を標識する工程、および

d) 前記分析装置を使用して該標識された標的成分を分析する工程

を含む、方法。

【請求項 1 5 1】

前記上方チャンバに流体流動をもたらすことを含む、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 2】

前記標的成分が細胞または細胞小器官である、請求項 1 5 0 または 1 5 1 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

前記細胞が有核細胞である、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

前記細胞が希少細胞である、請求項 1 5 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、「細胞を分離または富化するための方法および組成物」というタイトルであり、2013年3月15日に出願され、現在係属中の米国特許出願第13/844,085号の優先権の利益を主張し、この米国特許出願は、「細胞を分離または富化するための方法および組成物」というタイトルの、2012年7月6日に出願された、米国特許出願第61/668,990号の優先権の利益を主張する。本出願は、「生物学的サンプル由来の希少細胞を検出するための方法および組成物」というタイトルであり、2007年7月13日に出願され、現在出願放棄されている、米国特許出願第11/777,962号、「生物学的サンプル由来の希少細胞を検出するための方法および組成物」というタイトルであり、2006年7月14日に出願された米国特許出願第60/831,156号、流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法および組成物」というタイトルであり、2006年8月2日に出願され、現在係属中の米国特許出願11/497,919号、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための改善された方法および組成物」というタイトルであり、2005年8月2日に出願された米国特許出願第60/704,601号、「血液サンプル由来の非造血細胞を検出するための方法および組成物」というタイトルであり、2005年10月31日に出願され、現在特許されている、米国特許出願第11/264,413号、2005年8月2日に出願され、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための改善された方法および組成物」というタイトルである米国仮特許出願第60/704,601号、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法、組成物および自動システム」というタイトルであり、2004年9月15日に出願された米国特許出願PCT/US2004/030359、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法、組成物および自動システム」というタイトルであり、2003年11月4日に出願され、現在米国特許第7,166,443号B2である、米国特許出願第10/701,684号、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法、組成物および自動システム」というタイトルであり、2002年10月10日に出願され、現在米国特許第6,949,355号B2である、米国特許出願第10/268,312号、2001年10月29日に出願され、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法および自動システム」というタイトルである米国仮特許出願第60/348,228号、2001年10月11日に出願され、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法および自動システム」というタイトルである、米国仮特許出願第60/328,724号、および2002年7月9日に出願され、「流体サンプル由来の希少細胞を分離するための方法および自動システム」というタイトルである米国仮特許出願第60/394,517号に関連する。上記の引用された特許、出願および仮出願の内容は、それらの全体が参照によって本開示に組み込まれる。

【0002】

本発明は概ね生物分離の分野、および特に生物学的サンプル処理の分野に関する。

【背景技術】

【0003】

サンプル調製は、生物学的および環境サンプルの多くの遺伝的、生化学的、および生物学的分析に必要な工程である。サンプル調製は多くの場合、サンプルの残りの成分から目的のサンプル成分を分離することが求められる。このような分離は多くの場合、かなりの労力を要し、自動化が困難である。

【0004】

多くの場合、分離はサンプルの比較的希少な成分を分析するために必要となる。この場合、分析される希少な成分の濃度を増加させること、および目的の成分の分析に干渉し得るサンプルの望ましくない成分を除去することがともに必要となり得る。したがって、サンプルを「分解」してその容量を減少させ、さらに目的の成分を富化させることができる分離技法を行う必要がある。これは特に、多量に採取することができるが、微量の割合

の標的細胞（例えば、ウイルス感染細胞、抗腫瘍T細胞、炎症性細胞、がん細胞、または胎児細胞）を含有し得る生物学的サンプル、例えば、腹水、リンパ液、または血液に当てはまり、これらの分離が疾患状態の基礎の理解ならびに治療の診断および開発に非常に重要となる。

【0005】

濾過は、サンプル成分がフィルタを通して流れる、またはフィルタに保持される性質に基づき、サンプル量を減少させ、サンプル成分を分離する方法として使用されてきた。典型的には、膜フィルタが相互に連結された繊維状の構造分布を有し、膜の孔が別々に単離されていない代わりに不規則な形状であり、膜内で互いに連結する膜フィルタが、このような用途に使用される。いわゆる「孔」のサイズは、実際には膜内の流動空間（例えば、孔）の不規則な蛇行に依存する。膜フィルタを多くの分離用途に使用することができる一方で、孔のサイズおよび孔の不規則な形状のばらつきが、粒子のサイズおよび他の性質に基づいた正確な濾過での使用の妨げとなっている。

10

【0006】

微細加工されたフィルタが特定の細胞または分子の分離用途のために作製されている。これらの微細加工された構造は孔をもたないが、むしろ「ブリック」（例えば、参照により組み込まれる1998年11月17日にAustinらに交付された米国特許第5,837,115号を参照のこと）またはチップの表面に構成されるダム（例えば、参照により組み込まれる1998年3月10日にWildingらに交付された米国特許第5,726,026号を参照のこと）を使用することにより1つまたは複数のチップにマイクロエッチングされたチャンネルを備える。これらの微細加工されたフィルタは正確な形状を有する一方で、これらのフィルタの形状が制限となり、フィルタの濾過面積が小さいという制限があり、そのためこれらのフィルタは少量の流体サンプルを処理するに過ぎない。

20

【0007】

サンプル調製および分析において、血液サンプルは特別な難題を含む。血液サンプルは対象から容易に得られ、大量の代謝の、診断の、予後の、および遺伝的な情報を得ることができる。しかし、非常に多量の非有核赤血球細胞、およびそれらの主な成分のヘモグロビンが遺伝的、代謝的、および診断の試験の障害となり得る。末梢血由来の赤血球細胞の分解は、高密度溶液の様々な層にわたり行われている（例えば、1995年8月1日にTeng、Nelson N.H.らに交付された米国特許第5,437,987号を参照のこと）。デキストランなどの長鎖ポリマーを使用して赤血球細胞の凝集を誘発させ、長鎖の赤血球細胞を形成している（Sewchand LS, Canham PB. (1979) 'Modes of Rouleaux formation of human red blood cells in polyvinylpyrrolidone and dextran solutions' Can. J. Physiol. Pharmacol. 57(11): 1213-22)。しかし、これらの方法の赤血球細胞を除去する効率は、特に希少細胞、例えば、母体血由来の胎児細胞または患者由来のがん細胞などの分離または富化が望まれる場合に最適とは言えない。また、細胞溶解技法も使用して赤血球細胞を除去している。しかし、細胞溶解技法の欠点として、非特異的有核細胞溶解物、細胞溶解の結果としての赤血球細胞の細胞片を含み、および細胞容量の変化の可能性がある（Resnitzky P, Reichman N. (1978) 'Osmotic fragility of peripheral blood lymphocytes in chronic lymphatic leukemia and malignant lymphoma' Blood 51(4): 645-651)。

30

40

【0008】

体液中の剥離した細胞（例えば、痰、尿、またはさらに腹水（ascetic fluid）あるいは他の滲出液）は、前がん病変の検出の、および新生物成長の初期段階のがんの根絶の重要な機会を示す。例えば、尿細胞診は、移行細胞癌腫の診断および調査のための非侵襲的試験として広く受け入れられている（Larssonら(2001) Molecular Diagnosis 6: 181-188)。しかし、多くの場合、剥離し

50

た異常な細胞の細胞学的識別は、単離した異常な細胞の数により制限されてきた。一般的な尿細胞診 (Ahrendtら (1999) J. Natl. Cancer Inst. 91: 299-301) において、全体の感受性は50%未満であり、これは腫瘍悪性度、腫瘍病期、および尿採取ならびに使用される処理方法とともに変化する。分子および遺伝子バイオマーカーに基づいた体液中の剥離した異常細胞の分子分析 (例えば、インサイチュのハイブリダイゼーション、PCR、マイクロアレイなどの使用) は、細胞診の感受性をかなり向上させることができる。バイオマーカー研究と臨床の実施におけるバイオマーカーの使用はともに、剥離した細胞だけでなく、正常な細胞、細菌、体液、体タンパク質および他の細胞片も含む体液から富化された比較的純粋な剥離した細胞集団を必要とする。したがって、剥離した異常細胞を体液から富化および単離する効率的な富化方法を開発することが早急に必要とされる。

10

【0009】

Meyerら, Int. J. Oncol., 21(3): 521-30 (2002) は、半自動CD45 枯渇自動MACSプロトコールによる血液サンプル中の泌尿器系腫瘍細胞の単離および富化について報告し、Iinumaら, Int. J. Cancer, 89(4): 337-44 (2000) は、CD45の磁気による細胞分離の後、直腸結腸がんの患者のp53およびK-ras遺伝子のネステッド突然変異体アレル特異的増幅を使用した血液中の腫瘍細胞の検出について報告している。両試験では、腫瘍細胞を血液サンプルからフィコール勾配遠心分離により単離された単核細胞(MNC)と混合した。次いで、腫瘍細胞を、抗CD45抗体を使用する陰性枯渇法によりMNCから富化した。

20

【0010】

体液、例えば、血液サンプルから剥離した細胞を富化および調製する現在の手法は、媒体系分離、抗体捕捉、遠心分離および膜濾過を使用する。これらの技法は簡易であり、直接的である一方で、これらの技法は、希少細胞富化の効率の不十分さ、希少細胞検出の感受性の低さ、大量のサンプルを扱う困難さ、富化性能の一貫性の欠如および分離手順の労力の過酷さを含む多くの制限に悩まされる。

比較的少量のサンプル、例えば、大量の生物学的流体サンプル、および個別の標的細胞を処理することができる効率的および/または自動可能なサンプル調製の方法およびデバイスを提供することが必要とされる。本発明はこれらの利点および他の利点を提供する。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】米国特許第5,837,115号明細書

【特許文献2】米国特許第5,726,026号明細書

【特許文献3】米国特許第5,437,987号明細書

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Sewchand LS, Canham PB. (1979) 'Modes of Rouleaux formation of human red blood cells in polyvinylpyrrolidone and dextran solutions' Can. J. Physiol. Pharmacol. 57(11): 1213-22

40

【非特許文献2】Resnitzky P, Reichman N. (1978) 'Osmotic fragility of peripheral blood lymphocytes in chronic lymphatic leukemia and malignant lymphoma' Blood 51(4): 645-651

【非特許文献3】Larssonら (2001) Molecular Diagnosis 6: 181-188

【非特許文献4】Ahrendtら (1999) J. Natl. Cancer Inst

50

. 9 1 : 2 9 9 - 3 0 1

【非特許文献5】Meyers, Int. J. Oncol., 21(3): 521-30 (2002)

【非特許文献6】Iinuma, Int. J. Cancer, 89(4): 337-44 (2000)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0013】

いくつかの態様において、本発明は、多くの病態の診断、予後、および処置を複合流体サンプル由来の標的細胞および/または細胞小器官の富化に依存し得ることが理解される。多くの場合、富化は細胞のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に従い細胞を濾過するスロットを有する濾過デバイスを使用して、1つまたは複数の分離工程によりなされ得る。例えば、有核細胞を濾過デバイスを使用して末梢血サンプルの非有核赤血球細胞から分離することができる。細胞溶解技法に基づいた赤血球細胞の除去の比較において、本出願に開示される濾過デバイスは、赤血球細胞のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基づいてこれらの細胞を枯渇することができ、非特異的な溶解により有核細胞の消失を最小限にすることができる。さらに、有核細胞の容量の変化が最小となり、遠心分離の工程が不必要となる。

特に、母体血サンプル由来の胎児細胞の分離は、胎児異常または種々の遺伝子状態の検出に大いに役立ち得る。いくつかの態様において、本発明は、患者サンプル由来の希少悪性細胞の富化または分離、例えば、患者体液サンプル由来のがん性細胞の単離がこのような悪性細胞の検出および分類に役立つことができるため、診断および予後に、ならびに患者の治療手段の開発に役立つことができることが理解される。

【0014】

第1の態様において、本発明は、筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備え、前方チャンバ内の流体流路が濾過後サブチャンバの流体流路と実質的に対向する、濾過チャンバを提供する。いくつかの実施形態において、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバのそれぞれが流入ポートおよび/または流出ポートを有する。いくつかの実施形態において、前方チャンバは少なくとも2つの流入ポートを備える。いくつかの実施形態において、前方チャンバは上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを構成し、上方フィルタを微細加工されたフィルタに対面する側に配置することができる。いくつかの実施形態において、前方チャンバと上方チャンバの間にある上方フィルタは、遅い流動条件下においてその平坦度を維持するのに十分な硬さのものである。いくつかの実施形態において、上方フィルタは約5ミクロンより小さい開口部を有する孔またはスロットを備える。いくつかの実施形態において、流入ポートおよび流出ポートを交換可能に使用することができる。いくつかの実施形態において、微細加工されたフィルタは1つまたは複数のテーパ状のスロットを備える。いくつかの実施形態において、微細加工されたフィルタは約100~5,000,000個のテーパ状のスロットを備える。いくつかの実施形態において、微細加工されたフィルタの厚さは約20~約200ミクロンである。いくつかの実施形態において、微細加工されたフィルタの厚さは約40~約70ミクロンである。いくつかの実施形態において、テーパ状のスロットはおよそ20ミクロン~200ミクロン長であり、約2ミクロン~約16ミクロン幅であり、上記のスロットのテーパリングは約0度~約10度であり、上記のテーパ状のスロットのスロットサイズのばらつきは約20%未満である。いくつかの実施形態において、テーパ状のスロットのサイズは20%超で変化する。いくつかの実施形態において、テーパ状のスロットのサイズは50%超で変化する。いくつかの実施形態において、テーパ状のスロットのサイズは100%超で変化する。いくつかの実施形態において、テーパ状のスロットのサイズは前方チャンバの流体流路に沿って変化する。いくつかの実施形態において、濾過後サブチャンバは少なくとも2つの流出ポートを備える。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの流出ポ

10

20

30

40

50

トは前方チャンバの流体流路に沿って配列される。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは2つ以上の電極を備える。いくつかの実施形態において、電極は微細加工されたフィルタの反対側に配置される。いくつかの実施形態において、電極は濾過チャンバの筐体に配置される。いくつかの実施形態において、電極は前方チャンバおよび/または濾過後サブチャンバに配置される。いくつかの実施形態において、電極を前方チャンバおよび/または濾過後サブチャンバと相互作用するポートまたは接続の1つまたは複数に組み込み、または配置する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは少なくとも1つの音響要素(acoustic element)を備える。いくつかの実施形態において、前方チャンバの流出ポートを収集チャンバまたは収集ウェルに接続する。いくつかの実施形態において、筐体は頂部部分と底部部分を備え、頂部部分と底部部分は係合し、場合によりともに接合して濾過チャンバを形成し得る。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは約1mm~約10cmの長さ、約1mm~約3cmの幅、および約0.02mm~約20mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは約10mm~約50mmの長さ、約5mm~約20mmの幅、および約0.05mm~約2.5mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは約30mmの長さ、約6mmの幅、および約1mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバを含有する筐体は外寸として約38mmの長さ、約12mmの幅、および約20mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、前方チャンバは約1mm~約10cmの長さ、約1mm~約3cmの幅、および約0.01mm~約10mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、前方チャンバは約10mm~約50mmの長さ、約5mm~約20mmの幅、および約0.01mm~約1mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、前方チャンバは約30mmの長さ、約6mmの幅、および約0.1~0.4mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、前方チャンバの容量は約0.01μL~約5mLである。いくつかの実施形態において、前方チャンバの容量は約1μL~約100μLである。いくつかの実施形態において、前方チャンバの容量は約40~80μLである。いくつかの実施形態において、濾過後サブチャンバは約1mm~約10cmの長さ、約1mm~約3cmの幅、および約0.01mm~約1cmの深さを有する。いくつかの実施形態において、濾過後サブチャンバは約10mm~約50mmの長さ、約5mm~約20mmの幅、および約0.2mm~約1.5mmの深さを有する。いくつかの実施形態において、濾過後サブチャンバは約30mmの長さ、約6.4mmの幅、および約0.6~1mmの深さを有する。

【0015】

第2の態様において、本発明は筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応(vapor-phase surface reaction)、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する濾過チャンバを提供する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備える。いくつかの実施形態において、前方チャンバは上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを構成する。いくつかの実施形態において、上方フィルタの表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する。いくつかの実施形態において、修飾は物理蒸着による。いくつかの実施形態において、修飾はプラズマ強化化学蒸着による。いくつかの実施形態において、蒸着は金属窒化物または金属ハロゲン化物のものである。いくつかの実施形態において、金属窒化物は、窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である。いくつかの実施形態において、修飾は化学蒸着による。いくつかの実施形態において、化学蒸着はパリレンまたはその誘導体による。いくつかの実施形態において、パリレンまたはその誘導体は、パリレン、パリレン-N、パリレン-D、パリレンAF-4、パリレンSF、およびパリレンHTからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、修飾はポリテトラフルオロエチレン(PTFE)による。いくつかの実施形態において、修飾は非晶質Teflon(登録商標)またはTeflon(登録商標)-AFによる。いくつか

の実施形態において、修飾はパーフルオロカーボンによる。いくつかの実施形態において、パーフルオロカーボンは1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ(1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチル)シランまたはトリクロロ(オクタデシル)シランであり、液体形態である。いくつかの実施形態において、フィルタおよび/または筐体は、ケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、金属、炭素、セラミック、プラスチック、またはポリマーを含む。いくつかの実施形態において、フィルタおよび/または筐体は窒化ケイ素または窒化ホウ素を含む。

【0016】

第3の態様において、本発明は筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレンまたはその誘導体、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標) - AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する濾過チャンバを提供する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備える。いくつかの実施形態において、前方チャンバは上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを構成する。いくつかの実施形態において、上方フィルタの表面を、金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレンまたはその誘導体、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標) - AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する。いくつかの実施形態において、金属窒化物は窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である。いくつかの実施形態において、パリレンは、パリレン、パリレン - N、パリレン - D、パリレンAF - 4、パリレンSF、およびパリレンHTからなる群から選択される。いくつかの実施形態において、パーフルオロカーボンは、1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ(1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチル)シランまたはトリクロロ(オクタデシル)シランであり、パーフルオロカーボンは表面と共有結合する。いくつかの実施形態において、フィルタおよび/または筐体は、ケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、金属、炭素、セラミック、プラスチック、またはポリマーを含む。いくつかの実施形態において、フィルタおよび/または筐体は窒化ケイ素または窒化ホウ素を含む。

【0017】

本発明により、筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備え、前方チャンバの流体流路が濾過後サブチャンバの流体流路と実質的に対向し、フィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する濾過チャンバも提供される。さらに本発明において、筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備え、前方チャンバの流体流路が濾過後サブチャンバの流体流路に実質的に対向し、フィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標) - AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する濾過チャンバが提供される。いくつかの実施形態において、本明細書において提供される濾過チャンバは少なくとも2つの微細加工されたフィルタを備えることができる。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの微細加工されたフィルタを縦一列に配列する。よりさらに本発明において、縦一列に配列された本明細書に開示の少なくとも2つの濾過チャンバを備える濾過チャンバが提供される。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの濾過チャンバの前方チャンバは流体接続状態にある。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの濾過チャンバは1つの微細加工されたフィルタおよび/または上方フィルタを共有する。いくつかの実施形態において、各濾過チャンバ内のフィルタのスロットは様々な幅のものであり、濾過チャンバはスロット幅が大きくなる順に配列される。

【0018】

第4の態様において、本発明は本明細書に開示の濾過チャンバを備えるカートリッジを提供する。いくつかの実施形態において、カートリッジは少なくとも2つの濾過チャンバを備える。いくつかの実施形態において、カートリッジは8個の濾過チャンバを備える。

【0019】

第5の態様において、本発明は流体サンプル中の標的成分を分離するための自動濾過ユニットであって、本明細書に開示の濾過チャンバを備える自動濾過ユニットを提供する。いくつかの実施形態において、自動濾過ユニットは濾過チャンバの流体流動を制御する制御アルゴリズムを備える。いくつかの実施形態において、自動濾過ユニットは少なくとも2つの濾過チャンバを備える。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの濾過チャンバは縦一列に配列され、濾過チャンバはスロット幅が大きくなるフィルタを備える。いくつかの実施形態において、フィルタは流路に沿ってサイズが大きくなるスロット幅を含有する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバは上方チャンバを備える。いくつかの実施形態において、濾過後サブチャンバは、それぞれが流出ポートを備える多数の仕切りを備える。いくつかの実施形態において、濾過後チャンバの各仕切りからの流出ポートはマルチウェルプレートの個々のウェルとともに整列される。いくつかの実施形態において、ウェルは約1～100mm毎、例えば、約2.25mm毎、約4.5mm毎、または約9もしくは18mm毎に配置される。いくつかの実施形態において、自動濾過ユニットは8個の濾過チャンバを備える。いくつかの実施形態において、自動濾過ユニットは、濾過チャンバ内の流体流動を生じさせる手段を備える。いくつかの実施形態において、流体流動を生じさせる手段は流体ポンプである。いくつかの実施形態において、自動濾過ユニットは別個の標的成分を収集するための手段を備える。

10

20

【0020】

第6の態様において、本発明は流体サンプル中の標的成分を分離し、そして分析するための自動システムであって、本開示の自動濾過ユニットおよび該濾過ユニットに接続した分析装置を備える自動システムを提供する。いくつかの実施形態において、分析装置は細胞選別デバイスである。いくつかの実施形態において、分析装置はフローサイトメーターである。

【0021】

第7の態様において、本発明は流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、a)本明細書に開示の濾過チャンバに流体サンプルを分注することと、b)濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらすことを含み、流体サンプルの標的成分がフィルタにより保持され、またはフィルタを通過する方法を提供する。いくつかの実施形態において、本方法は、濾過チャンバの前方チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらすこと、濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通して溶液の流体流動をもたらすこと、および場合により濾過チャンバの上方チャンバを通して溶液の流体流動をもたらすことを含む。いくつかの実施形態において、流体サンプルを成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基づき分離する。いくつかの実施形態において、流体サンプルを前方チャンバの流入ポートを通して分注する。いくつかの実施形態において、溶液を濾過後サブチャンバの流入ポートに導入する。いくつかの実施形態において、溶液を上方濾過チャンバの流入ポートに導入する。いくつかの実施形態において、流体サンプルをフィルタの外部にある構造および/またはフィルタに組み込まれた構造を介して生じる物理的な力により操作する。いくつかの実施形態において、物理的な力を誘電泳動力、進行波誘電泳動力、磁力、音響力、静電力、機械力、光学的放射力および熱対流力からなる群から選択する。いくつかの実施形態において、誘電泳動力または進行波誘電泳動力が電極により生じた電場を介して生じる。いくつかの実施形態において、音響力が定常波音場または進行波音場を介して生じる。いくつかの実施形態において、音響力が圧電材料により生じる音場を介して生じる。いくつかの実施形態において、音響力がボイスコイルまたはオーディオスピーカーを介して生じる。いくつかの実施形態において、静電力は直流(DC)電場を介して生じる。いくつかの実施形態において、光学放射力はレーザーピンセットを介して生じる。いくつかの実施形態において、サンプルは血液、滲出液、尿、骨髓

30

40

50

サンプル、腹水、骨盤洗浄液 (pelvic wash fluid)、胸膜液、髄液、リンパ液、血清、粘液、痰、唾液、精液、眼液、鼻腔の抽出物、咽頭または生殖器スワブ、消化組織由来の細胞懸濁液、糞便材料の抽出物、混合種および/または混合サイズのいずれかの培養細胞、または除去される必要のある汚染物質または未結合の反応物質を含有する細胞である。いくつかの実施形態において、流体サンプルは血液サンプルであり、分離される細胞は血小板および/または赤血球細胞 (RBC) である。いくつかの実施形態において、流体サンプルは除去される必要のある汚染物質または未結合の反応物質を含有する細胞であり、反応物質は細胞の標識試薬である。いくつかの実施形態において、流体サンプルは血液サンプルであり、分離される細胞は非造血細胞、血液細胞の垂集団、胎児赤血球細胞、幹細胞、またはがん性細胞である。いくつかの実施形態において、流体サンプルは滲出液または尿サンプルであり、分離される細胞はがん細胞または非造血細胞である。

10

20

30

40

50

【0022】

第8の態様において、本発明は本明細書に開示の自動濾過ユニットを使用する流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注することと、b) 濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらすことを含み、流体サンプルの標的成分がフィルタにより保持され、またはフィルタを通して流れる方法を提供する。いくつかの実施形態において、流体サンプルを成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基づき分離する。いくつかの実施形態において、前方チャンバの流体サンプルは濾過後サブチャンバの溶液に実質的に逆平行に流れる。いくつかの実施形態において、フィルタ速度 (filter rate) は約 0 ~ 1 mL / 分である。いくつかの実施形態において、フィルタ速度は約 10 ~ 500 μ L / 分である。いくつかの実施形態において、フィルタ速度は約 80 ~ 140 μ L / 分である。いくつかの実施形態において、供給速度はフィルタ速度の約 1 ~ 10 倍である。

【0023】

いくつかの実施形態において、本方法はさらに、流体サンプルの保持成分をさらなるサンプル非含有洗浄試薬で洗浄することを含む。いくつかの実施形態において、洗浄工程の間、供給速度はフィルタ速度未満またはこれに等しい。いくつかの実施形態において、洗浄試薬は濾過後サブチャンバに導入される。いくつかの実施形態において、洗浄試薬は前方チャンバおよび/または上方チャンバに導入される。いくつかの実施形態において、本方法はさらに、標的成分に結合する標識試薬を提供することを含む。いくつかの実施形態において、標識試薬は抗体である。いくつかの実施形態において、標識試薬を収集チャンバに添加する。いくつかの実施形態において、標識試薬を前方チャンバおよび/または上方チャンバに添加する。いくつかの実施形態において、標識工程の間、濾過後サブチャンバの流体流動を休止する。いくつかの実施形態において、本方法はさらに、未結合の標識試薬を除去することを含む。いくつかの実施形態において、本方法はさらに、収集チャンバ内の標的成分を回収することを含む。いくつかの実施形態において、回収の間、供給速度は約 5 ~ 20 mL / 分である。いくつかの実施形態において、回収工程の間、濾過後サブチャンバにおいて、流出速度は流入速度に等しい。いくつかの実施形態において、回収工程の間、流出を約 50 m 秒間停止する。いくつかの実施形態において、流体サンプルは血液サンプルであり、これは特異的結合メンバーを使用して望ましくない成分の少なくとも1種を除去することを含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1種の望ましくない成分は白血球細胞 (WBC) である。いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーはWBCに選択的に結合し、固体支持体に連結する。いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーは抗体であり、またはWBCに選択的に結合する抗体フラグメントである。いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーはCD3、CD11b、CD14、CD17、CD31、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102またはCD166に選択的に結合する抗体である。いくつかの実施形態において、特異的結合メンバーはCD35および/またはCD50に選択的に結合する抗体である。いくつかの実施形態において、本方法はさらに血液サンプルと第2の

特異的結合メンバーを接触させることを含む。いくつかの実施形態において、第2の特異的結合メンバーは、CD31、CD36、CD41、CD42(a、bまたはc)、CD51、またはCD51/61に選択的に結合する抗体である。

【0024】

第9の態様において、本発明は本明細書に開示の自動システムを使用する流体サンプル中の成分を富化し、そして分析する方法であって、a)濾過チャンバに流体サンプルを分注すること、b)濾過チャンバの前方チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらす、濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通して溶液の流体流動をもたらすことであって、流体サンプルの標的成分が前方チャンバに保持され、非標的成分がフィルタを通り濾過後チャンバに流れ、c)標的成分を標識することと、d)標識された標的成分を分析装置を使用して分析することを含む方法を提供する。いくつかの実施形態において、本方法は上方チャンバに流体流動をもたらすことを含む。いくつかの実施形態において、標的成分は細胞または細胞小器官である。いくつかの実施形態において、細胞は有核細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は希少細胞である。

10

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】図1は、本発明の例示的な実施形態の微細加工されたチップの領域の上面図である。暗色領域は1cm²の濾過面積を有するフィルタの精密に製造されたスロットである。

【0026】

【図2】図2は、本発明の例示的な実施形態の微細加工されたフィルタの概略的な図である。A)10×10mm²の濾過面積(1)を有する18×18mm²の微細加工されたフィルタを示す上面図。B)4ミクロン×50ミクロンの寸法を有するスロット(2)を示す上面図の断面の拡大図であり、スロット間の各中央までの距離は12ミクロンであり、平行に整列されている。C)微細加工されたフィルタの断面図であり、スロットがフィルタ基板を通して伸長する。

20

【0027】

【図3】図3は、表面に電極が組み込まれた電極を有する本発明の例示的な実施形態のフィルタを示す。A)2ミクロンのスロット幅を有する微細加工されたフィルタの部分の20倍拡大図。B)3ミクロンのスロット幅を有する微細加工されたフィルタの部分の20倍拡大図。

30

【0028】

【図4】図4は、本発明の例示的な実施形態の微細加工されたフィルタの孔の断面図を示す。孔の深さはフィルタの厚さに対応する。Yはフィルタの表面と、フィルタを通る垂直に切断された孔の側面との直角を示し、一方Xはテーパリング角度であり、これによりテーパ状の孔が方向またはフィルタを通した配向において非テーパ状の孔とは異なる。

【0029】

【図5】図5は、微細加工されたフィルタ(3)が濾過チャンバを上部前方チャンバ(4)および濾過後サブチャンバ(5)に分離する本発明の例示的な実施形態の濾過装置を示す。装置は装置の内外への流体流動を制御するための弁を有し、弁A(6)は充填リザーバー(10)から濾過装置へのサンプルの流動を制御し、弁B(7)はシリンジポンプに接続することによりチャンバを通る流体流動を制御し、弁C(8)は洗浄溶液をチャンバに導入するために使用される。

40

【0030】

【図6】図6は、血液サンプルを添加するための入口(11)、音響混合チップ(13)および微細加工されたフィルタ(103)を備える濾過チャンバ(12)、隣接する磁石(15)を有する磁気捕捉カラム(14)、混合/濾過チャンバ(112)、電磁気チップ(17)を備える磁気分離チャンバ(16)、および希少細胞収集のための容器(18)を備える本発明の例示的な実施形態の自動システムの図形である。

【0031】

50

【図 7】図 7 は、スロット (202) および音響要素を有するチップ (200) (音響要素はチップ表面上では見えないかもしれないが、説明の目的のために本明細書において示す) を備える、2つのフィルタ (203) を有する本発明の例示的实施形態の濾過チャンバの 3次元斜視図を示す。この簡略した図では、スロットの幅は図示されない。

【0032】

【図 8】図 8 は、濾過処理が完了後の、および磁気ビーズ (19) を標的細胞 (20) を含むサンプルに添加後の 2つのフィルタ (303) を有する本発明の例示的实施形態の濾過チャンバの断面図を示す。音響要素は混合操作の間、電源を入れる。

【0033】

【図 9】図 9 は、本発明の例示的实施形態の自動システムの特徴である磁気捕捉カラム (114) の断面図を示す。磁石 (115) は分離カラムに隣接して位置づけられる。

10

【0034】

【図 10】図 10 は、流体サンプルから希少細胞を分離することができる多数のフォースチップを備える本発明の例示的实施形態の自動システムのチャンバ (416) の 3次元斜視図を示す。チャンバはチャンバを通る流体流動のための入口 (429) および出口 (430) を有する。破断図は、チップが誘電泳動分離のための電極アレイを備える電極層 (427) および別の層の電極アレイの電磁自動濾過ユニット (421) を備える電磁層 (417) を有することを示す。

【0035】

【図 11】図 11 は、細胞が 0.2 S/m の導電率の媒体に懸濁されたときの nRBC (x) と RBC () の DEP スペクトル間の理論的比較を図示するグラフを示す。

20

【0036】

【図 12】図 12 は、母体血サンプルの雄性胎児細胞を検出する Y 染色体マーカーを使用する本発明の例示的实施形態の方法を使用して単離した有核胎児細胞の FISH 分析を示す。

【0037】

【図 13】図 13 は、母体血由来の胎児有核 RBC を富化するためのプロセスフローチャートを示す。

【0038】

【図 14】図 14 は、本発明の例示的实施形態の濾過ユニットの概略図である。

30

【0039】

【図 15】図 15 は、本発明の例示的实施形態の自動システムのモデルを示す。

【0040】

【図 16】図 16 は、本発明の例示的实施形態の自動システムの濾過プロセスを示す。A) は微細加工されたフィルタ (503) により濾過後サブチャンバ (505) から分離された前方チャンバ (504) を備える濾過チャンバに弁 (506) を通り接続された充填リザーバー (510) を有する濾過ユニットを示す。洗浄ポンプ (526) を、下部サブチャンバを通り洗浄緩衝液 (524) をポンプで送り出すための弁 (508) を通り下部チャンバに接続させる。別の弁 (507) は濾過チャンバを通り、そして排出導管 (530) を通り外部に流体流動を促進するために使用される別の陰圧ポンプにつながる。収集容器 (518) は可逆的に上部チャンバ (504) を係合することができる。B) は充填リザーバー (510) に充填された血液サンプル (525) を示す。C) において、濾過チャンバを通り流体流動を促進するために使用される陰圧ポンプにつながる弁 (507) が開き、D) および E) はチャンバを通り濾過されている血液サンプルを示す。F) において、充填リザーバーを通り導入された洗浄緩衝液をチャンバを通して濾過する。G) において、弁 (508) が開く一方で、充填リザーバー弁 (506) を閉じ、洗浄緩衝液を洗浄ポンプ (526) から下部チャンバにポンプで送り出す。H) において、濾過弁 (507) および洗浄ポンプ弁 (508) を閉じ、I) および J) において、チャンバを 90 度回転する。K) は洗浄ポンプ (526) により生じた流体流動が前方チャンバに保持された希少標的細胞 (520) を収集チューブに流れるように前方チャンバ (504) を係

40

50

合する収集容器 (5 1 8) を示す。

【 0 0 4 1 】

【 図 1 7 】 図 1 7 は、精密濾過により富化された後の未標識血液細胞のバックグラウンドでの蛍光標識された乳癌細胞を示す。A) 濾過された血液サンプルの位相差顕微鏡。B) A に示される同じ視域の蛍光顕微鏡。

【 0 0 4 2 】

【 図 1 8 】 図 1 8 は、本発明の例示的实施形態の誘電泳動チップの 2 つの構成を示す。A) 互い組み合わせられた電極形状のチップ、B) 城壁様の電極形状のチップ。

【 0 0 4 3 】

【 図 1 9 】 図 1 9 は、誘電泳動チップを備える本発明の例示的实施形態の分離チャンバを示す。A) チャンバの断面図、B) チップを示す上面図。

10

【 0 0 4 4 】

【 図 2 0 】 図 2 0 は、細胞が 10 mS / m の導電率の媒体に懸濁したときの M D A 2 3 1 癌細胞 (実線)、T リンパ球 (破線) および赤血球 (短破線) の D E P スペクトル間の理論的比較を説明するグラフである。

【 0 0 4 5 】

【 図 2 1 】 図 2 1 A および B は、例示的誘電泳動チップの電極に保持された、急上昇した血液サンプル由来の乳癌細胞を示す。

【 0 0 4 6 】

【 図 2 2 】 図 2 2 は、例示的誘電泳動チップの電極に保持された血液サンプルの白血球細胞を示す。

20

【 0 0 4 7 】

【 図 2 3 】 図 2 3 は、本発明の例示的实施形態の自動システムの濾過ユニットの概略図である。濾過ユニットは弁 A (6 0 6) を通り、微細加工されたフィルタ (6 0 3) により濾過後サブチャンバ (6 0 5) から分離された前方チャンバ (6 0 4) を備える濾過チャンバに接続された充填リザーバー (6 1 0) を有する。吸引型ポンプを廃棄物ポート (6 3 4) に接続するチューブを通して取り付けことができ、この場合、濾過されたサンプルはチャンバから排出される。サイドポート (6 3 2) を、下部サブチャンバ (6 0 5) を通り洗浄緩衝液をポンプで送り出すためのシリンジポンプを取り付けるために使用することができる。濾過プロセス後、濾過チャンバ (前方チャンバ (6 0 4)、濾過後サブチャンバ (6 0 5)、フィルタ (6 0 3)、およびサイドポート (6 3 2) を含み、全て図の円内に示した) を濾過ユニットのフレーム (6 3 6) 内で回転させることができ、そうして前方チャンバの富化された細胞を収集ポート (6 3 5) を介して収集することができる。

30

【 0 0 4 8 】

【 図 2 4 】 図 2 4 は、血液サンプルから胎児細胞を富化する全体のプロセスと、血液サンプルの第 2 の洗浄液の上清内で富化された胎児細胞 (四角で標識された上清 (W 2)) および濾過工程後に保持された細胞内で富化された胎児細胞 (四角で標識された富化細胞) の存在を示す図形である。図形は左上から右下に、血液細胞処理工程の 2 つの洗浄液 (W 1 および W 2)、混合試薬 (A V I P r e p + A V I B e a d + 抗体) による赤血球細胞の選択的沈降および白血球細胞の除去、沈降の上清の濾過および富化された胎児細胞の収集を示す。図形は本手順の間の種々のサンプル画分の有核細胞の富化レベルおよび F I S H を使用して分析されたサンプル画分を示す。

40

【 0 0 4 9 】

【 図 2 5 】 図 2 5 は、評価対象のフィルタカートリッジの絵 (右) と、微細加工されたケイ素フィルタチップの上面挿入図を含む一般的なディスクシリンジフィルタ (左) との比較を示し、暗色部のスロットは米国特許第 6 , 9 4 9 , 3 5 5 号に記載されているフィルタの「孔」 (a) と、フィルタカートリッジ構造のスケッチ (b) である。

【 0 0 5 0 】

【 図 2 6 】 図 2 6 は、溶解非洗浄、溶解洗浄および濾過手順を用いた全血から単離された

50

白血球の点プロットを示す（上部列から下部列）。P1はTrucount（商標）カウンティングビーズ集団であり、P2はCD45+細胞でゲーティングした白血球集団である。

【0051】

【図27-1】図27は、溶解非洗浄（LNW）、溶解洗浄（LW）および濾過手順により処理されたMultitest（商標）試薬を用いて染色された血液の点プロット（a）、LNW、LW、および濾過プロセスの総白血球、主要な白血球集団およびリンパ球の主要な亜集団の細胞回収の比較（b）を示す。CD45+細胞、リンパ球、顆粒球、および単球の回収はABX血液分析器から得られた細胞数を参照し（ $n=30$ ）、T、NK、およびB細胞の回収をLNWサンプルの結果と比較した（ $n=15$ ）。

10

【図27-2】図27は、溶解非洗浄（LNW）、溶解洗浄（LW）および濾過手順により処理されたMultitest（商標）試薬を用いて染色された血液の点プロット（a）、LNW、LW、および濾過プロセスの総白血球、主要な白血球集団およびリンパ球の主要な亜集団の細胞回収の比較（b）を示す。CD45+細胞、リンパ球、顆粒球、および単球の回収はABX血液分析器から得られた細胞数を参照し（ $n=30$ ）、T、NK、およびB細胞の回収をLNWサンプルの結果と比較した（ $n=15$ ）。

【0052】

【図28】図28は、Viabilityキットの試薬を用いて染色した全血の点プロットを示し、左パネルは塩化アンモニウムを用いて溶解した全血の結果であり、右パネルは濾過から回収した細胞の結果であり（a）、FITC Annexin V Apoptosis Detectionキットの試薬を用いて染色した、濾過から回収した細胞の点プロットを示し、左パネルは採血後1時間以内に濾過された血液の結果であり、右パネルは採血の8時間後に濾過された血液の結果である（b）。

20

【0053】

【図29】図29は、カートリッジの例示的实施形態を示す。

【0054】

【図30】図30a~dは、塩化アンモニウム溶解後の細胞生存性を示す。

【0055】

【図31】図31は、濾過後の細胞生存性を示す。

【0056】

【図32】図32は、例示的フィルタ稼働プロセスを例示する。本プロセスの例示的実施形態において、シリンジポンプが2つあり、1つは右側に、もう一方は底部にある。底部のポンプの吸引は、右側のポンプの出力と同時であるが少し速いため、血液が差動でフィルタに吸引される。濾過処理が行われると、底部のポンプの吸引の電源が切れ、有核細胞がフィルタから押し戻され、これによりこのとき上下が反転し、細胞を直接サイトメトリーチューブに分注する（工程6と同様であるが、シリンジは受入サイトメトリーチューブに替わる）。

30

【0057】

【図33】図33は、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバがともに、液体を流す入口および出口を有する濾過チャンバの例示的実施形態を示す。示された例示的実施形態において、前方チャンバの液体は濾過後サブチャンバの液体と逆平行に流れる。

40

【0058】

【図34】図34は、8個の濾過チャンバの多数の構成の例示的実施形態を示し、それぞれが図33に例示されたものと同様の流路を有する個々の濾過チャンバを含有する。

【0059】

【図35】図35は、流体サンプルの標的成分を分離し、そして分析する自動システムの例示的実施形態を示し、サンプルをサンプルに入れたサイホンにより収集することができ、サンプルが連続して前方チャンバを通過した後、直接分析計器に供給することができ、これはこの概略図ではフローサイトメトリーのフローセルとして示される。

【0060】

50

【図36】図36は、高洗浄能濾過チャンバの例示的实施形態の概略図を示し、図33に示される同じ流路がここで、上部から導入され、両方のフィルタを通過する洗浄試薬（緩衝液または緩衝液とバイオマーカーあるいは任意の適切な物質）を有し、サンプルと底部の微細加工されたフィルタとの間の相互作用を最大化する。

【0061】

【図37】図37は、縦一列の2つの濾過チャンバの例示的实施形態を示し、第1の濾過チャンバにおいてサンプルの細胞片および小さい成分が除去された後、第2の濾過チャンバが残存するサンプルから大きな細胞と小さい細胞を分離することができる。例えば、白血球は回収1ポートに優先的に方向付けることができ、より大きな腫瘍細胞は回収2ポートに続くことができる。

【0062】

【図38】図38は、多数の回収ポートを有する濾過チャンバの例示的实施形態を示し、微細加工されたフィルタは各ポートが徐々に大きい細胞を排出し、その排出物を直接マルチウェルスクリーニングプレートに送達するようにポートを配置することができるといった、幅が大きくなるスロットのアレイを含有する。

【発明を実施するための形態】

【0063】

定義

他に定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者により通常理解されるものと同じ意味を有する。本明細書において参照されるすべての特許、出願、公報および他の刊行物は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。本節で記載の定義が参照により本明細書に組み込まれた特許、出願、公報および他の刊行物に記載の定義と矛盾し、または一致しない場合、本節の定義が参照により本明細書に組み込まれた定義より優先される。

【0064】

本明細書において使用される場合、単数形の「a」「an」（1つの）および「the」（その）は他に明記されない限り複数の指示的意味を含む。例えば、「1つの」ダイマーは1つまたは複数のダイマーを含む。

【0065】

サンプルの「成分」または「サンプル成分」はサンプルの任意の構成要素であり、イオン、分子、化合物、分子複合体、細胞小器官、ウイルス、細胞、凝集体、または任意の種類の粒子、例えば、コロイド、凝集体、粒子状、結晶、無機物などであり得る。サンプルの成分はサンプル媒体もしくは用いられたサンプル緩衝液またはサンプル溶液に可溶性または不溶性であってよい。サンプルの成分は、気体、液体、または固体形態であってよい。サンプルの成分は断片であってよく、または断片でなくてもよい。

【0066】

「断片」または「目的の断片」は単離、精製および/または操作が望ましい任意の実体である。断片は懸濁された固体を含む固体であってよく、または可溶形態であってよい。断片は分子であってよい。操作することができる分子は、無機分子、例えば、イオンおよび無機化合物を含むがそれらに限定されず、または、有機分子、例えば、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質、リポタンパク質、糖リポタンパク質、脂質、脂肪、ステロール、糖、炭水化物、核酸分子、小有機分子、または複合有機分子であってよい。断片はまた分子複合体であってよく、細胞小器官であってよく、1つまたは複数の細胞、例えば、原核細胞および真核細胞であってよく、または1種または複数種の病原体、例えば、ウイルス、寄生生物またはプリオンもしくはその一部であってよい。断片はまた結晶、無機物、コロイド、断片、ミセル、小滴、気泡などであってよく、高分子材料、金属、無機物、ガラス、セラミックなどの1種または複数種の無機材料であってよい。断片はまた分子の凝集体、複合体、細胞、細胞小器官、ウイルス、病原体、結晶、コロイド、またはフラグメントであってよい。細胞は任意の細胞、例えば、原核細胞および真核細胞であってよい。真核細胞は任意の種類のものであってよい。特に目的のものは、例えば限定され

10

20

30

40

50

ないが、白血球細胞、悪性細胞、幹細胞、前駆細胞、胎児細胞および病原体に感染した細胞ならびに細菌細胞などの細胞であってよい。断片はまた人工的な粒子、例えば、ポリスチレンマイクロビーズ、他のポリマー組成物のマイクロビーズ、磁性マイクロビーズおよびカーボンマイクロビーズであってよい。

【0067】

本明細書において使用される場合、「操作」は断片の移動または処理を指し、これは、単一のチャンバ内もしくは単一のチップ上、または多数のチップおよび/またはチャンバ間もしくは中で断片の1次元、2次元または3次元移動を生じる。本発明の方法により操作される断片は場合により微粒子などの結合パートナーと結合して連結することができる。操作の非限定的な例として、断片の運搬、捕捉、集束、富化、濃縮、凝集、捕集、反発、浮遊、分離、単離または線形もしくは他の方向付けられた動作がある。結合パートナーに連結した断片の効率的な操作のため、結合パートナーと本方法で使用される物理的な力を適合させる必要がある。例えば、磁性特性を有する結合パートナーは磁力を用いて使用される必要がある。同様に、特定の誘電特性を有する結合パートナー（例えば、プラスチック粒子、ポリスチレンマイクロビーズ）は誘電泳動力を用いて使用される必要がある。

10

【0068】

「結合パートナー」は、所望の親和性または特異性を有する断片に結合し、かつ所望の物理的な力（各物理的な力）を用いて操作可能である任意の物質を指す。結合パートナーの非限定的な例として、細胞、細胞小器官、ウイルス、微粒子もしくはその凝集体または複合体、または分子の凝集体もしくは複合体がある。

20

【0069】

「連結する」は結合することを意味する。例えば、断片が特異的または非特異的結合により微粒子に連結することができる。本明細書に開示される場合、結合は共有もしくは非共有の、可逆的もしくは不可逆的であってよい。

【0070】

本明細書において使用される場合、「操作される断片を結合パートナーの表面に実質的に連結する」は、操作される断片のある割合が結合パートナーの表面に連結し、結合パートナーの操作を介した適切な物理的な力により操作されることができることを意味する。通常、操作される断片の少なくとも0.1%が結合パートナーの表面に連結する。好ましくは操作される断片の少なくとも1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%が結合パートナーの表面に連結する。

30

【0071】

本明細書において使用される場合、「操作される断片を結合パートナーの表面に完全に連結する」は、操作される断片の少なくとも90%が結合パートナーの表面に連結することを意味する。好ましくは操作される断片の少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%が結合パートナーの表面に連結する。

【0072】

「特異的結合メンバー」は、特異的に結合する表面または空洞の領域を有する2つの異なる分子の1つであり、それによりもう一方の分子の特定の空間および化学機構と相補的であるとして定義される。特異的結合メンバーは、抗原-抗体または抗体-抗体などの免疫学的対のメンバーであってよく、ビオチン-アビジン、ビオチン-ストレプトアビジン、またはビオチン-ニュートラアビジン、リガンド受容体、核酸二重鎖、IgG-タンパク質A、DNA-DNA、DNA-RNA、RNA-RNAなどであってよい。

40

【0073】

「抗体」は免疫グロブリン分子であり、非限定的な例として、IgG、IgM、または他の種類の免疫グロブリン分子であってよい。本明細書において使用される場合、「抗体」は抗体が持つ抗体の結合特異性を保持する抗体分子の一部も指す（例えば、一本鎖抗体またはFabフラグメント）。

【0074】

50

「核酸分子」はポリヌクレオチドである。核酸分子はDNA、RNAまたはそれらの組み合わせであってよい。核酸分子も骨格に組み込まれるリボースおよびデオキシリボース以外の糖を含むことができるため、DNAまたはRNA以外であってよい。核酸は天然または天然でない、例えば、キサンチン、核酸塩基の誘導体、例えば、2-アミノアデニンなどの核酸塩基を含むことができる。本発明の核酸分子はホスホジエステル結合以外の結合を有することができる。本発明の核酸分子は、核酸塩基がペプチド骨格に結合するペプチド核酸分子であってよい。核酸分子は任意の長さであってよく、一本鎖、二本鎖または三本鎖あるいはそれらの任意の組み合わせであってよい。

【0075】

「均質な操作」は混合物の全ての粒子が、印加された力に対して同じ反応を有する物理的な力を使用した混合物中の粒子の操作を指す。

10

【0076】

「選択的操作」は混合物中の様々な粒子が、印加された力に対して異なる反応を有する物理的な力を使用した粒子の操作を指す。

【0077】

「流体サンプル」は成分が分離または分析される任意の液体である。サンプルは任意の供給源、例えば、有機体、つまり同じまたは異なる種由来、環境由来、例えば、人体の水もしくは土壌由来、または食物源もしくは産業用供給源由来の有機体群であってよい。サンプルは未処理または処理されたサンプルであってよい。サンプルは気体、液体、または半固体であってよく、溶液または懸濁液であってよい。サンプルは抽出物、例えば、土壌もしくは食物サンプルの液体抽出物、咽頭もしくは生殖器スワブの抽出物、または糞便サンプルの抽出物、あるいは体内の内部領域の洗浄液であってよい。

20

【0078】

本明細書において使用される場合、「血液サンプル」は処理された、または未処理の血液サンプルを指すことができ、すなわち、遠心分離、濾過、抽出または他の処理された血液サンプル、例えば限定されないが、抗凝血剤または安定化剤などの1種または複数種の試薬を添加している血液サンプルであってよい。血液サンプルの一例は、白血球細胞を富化するためにヒト血液を処理することにより得られるパフィーコートである。血液サンプルの別の例は、サンプルをペレット細胞に遠心分離し、血清上清を除去し、溶液または緩衝液中の細胞を再懸濁することにより血清成分を除去するよう「洗浄」されている血液サンプルである。他の血液サンプルは臍帯血サンプル、骨髓吸引物、内部血または末梢血を含む。血液サンプルは任意の容量であってよく、動物またはヒトなどの任意の対象由来であってよい。好ましい対象はヒトである。

30

【0079】

「希少細胞」は1) 流体サンプル中の総有核細胞集団の1%未満の細胞型または2) 流体サンプルの1ミリリットル当たり100万個未満の細胞が存在する細胞型のいずれかである細胞である。「目的の希少細胞」は富化が望ましい細胞である。

【0080】

「白血球細胞」または「WBC」は白血球であり、または網状赤血球もしくは血小板でなく、動物またはヒトの血液に存在し得る造血系統の細胞である。白血球はナチュラルキラー細胞(「NK細胞」)およびリンパ球、例えば、Bリンパ球(「B細胞」)またはTリンパ球(「T細胞」)を含み得る。白血球はまた、食細胞、例えば、単球、マクロファージ、および顆粒球、例えば、好塩基球、好酸球および好中球を含み得る。白血球はまた肥満細胞を含み得る。

40

【0081】

「赤血球細胞」または「RBC」は赤血球である。本明細書において使用される場合、「有核赤血球細胞」(「nRBC」)または「胎児有核赤血球細胞」あるいは有核胎児赤血球細胞と指定されない限り、「赤血球細胞」は非有核赤血球細胞を意味するために使用される。

【0082】

50

「新生物細胞」または「腫瘍細胞」は、未制御の細胞増殖を有し、新たな成長を誘発した刺激が停止した後に成長し続けることができる異常細胞を指す。新生物細胞は正常組織との構造的機構および機能的協調の部分的または完全な欠失を示す傾向があり、良性または悪性であり得る。

【0083】

「悪性細胞」は局所的に侵襲的および破壊的成長および転移の性質を有する細胞である。「悪性細胞」の例として、限定されないが種々の体液、例えば、血液、骨髄、腹水、便、尿、気管支洗浄液などにおける白血病細胞、リンパ腫細胞、充実性腫瘍のがん細胞、転移性充実性腫瘍細胞（例えば、乳癌細胞、前立腺癌細胞、肺癌細胞、結腸癌細胞）がある。

10

【0084】

「がん性細胞」は調節されていない成長を示し、多くの場合、その分化特性、例えば限定されないが、特徴的な形態、非遊走性挙動、細胞間相互作用および細胞シグナリング挙動、タンパク質発現および分泌パターンなどの少なくとも1つを欠失している細胞である。

【0085】

「がん」は自然な経過が死に至る新生物疾患を指す。がん性細胞は良性の腫瘍細胞と異なり、侵襲および転移の特性を示し、かなり未分化である。がん細胞は癌腫と肉腫の2つの大きな分類がある。

【0086】

「幹細胞」は1回または複数回の細胞分裂サイクルを通して、少なくとも1種の分化した細胞型に成長することができる未分化の細胞である。

20

【0087】

「前駆細胞」は1回または複数回の細胞分裂サイクルを通して、少なくとも1種の分化した細胞型に成長することができるが未分化の細胞である。典型的には、幹細胞は特定の刺激または一連の刺激に应答した1回または複数回の細胞分裂を通して前駆細胞に成長し、前駆因子が特定の刺激または一連の刺激に应答して1種または複数種の分化した細胞型に成長する。

【0088】

「病原体」は、対象に感染することができる任意の原因因子、例えば、細菌、真菌、原生動物、ウイルス、寄生生物またはプリオンを指す。病原体は、感染する対象に症状または疾患状態を引き起こすことができる。ヒト病原体はヒト対象に感染することができる病原体である。このようなヒト病原体はヒトに特異的であり、例えば、特異的ヒト病原体であり得、または種々の種に感染し、例えば、広宿主域ヒト病原体であり得る。

30

【0089】

「対象」は任意の有機体、例えば、動物またはヒトを指す。動物は任意の動物、例えば、野生動物、愛玩動物、例えば、イヌもしくはネコ、農業用動物、例えば、ブタもしくはウシ、または娯楽動物、例えば、ウマを含むことができる。

【0090】

「チャンバ」は流体サンプルを含有することができる構造であり、少なくとも1つの処理工程を行うことができる。いくつかの実施形態において、チャンバは種々の寸法を有することができるが、その容量は0.01マイクロリットル～0.5リットルと変化し得る。

40

【0091】

「濾過チャンバ」はチャンバを通して、またはチャンバの中で流体サンプルを濾過することができるチャンバである。

【0092】

「フィルタ」は特定の寸法（特定の範囲内にあり得る）の1つまたは複数の孔またはスロットを備え、成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基づき、フィルタの一方からもう一方へ一部のサンプル成分を通過させるが他のものは通過させない構造である。フィルタは不溶性の成分、例えば、金属、セラミック、ガラス、ケ

50

イ素ン、プラスチック、ポリマー、繊維（紙または布など）などの通過を妨げる任意の適切な材料からなり得る。

【0093】

「濾過ユニット」は濾過チャンバおよびサンプルおよび溶液を濾過チャンバに導入させ、サンプル成分を濾過チャンバから除去させる関連の入口、弁および導管である。濾過ユニットはまた、場合により充填リザーバーを備える。

【0094】

「カートリッジ」は手動または自動システムの一部である少なくとも1つのチャンバおよび少なくとも1つのチャンバに、またはチャンバから液体を運搬するための1つまたは複数の導管を備える構造である。カートリッジは、1つまたは複数のチップを含んでも、含まなくてもよい。

10

【0095】

「流体サンプルから標的成分を分離する自動システム」または「自動システム」は少なくとも1つの濾過チャンバ、流体流動を濾過チャンバに方向付けるための自動手段、ならびに流体流動をもたらす、かつ場合によりアクティブチップの力を生成するための信号源を設けるための少なくとも1つの電源を備えるデバイスである。本発明の自動システムはまた、場合により1つまたは複数のアクティブチップ、分離チャンバ、分離カラム、または永久磁石を備え得る。

【0096】

「ポート」は流体サンプルがチャンバを出入りすることができるチャンバの筐体の開口部である。ポートは任意の寸法であってよいが、好ましくは液体を導管を通してポンプで送り出すことにより、またはピペット、シリンジの手段もしくはサンプルを分注し、または運搬する他の手段によりサンプルがチャンバに分注される形状およびサイズのものである。

20

【0097】

「入口」はサンプル、溶液、緩衝液、または試薬の液体チャンバへの入口点である。入口はチャンバのポートであってよく、または直接または間接的に自動システムのチャンバにつながる導管の開口部であってよい。

【0098】

「出口」はサンプル、サンプル成分、または試薬が液体チャンバから排出される開口部である。チャンバから放出されるサンプル成分および試薬は廃棄物であってよく、すなわち、さらに使用されないサンプル成分、または回収されるサンプル成分または試薬、例えば、さらに分析または操作される再利用可能な試薬または標的細胞であってよい。出口はチャンバのポートであり得るが、好ましくは直接または間接的に自動システムのチャンバからつながる導管の開口部である。

30

【0099】

「導管」は容器から本発明のチャンバに運搬される液体のための手段である。好ましくは導管は、直接または間接的にチャンバの筐体のポートと係合する。導管は液体の通過を可能にする任意の材料を含むことができる。導管はチューブ、例えば、ゴム、Teflon（登録商標）、またはタイゴンチューブなどを含むことができる。導管はまた、ポリマーもしくはプラスチックから成形され、または金属、ガラスまたはセラミック基板にドリルで穿孔し、エッチングまたは機械加工することができる。したがって導管は、例えば、本発明のカートリッジなどの構造に一体化することができる。導管は任意の寸法であってよいが、好ましくは内径が10ミクロン～5ミリメートルの範囲である。導管は好ましくは（液体の入口および出口点以外は）包囲され、または運河式導管としてその上面で開口することができる。

40

【0100】

「チップ」は1つまたは複数のプロセス、例えば、物理的、化学的、生化学的、生物学的または生物物理学的プロセスを行うことができる固体基板であり、または1つまたは複数の物理的、化学的、生化学的、生物学的、または生物物理学的プロセスを行うための1つま

50

たは複数の印加された力を生じる要素を備え、または支持する固体基板である。このようなプロセスはアッセイ、例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび化学アッセイ、分離、例えば、電気、磁気、物理学的、および化学的（生化学を含む）力または相互作用により介在される分離、化学反応、酵素反応、および結合相互作用、例えば、捕捉であってよい。マイクロ構造またはマイクロ規模構造、例えば、チャンネルおよびウェル、ブリック、ダム、フィルタ、電極要素、電磁気要素または音響要素は、チップ上の物理学的、生物学的、生物学的、生化学的、化学反応またはプロセスを促進するための基板に組み込まれ、またはその上に作製され得る。チップは一寸法が薄くてよく、他の寸法は種々の形状、例えば、矩形、円形、楕円形、または他の不規則な形状を有してよい。本発明のチップの主な表面のサイズは、例えば、約 1 mm^2 ~ 約 0.25 m^2 とかなり変化し得る。好ましくは、チップのサイズは約 4 mm^2 ~ 約 25 cm^2 であり、特徴的な寸法は約 1 mm ~ 約 5 cm である。チップ表面は平面であってよく、または平面でなくてよい。平面でない表面のチップは表面にチャンネルまたはウェルを含み得る。チップは1つまたは複数の開口部、例えば、孔またはスロットを有し得る。

10

【0101】

「アクティブチップ」は外部の電源により電荷されたときに、例えば限定されないが、混合、転位、集束、分離、濃縮、捕捉、単離または富化などの処理工程もしくはタスクまたは分析工程もしくはタスクを行うことができる少なくとも1つの物理的な力を生じることができるチップに、またはその上に構成されるマイクロ規模構造を含むチップである。アクティブチップは印加された物理的な力を使用し、所望の生化学的反応または処理工程もしくはタスクまたは分析工程もしくはタスクを促進し、強化し、または容易にする。アクティブチップ上で、「印加された物理的な力」はエネルギーがアクティブチップの外部となる電源により提供されるときに、チップにまたはその上に構成されるマイクロ規模構造により生じる物理的な力である。

20

【0102】

「マイクロ規模構造」は約 0.1 ミクロン ~ 約 20 mm の範囲の微小流体用途に使用する規模の特徴的な寸法を有するチップ、ウエハー、またはチャンバに一体化し、または取り付けられた構造である。本発明のチップ上に存在し得るマイクロ規模構造の例はウェル、チャンネル、ダム、ブリック、フィルタ、骨格、電極、電磁気自動濾過ユニット、音響要素、または微細加工されたポンプまたは弁である。種々のマイクロ規模構造は、弁理士登録番号 471842000400 の、 2000 年 10 月 4 日出願の “ Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof ” と題し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第 $09/679,024$ 号に開示される。電気信号などのエネルギーが加えられるときに本発明に有用な物理的な力が生じ得るマイクロ規模構造は、「物理的な力を生じる要素」、「物理的な力要素」、「アクティブな力要素」、または「アクティブ要素」と呼ばれ得る。

30

【0103】

種々のマイクロ規模構造は、弁理士登録番号 471842000400 の、 2000 年 10 月 4 日出願の “ Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof ” と題し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第 $09/679,024$ 号に開示される。電気信号などのエネルギーが加えられるときに本発明に有用な物理的な力が生じ得るマイクロ規模構造は、「物理的な力を生じる要素」、「物理的な力要素」、「アクティブな力要素」、または「アクティブ要素」と呼ばれ得る。

40

【0104】

「多数のフォースチップ」または「マルチフォースチップ」は、物理的な力場を生じ、少なくとも2つの異なる種類の組み込まれた構造を有し、そのそれぞれが外部の電源と組み合わせ物理場の1種を生じることができるチップである。マルチプルフォースチップ

50

の完全な説明は、弁理士登録番号471842000400の、2000年10月4日出願の“Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof”と題し、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許出願第09/679,024号に記載される。

【0105】

「音響力」は、音場により断片（例えば、粒子および/または分子）に直接または間接的に発揮する力である。音響力を液体中の粒子を操作するため（例えば、捕集、移動、方向付け、取扱い）に使用することができる。音響、つまり定在音波と進行音波の両方は断片に直接力を発揮することができ、このような力は「音響放射力」と呼ばれる。音波はまた、断片を入れ、または懸濁し、あるいは溶解する液体媒体で力を発揮することができ、いわゆる音響流を生じる。音波流は次に、このような液体媒体に入れられ、懸濁し、または溶解した断片に力を発揮する。この場合、音場は直接断片に力を発揮することができる。

10

【0106】

「音響要素」は電力信号に応答して音場を生じることができる構造である。好ましい音響要素は、印加されたAC電圧に応答して振動性（機械的）エネルギーを生じることができる圧電変換器である。振動性エネルギーを変換器の近位にある液体に伝達することができ、液体中の粒子（例えば、細胞など）に音響力を発揮させることができる。音響力および音響要素の説明は、参照によりその全体が組み込まれる、2000年8月10日出願の米国特許出願第09/636,104号に見つけることができる。

20

【0107】

「圧電変換器」は、電気信号に応答して音場を生じることができる構造である。圧電変換器の非限定的な例は、金属膜電極、圧電薄膜（例えば、酸化亜鉛）で両面が被覆されたセラミックディスク（例えば、PZT、チタン酸ジルコン酸鉛）がある。

【0108】

本明細書において使用される場合、「混合する」は、サンプル、溶液、または混合物の成分が散在するようにサンプル、溶液、または混合物の移動を生じさせる物理的な力の使用を意味する。本発明の使用における好ましい混合方法には、音響力の使用がある。

【0109】

「処理」は分析のためのサンプルの調製を指し、1つまたは多数の工程またはタスクを含むことができる。一般に処理タスクはサンプルの成分を分離し、サンプルの成分を濃縮し、サンプルの成分を少なくとも部分的に精製し、または（例えば、溶解または変性により）サンプルの成分を構造的に変化させるよう作用する。

30

【0110】

本明細書において使用される場合、「単離する」は、元のサンプルに存在する望ましいサンプル成分の好ましくは少なくとも15%、より好ましくは少なくとも30%、さらに好ましくは少なくとも50%およびさらに好ましくは少なくとも80%を保持し、元の成分の少なくとも1種の望ましくない成分の好ましくは少なくとも50%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも95%およびよりいっそう好ましくは少なくとも99%を最終調製物から除去するように、サンプルの他の望ましくない成分から望ましいサンプル成分を分離することを意味する。

40

【0111】

「富化する」は他のサンプル成分に対してサンプルのサンプル成分の濃度を増加させ（他のサンプル成分の濃度を減少させる結果となり得る）、またはサンプル成分の濃度を増加させることを意味する。例えば、本明細書において使用される場合、血液サンプル由来の有核胎児細胞を「富化」することは、血液サンプル中の全ての細胞に対する有核胎児細胞の割合を増加させることを意味し、血液サンプルのがん細胞を富化させることは、サンプル中のがん細胞の濃度を（例えば、サンプルの容量を減少させることにより）増加させること、または血液サンプルの他の細胞成分の濃度を減少させることを意味することがで

50

き、尿サンプル中のがん細胞を「富化」することはサンプル中のそれらの濃度を増加させることを意味することができる。

【0112】

「分離」は、サンプルの1種または複数種の成分がサンプルの1種または複数種の他の成分から空間的に分離されるプロセスである。分離は、目的の1種または複数種のサンプル成分を分離自動濾過ユニットの1つまたは複数の領域に転位させ、または保持し、そして残りの成分の少なくとも一部を、目的の1種または複数種のサンプル成分を転位し、そして/または保持する領域もしくは各領域から離れて転位させ、あるいは1種または複数種のサンプル成分を1つまたは複数の領域に保持し、そして少なくとも一部もしくは残りの成分をその領域もしくは各領域から除去するように行われることができる。別法として、サンプルの1種または複数種の成分を1つまたは複数の領域に転位させ、そして/または保持することができる。1種または複数種のサンプル成分をその領域または各領域から除去することができる。また、1種または複数種のサンプル成分を1つまたは複数の領域に転位させ、目的の1種または複数種のサンプル成分またはサンプルの1種または複数種の成分を1つまたは複数の他の領域に転位させることが可能である。分離は、例えば、濾過または物理的、化学的、電気的力または磁力の使用を通して得ることができる。分離に使用され得る力の非限定的な例は、重力、質量流量、誘電泳動力、進行波誘電泳動力、および電磁力である。

10

【0113】

「(流体)サンプルからサンプル成分を分離すること」は、元のサンプルの他の成分から、または1つまたは複数の処理工程後に残存するサンプルの成分からサンプル成分を分離することを意味する。「(流体)サンプルからサンプル成分を除去すること」は元のサンプルの他の成分から、または1つまたは複数の処理工程後に残存するサンプルの成分からサンプル成分を除去することを意味する。

20

【0114】

「捕捉」は、1つまたは複数の断片またはサンプル成分が、サンプルを含有する表面、チャンバ、チップ、チューブまたは任意の容器の1つまたは複数の領域に保持され、サンプルの残りがその領域から除去され得る分離の種類である。

【0115】

「アッセイ」は、サンプルまたはサンプルの成分に行われる試験である。アッセイは成分の存在、成分の量または濃度、成分の組成、成分の活性などを試験することができる。本発明の組成物および方法と合わせて行われることができるアッセイは、限定されないが免疫細胞化学アッセイ、相間FISH(蛍光インサイチュハイブリダイゼーション)、染色体分類、免疫学的アッセイ、生化学的アッセイ、結合アッセイ、細胞アッセイ、遺伝子アッセイ、遺伝子発現アッセイおよびタンパク質発現アッセイを含む。

30

【0116】

「結合アッセイ」は、特異的な結合メンバーに対する実体の結合を検出することにより実体の存在または濃度を試験し、または別の実体に結合する実体の性質を試験し、あるいは別の実体における一実体の結合親和性を試験するアッセイである。実体は有機もしくは無機分子、有機、無機または有機および無機化合物の組み合わせを含む分子複合体、細胞小器官、ウイルス、または細胞であり得る。結合アッセイは、結合実体の存在下において検出可能なシグナルを生じる検出可能な標識またはシグナル生成系を使用することができる。標準的な結合アッセイは、特異的な核酸配列を検出する核酸ハイブリダイゼーションによるもの、実体に結合する抗体によるもの、および受容体に結合するリガンドによるものを含む。

40

【0117】

「生化学アッセイ」は、サンプルの1種または複数種の成分の存在、濃度、または活性を試験するアッセイである。

【0118】

「細胞アッセイ」は、例えば限定されないが、代謝活性、異化作用活性、イオンチャン

50

ネル活性、細胞間シグナル伝達活性、受容体結合シグナル伝達活性、転写活性、翻訳活性、または分泌活性などの細胞プロセスを試験するアッセイである。

【0119】

「遺伝子アッセイ」は、遺伝的要素の存在または配列を試験するアッセイであり、遺伝的要素はDNAもしくはRNA分子の任意のセグメントであってよく、限定されないが、遺伝子、繰り返し要素、転位因子、調節因子、テロメア、セントロメア、または機能が未知のDNAもしくはRNAを含む。非限定的な例として、遺伝子アッセイは遺伝子発現アッセイ、PCRアッセイ、染色体分類、またはFISHであってよい。遺伝子アッセイは核酸ハイブリダイゼーション法を使用することができ、核酸シークエンシング反応を含むことができ、またはポリメラーゼなどの1種または複数種の酵素、例えば、PCRに基づく遺伝子アッセイを使用することができる。遺伝子アッセイは、例えば限定されないが、蛍光色素、放射性同位体、またはシグナル生成系などの1つまたは複数の検出可能な標識を使用することができる。

10

【0120】

「免疫染色」は、染色（または染色生成系）と特異的な抗体を合わせた任意の方法による特異的な抗原または構造の染色を指す。

【0121】

「ポリメラーゼ鎖反応」または「PCR」は、ヌクレオチド（アンプリコン）の特定の配列を増幅させる方法を指す。PCRは、核酸ポリメラーゼ、好ましくは熱安定性のものの性質に応じて、アンプリコンを含有する鋳型にプライマーを伸長する。RT-PCRは、サンプルから調製されたmRNAの逆転写から作製された鋳型（cDNA）に基づいたPCRである。定量的逆転写PCR（qRT-PCR）またはリアルタイムRT-PCRはサイクル毎の各サンプルのRT-PCR産物が定量化されるRT-PCRである。

20

【0122】

「FISH」または「蛍光インサイチュハイブリダイゼーション」は、遺伝子マーカーをハイブリダイゼーションにより染色体に局在化させることができるアッセイである。典型的には、FISHを行うために、蛍光標識される核酸プローブを、スライドに調製した中期染色体にハイブリダイズする。ハイブリダイズするプローブの存在および位置を蛍光顕微鏡により視覚化することができる。プローブも酵素を含むことができ、蛍光酵素基質と合わせて使用することができる。

30

【0123】

「染色体分類」は、各型の染色体の存在および数（例えば、ヒトハプロタイプである24染色体のそれぞれ（染色体1～22、XおよびY））および例えば、転位または欠失などの染色体の形態学的異常の存在を含む染色体の分析を指す。典型的に、染色体分類は中期の細胞の染色体スプレッドを行うことを含む。次いで、染色体を例えば限定されないが染色または遺伝子プローブを使用して視覚化し、特定の染色体を識別することができる。

【0124】

「遺伝子発現アッセイ」（または「遺伝子発現プロファイリングアッセイ」）は、1つまたは複数の遺伝子発現産物、すなわち、メッセンジャーRNAの存在または量を試験するアッセイである。サンプル由来の目的の細胞の1種または複数種のmRNAを同時にアッセイすることができる。用途が異なるため、遺伝子発現アッセイにおいてアッセイされるmRNA分子の数および/または種類も異なり得る。

40

【0125】

「タンパク質発現アッセイ」（または「タンパク質発現プロファイリングアッセイ」）は1種または複数種のタンパク質の存在または量を試験するアッセイである。サンプル由来の目的の細胞の1種または複数種のタンパク質を同時にアッセイすることができる。用途が異なるため、タンパク質発現アッセイにおいてアッセイされるタンパク質分子の数および/または種類も異なり得る。

【0126】

「組織学的検査」は、細胞型、細胞による特定のマーカーの発現を決定することができ

50

、または細胞の構造的特徴（例えば、核、細胞骨格など）または細胞の状態もしくは機能を明らかにすることができる組織化学物質もしくは染色または特異的結合メンバー（概ね検出可能な標識に連結）を使用する細胞の検査を指す。一般に、細胞をスライド上で調製することができ、組織学的検査用に直接もしくは間接的に検出可能な標識に結合する染料または特異的な結合メンバーを使用して「染色」することができる。組織学的検査で使用することができる染料の例は、核染色、例えば、ヘキスト染色または細胞生存染色（cell viability stain）、例えば、トリパンブルー、あるいは細胞構造染色、例えば、ライトもしくはギムザ、可視沈降物を形成するHRP用の酵素活性ベンジジンである。胎児赤血球細胞の組織学的検査に使用することができる特異的結合メンバーの例は胎児または胚性ヘモグロビンを特異的に認識する抗体である。

10

【0127】

「電極」は高度な導電性材料の構造である。高度な導電性材料は、周囲の構造または材料のものより大きい導電性を有する材料である。適切な高度な導電性材料は、金属、例えば、金、クロム、白金、アルミニウムなどを含み、また非金属、例えば、炭素および導電性ポリマーを含むことができる。電極は任意の形状、例えば、矩形、円形、城壁様などであってよい。電極はまた、半導体材料を少量の他の「不純物質」材料と混合するドーパ半導体を含むことができる。例えば、リンドーパケイ素を電極を形成する導電性材料として使用することができる。

【0128】

「ウェル」はチップ内の構造であり、下面はウェルまたはチャンネルの下面から伸長した1つまたは複数の壁体で少なくとも2面を囲まれる。壁体は、ウェルまたはチャンネルの下面から上方に任意の角度または任意の方法で伸長することができる。壁体は不規則な構成のものであってよく、すなわち、S字状に、または曲線状もしくは多角状に上方に伸長することができる。ウェルまたはチャンネルの下面は、チップの上面と同じ高さもしくはチップの上面より高く、またはウェルがチップの表面のくぼみになるようなチップの上面より低くてもよい。ウェルまたはチャンネルの側部つまり壁体はチップの下面を構成する材料以外の材料を含むことができる。

20

【0129】

「チャンネル」は、下面と、チャンネルの下面から上方に伸長する少なくとも2つの壁体を含むチップの構造であり、2つの対面する壁体の長さはこの2つの対面する壁体の距離より大きい。それゆえ、チャンネルはその内部長に沿って液体を流す。チャンネルを被覆し（「トンネル」）または開口することができる。

30

【0130】

「孔」は、表面の一方から他方に液体の連通をもたらす表面の開口部、例えば、本発明のフィルタである。孔は任意のサイズのもの、および任意の形状のものであってよいが、好ましくは孔は、サンプル成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性（またはその欠如）に基づきフィルタの一方からフィルタの他方に少なくとも1種の不溶性サンプル成分の通過を制限するサイズおよび形状のものである。

【0131】

「スロット」は、表面の開口部、例えば、本発明のフィルタである。スロット長は、その幅より長い（スロットの長さおよびスロットの幅は、サンプル成分が通過するフィルタの平面または表面のスロットの寸法を指し、スロットの深さはフィルタの厚さを指す）。それゆえ、用語「スロット」は、孔の形状が、場合によりおよそ矩形、楕円形、または四角形もしくは平行四辺形のものであることを表す。

40

【0132】

「ブリック」は、サンプル成分がブリックからブリックまで通過することを制限することができる表面に、またはその上に組み込まれることができる構造である。チップに（「障壁」と呼ばれる）ブリックの1種を設計および使用することはAustinらに1998年11月17日に発行された米国特許第5,837,115号に記載されており、その全体を参照により本明細書に組み込む。

50

【0133】

「ダム」は、チャンバの下面上に構成され、チャンバの上面に向かって上方に伸長し、ダムの頂部とチャンバの頂部との間の規定の幅の空間を残すことができる構造である。好ましくはダムの頂部とチャンバの上部壁体との間の空間の幅は、流体サンプルが空間を通過することはできるが、少なくとも1種のサンプル成分はそのサイズ、形状、または変形能（またはその欠如）に基づき空間を通過することができない程度である。チップにダム構造の1種を設計および使用することはWildingらに1999年7月27日に発行された米国特許第5,928,880号に記載され、その全体を参照により本明細書に組み込む。

【0134】

「連続流出」は、分離プロセス中に連続して本発明のチャンバに液体がポンプで送られ、または注入されることを意味する。これによりチャンバに選択的に保持されないサンプルの成分を分離プロセス中にチャンバから洗い流すことが可能になる。

【0135】

「結合パートナー」は、所望の親和性または特異性を有する断片に互いに結合し、所望の物理的な力（各物理的な力）で操作可能である任意の物質を指す。結合パートナーの非限定的な例として微粒子がある。

【0136】

「微粒子」は、所望の物理的な力（各物理的な力）により操作可能である任意の形状の構造および任意の組成物の構造である。本方法で使用される微粒子は約0.01ミクロン～約10センチメートルの寸法を有し得る。好ましくは、本方法で使用される微粒子は、約0.1ミクロン～約数百ミクロンの寸法を有する。このような粒子または微粒子は、任意の適切な材料、例えば、ガラスまたはセラミック、および/または1種または複数種のポリマー、例えば、ナイロン、ポリテトラフルオロエチレン（TEFLON（登録商標））、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、セファロース、アガロース、セルロース、セルロース誘導体、またはデキストランなどからなり得、および/または金属を含むことができる。微粒子の例として限定されないが、磁性ビーズ、磁性粒子、プラスチック粒子、セラミック粒子、カーボン粒子、ポリスチレンマイクロビーズ、ガラスビーズ、中空ガラススフィア、金属粒子、複合組成物の粒子、微細加工された自立微細構造などがある。微細加工された自立微細構造の例として、Hagedornら、“Design of asynchronous dielectric micromotors”, Journal of Electrostatics, Volume: 33, Pages 159-185 (1994)に記載のものがあり得る。複合組成物の粒子は多組成因子を含み、またはそれらからなる粒子、例えば、非導電性ポリマーフィルムの薄層で被覆された金属スフィアを指す。

【0137】

「微粒子の調製物」は、1種類以上の微粒子を含み、場合により少なくとも1種の他の化合物、分子、構造、溶液、試薬、粒子、または化学実体を含むことができる組成物である。例えば、微粒子の調製物は、緩衝液中の微粒子の懸濁液であってよく、場合により特異的結合メンバー、酵素、不活性粒子、界面活性剤、リガンド、洗浄剤などを含むことができる。

【0138】

本明細書において使用される場合、用語「実質的に逆平行の」および「実質的に対向する」は、「およそ逆平行の」および「およそ対向する」それぞれを意味し、例えば、完全な逆平行または対向が約30°内、好ましくは約20°内、より好ましくは約10°内、および最も好ましくは約5°以下であることを意味すると理解される。

【0139】

本明細書において使用される場合、用語「係合した」は、「係合した」と言われるメンバーがいくらかの積極的な試み、エネルギーを加えるなどを行うことなく、互いに離れず、または切り離されないような、機械的または物理的な付着、連動、一致、結合または連

10

20

30

40

50

結の任意の形式を指す。

【0140】

本明細書に記載の本発明の態様および実施形態は、「からなる」および/または「本質的に～からなる」の態様および実施形態を含むことが理解される。

【0141】

本開示全体を通して、本発明の種々の態様が、範囲の書式で表わされる。範囲の書式の記載は単なる便宜上および簡潔さのためのものであることを理解されるべきであり、本発明の範囲の確固たる制限として解釈されるべきではない。したがって、範囲の記載は、特に開示された全ての考えられる部分範囲ならびにその範囲内の個々の数値を有すると考えられるべきである。例えば、1～6の範囲の記載は、1～3、1～4、1～5、2～4、2～6、3～6などの特に開示された部分範囲、ならびにその範囲内の個々の数字、例えば、1, 2, 3, 4, 5, および6を有すると考えられるべきである。これは範囲の幅に関わらず適用される。

10

【0142】

本明細書において使用される他の技術用語は、種々の専門用語辞典に例示されるように、それらが使用される技術分野における一般的な意味を有する。

【0143】

はじめに

本発明は、生物学的流体サンプルなどの複合液体の分析が、分析に干渉し得る多くのサンプル成分により複雑となり得ることを認識する。サンプル分析は、分析の標的が希少細胞型であるとき、例えば、標的細胞が母体血液に存在する胎児細胞または患者の血液もしくは尿に存在する悪性細胞であるときにさらに多くの問題となり得る。このようなサンプルの処理において、多くの場合、容量を管理可能なレベルに減少させることによりサンプルを「分解」し、そして分析の標的である希少細胞の集団を富化することの両方を必要とする（例えば、米国特許第6,949,355号および同第7,166,443号、米国特許出願第2006/0252054号、同第2007/0202536号、同第2008/0057505号および同第2008/0206757号を参照のこと）。流体サンプルの処理の手順は多くの場合、時間がかかり、効率が悪い。いくつかの態様において、本発明は効率的な方法および流体サンプルからの標的成分の分離のための自動システムを提供する。

20

30

【0144】

本発明の幅に対する非限定的な導入部として、本発明は以下を含むいくつかの一般および有用な態様を含む、

1) 筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備え、前方チャンバの流体流路が濾過後サブチャンバの流体流路に実質的に対向する濾過チャンバ、

2) 筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する濾過チャンバ、

3) 筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、ポリレンもしくはその誘導體、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標)-AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する濾過チャンバ、

40

4) 本明細書に開示の濾過チャンバを備えるカートリッジ、

5) 本明細書に開示の濾過チャンバを備える、流体サンプル中の標的成分を分離するための自動濾過ユニット、

6) 本明細書に開示の自動濾過ユニットおよび濾過装置に接続される分析装置を備える、流体サンプルの標的成分を分離し、そして分析する自動システム、

7) 流体サンプルの標的成分を分離する方法であって、a) 本明細書に開示の濾過チャンバに流体サンプルを分注することと、b) 濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流

50

動をもたらすことを含み、流体サンプルの標的成分をフィルタに保持し、またはフィルタを通過させる方法、

8) 本明細書に開示の自動濾過ユニットを使用して流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注することと、b) 濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらすことを含み、流体サンプルの標的成分をフィルタに保持し、またはフィルタを通過させる方法、

9) 本明細書に開示の自動濾過ユニットを使用して流体サンプルの成分を富化し、そして分析する方法であって、a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注すること、b) 濾過チャンバの前方チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらし、そして濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通して溶液の流体流動をもたらし、流体サンプルの標的成分を前方チャンバに保持し、非標的成分をフィルタを通して濾過後サブチャンバに流し、c) 標的成分を標識することと、d) 分析装置を使用して標識された標的成分を分析することを含む、方法。

【0145】

本発明のこれらの態様ならびに本明細書に記載の他の態様は、本方法を使用することにより、本明細書に記載の製造物および物質の組成物により得られることができる。本発明の範囲を完全に理解するために、本発明の種々の態様を組み合わせ、本発明の望ましい実施形態となり得ることがさらに理解される。

【0146】

I. 濾過チャンバ

一態様において、本発明は筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバを提供する。本発明の濾過チャンバがチャンバの内部に1つまたは複数の微細加工されたフィルタを備える実施形態において、フィルタまたは各フィルタがチャンバをサブチャンバに分割することができる。濾過チャンバが単一の内部に微細加工されたフィルタを備える場合、例えば、濾過チャンバが、粗濾過の「前方チャンバ」、または適宜、「上部サブチャンバ」および「濾過後サブチャンバ」、あるいは適宜、「下部サブチャンバ」を備えることができる。他の場合において、微細加工されたフィルタは、濾過チャンバの壁体を形成することができ、濾過中、濾過可能なサンプル成分がフィルタを介してチャンバから排出される。

【0147】

本発明のいくつかの実施形態において、本発明の濾過チャンバはサンプルをチャンバに導入させる少なくとも1つのポートを有し、導管はサンプルを本発明の濾過チャンバに、およびチャンバから運搬することができる。流体流動が開始される時、1つまたは複数のフィルタを通り流れるサンプル成分は、チャンバの1つまたは複数の領域に流れた後、導管を通してチャンバから排出されることができ、好ましくは、しかし場合により導管から容器、例えば、廃棄物容器に排出されることができ、場合により1種または複数種の試薬、溶液、または緩衝液の添加のための1つまたは複数のさらなるポートを有し得る。本明細書全体を通して、流入ポートまたは流出ポートはそれらに命名された機能に対して対向する方向の流動を用いて使用することが理解される。

【0148】

いくつかの実施形態において、濾過チャンバはさらなるフィルタ、または適宜、「上方フィルタ」を備えることができる。いくつかの実施形態において、前方チャンバと上方チャンバとの間の上方フィルタは、ゆっくりした流動状態においてその平坦度を維持するのに十分な硬さの任意のフィルタであってよく、5ミクロンより小さい開口部を有する孔またはスロットを得る任意の方法により生成され得る。上方フィルタはさらに前方チャンバまたは濾過後サブチャンバを分割することができる。いくつかの実施形態において、濾過前方チャンバは流入ポート、流出ポート、およびさらなる流入ポートを備えることができ、さらにさらなる流入ポートを別の微細加工されたフィルタにより前方チャンバから分離し、それにより上方チャンバを作製する。

【0149】

本発明の濾過チャンバは1種または複数種の液体不透過性材料、例えば限定されないが、金属、ポリマー、プラスチック、セラミック、ガラス、ケイ素、または二酸化ケイ素を含む材料を含むことができる。好ましくは、本発明の濾過チャンバは約0.01ミリリットル～約10リットル、より好ましくは約0.2ミリリットル～約2リットルの容量を有する。本発明のいくつかの好ましい実施形態において、濾過チャンバは約1ミリリットル～約80ミリリットルの容量を有し得る。

【0150】

本発明の濾過チャンバは任意の数のフィルタを備え、または係合することができる。本発明の好ましい実施形態において、濾過チャンバは1つのフィルタを備える（例えば、図5および図14を参照のこと）。本発明の別の好ましい実施形態において、濾過チャンバは、図6および図7に例示されるチャンバなどの2つ以上のフィルタを備える。種々のフィルタチャンバの構成が可能である。例えば、フィルタチャンバの1つまたは複数の壁体が微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバを有することは本発明の範囲内である。また、フィルタチャンバが1つまたは複数のフィルタと係合する濾過チャンバを有することは本発明の範囲である。この場合、フィルタはチャンバと恒久的に係合することができ、または取り外し可能であり得る（例えば、フィルタをチャンバに設けられたスロットまたはトラックに挿入することができる）。フィルタをチャンバの壁体として、またはチャンバの内部として設けることができ、フィルタを場合により連続濾過処理のために縦一列に設けることができる。フィルタをチャンバに挿入する場合、濾過作業の間に、チャンバを通る流体流動（フィルタの一方から他方へ）がフィルタの孔を通らなければならないように、チャンバの壁体を使って緊密な密封を形成するようにフィルタを挿入する。

10

20

【0151】

本発明の好ましい実施形態において、例えば、およそ1センチメートル×1センチメートル×0.2～10センチメートルの寸法の濾過チャンバは、4～1,000,000個のスロット、好ましくは100～250,000個のスロットを備える1つまたは複数のフィルタを有し得る。この好ましい実施形態において、スロットは用途に応じて、好ましくは約0.1～約1,000ミクロンのスロット長およびスロット幅が好ましくは約0.1～約100ミクロンである矩形のものである。

【0152】

好ましくは、スロットはチャンネルを通して、したがって、チャンバから成熟赤血球細胞（無核）を通過させることができるが、大きな径または形状を有する細胞（例えば限定されないが、白血球細胞などの有核細胞および有核赤血球細胞）をチャンバから排出させない、または最小限にすることができる。チャンバを通る流体流動による赤血球細胞の除去を可能にする一方で血液サンプルの他の細胞を保持する濾過チャンバは図7、図14、および図16に図示される。例えば、有核RBC由来の成熟赤血球細胞および白血球細胞を除去するために、2.5～6.0ミクロン、より好ましくは2.2～4.0ミクロンのスロット幅を使用することができる。スロット長は、例えば、20～200ミクロンと変化し得る。スロット深さ（すなわち、フィルタ膜厚）は40～100ミクロンと変化し得る。2.0～4.0ミクロンのスロット幅は、2つ折りの円盤状RBCがスロットを通過することは可能にするが、おもに7ミクロン以上の径または形状の有核RBCおよびWB

30

40

【0153】

逆平行流動

いくつかの実施形態において、本発明の濾過チャンバは前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの平行または逆平行流体流動が可能となるよう構成され得る。前方チャンバは2つのポート、つまり流入ポートおよび流出ポートを有し得る。濾過後サブチャンバは2つのポート、つまり流入ポートおよび流出ポートを有し得る。ポートは前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動が実質的に互いに対向つまり逆平行であるように配列され得る。前方チャンバの流入ポートを使用し、流体サンプル、例えば、血液サンプル、細胞懸濁液などを濾過チャンバに分注することができる。

50

【0154】

いくつかの実施形態において、デバイスは、血液サンプルが前方チャンバを通り流れることができるように、流入および流出のための2つのポート（1つは1つまたは複数のフィルタのいずれかの側にある）を有する単一の前方チャンバを有する。例えば、血液サンプルを前方チャンバを通してポンプで送り、チャンバに充填させることができる。1つの開口部がその末端にリザーバーを備える好ましい実施形態において、細胞および化合物などの粒子を場合によりリザーバーを介して添加することができる。別法として、粒子、化合物のいずれか、または両方をリザーバーに接続されていない開口部で前方チャンバに添加することができる。いくつかの実施形態において、前方チャンバは2つ以上の流入および/または流出ポートを備えることができる。例えば、洗浄用溶液を流入をもたらすために、またはフィルタ全体に流体サンプルの成分を押し付けるための流体力を得るためにさらなる流入ポートを使用することができる。上方フィルタが前方チャンバを上方チャンバと前方チャンバに分割するために備えられる実施形態において、さらなる流入ポートにより上方フィルタへの流体流動をもたらすことができる。

10

【0155】

いくつかの好ましい実施形態において、濾過後サブチャンバはまた、一端が溶液導入のための開口部およびもう一端が溶液流出のための開口部を有する単一の流体流動チャンネルである。いくつかの実施形態において、濾過後サブチャンバは、2つ以上の流入および/または流出ポートを備え得る。例えば、濾過後サブチャンバの多数の流出ポートを使用し、成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基つき様々な濾過成分を収集することができる。

20

【0156】

いくつかの実施形態において、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動は、陰圧が生じ、成分または細胞がフィルタを通して吸引され得るようになされ得る。いくつかの実施形態において、底部チャンバからの流出は、前方チャンバを移動する流体サンプルの一部を濾過後サブチャンバに吸引することができ、そうして赤血球細胞および血小板が白血球細胞およびフィルタにより前方チャンバに保持される他の有核細胞から分離されるように、底部チャンバへの流入より大きくなる。いくつかの実施形態において、流出液は流入液より含有し得る細胞は少ない。

【0157】

いくつかの実施形態において、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動は、様々な流速を有するように構成され得る。前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動の差が前方チャンバと濾過後サブチャンバとの間のフィルタを通して流体力を生じ得ることが考えられる。前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの液体の流速を圧制御自動濾過ユニット、例えば、流入および/または流出ポートのポンプにより制御することができる。いくつかの実施形態において、圧制御自動濾過ユニットを自動制御システム、例えば、アルゴリズムを稼働するコンピュータにより調節することができる。

30

【0158】

濾過チャンバは、サンプル、洗浄などの溶液もしくは溶出液またはその両方の流動に影響を与える1つまたは複数の表面輪郭を含み得る。例えば、輪郭がサンプルを偏向、分散または方向付けし、サンプルをフィルタに沿って拡散させる手助けをすることができる。別法として、輪郭は洗浄液がより効率的にチャンバまたはフィルタを洗浄するように洗浄液を偏向、分散または方向付けすることができる。このような表面輪郭は任意の適当な構成であってよい。輪郭は概ねチップに向かって突出し、または概ねチップから遠ざかって突出し得る表面を備え得る。輪郭は概ねフィルタを囲み得る。輪郭は、限定されないが突起、凹部、スロット、偏向構造、例えば、ボール様部分、気泡（例えば、空気、洗浄剤、またはポリマーから形成）などを含み得る。2つ以上のスロットなどの輪郭は互いに概ね平行に、さらにチャンバを垂直に見たときに概ねらせん状に流動を方向付ける角度に構成され得る。

40

【0159】

50

いくつかの実施形態において、前方チャンバの流出ポートを収集チャンバに接続することができ、流体サンプルの標的成分、例えば、血液サンプル由来の有核細胞、または細胞懸濁液由来のがん性細胞を、不必要な成分を濾過により分離した後に収集することができる。

【0160】

いくつかの実施形態において、本発明の濾過チャンバを2つの筐体部分、例えば、頂部筐体部分および底部筐体部分により形成することができ、これらを可逆的に係合し、フィルタを囲む濾過チャンバを形成することができる。筐体部分を任意の適切な方法、例えば限定されないがレーザー接着、接着材料などを使用して合わせて接着することができる。底部筐体部分はトレイまたはタンクの形態であってよく、好ましくは緩衝液をチャンバを通り流すための少なくとも1つの入口および少なくとも1つの出口を有する。

10

【0161】

表面処理または修飾

いくつかの実施形態において、本発明は、微細加工されたフィルタの表面および/または微細加工されたフィルタを囲む筐体の内部表面に対して処理または修飾し、その濾過効率を改良する。いくつかの実施形態において、表面処理はフィルタおよび筐体の均一な被膜を生成する。いくつかの実施形態において、フィルタの一面または両面を処理もしくは被覆または修飾し、その濾過効率を増大させる。表面修飾はフィルタを通して流体サンプルの成分の濾過を促進し、流体サンプルの成分、例えば、細胞、細胞片、タンパク質凝集体、脂質などによりフィルタ上のスロットを塞ぐことを減少させることができる。いくつかの実施形態において、フィルタの一面または両面を処理または修飾し、サンプル成分（例えば限定されないが細胞）がフィルタに相互作用し、またはフィルタに付着する可能性を低下させる。

20

【0162】

フィルタの表面および/または筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレン、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、Teflon（登録商標）-AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾することができる。いくつかの実施形態において、パーフルオロカーボンは液体形態であってよい。いくつかの実施形態において、パーフルオロカーボンは1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロオクチルトリエトキシシラン、1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ（1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロオクチル）シランまたはトリクロロ（オクタデシル）シランであってよく、これらは液体形態であってよい。いくつかの実施形態において、パーフルオロカーボンは表面に共有結合し得る。フィルタおよび/または筐体の内部表面の表面修飾は、蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングを介してなされ、均一な被膜を生成することができる。

30

【0163】

フィルタおよび/または筐体は、例えば、その表面特性（例えば疎水性、親水性）を変更するよう物理的または化学的に処理することができる。例えば、蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングは、フィルタおよび/または筐体の表面を処理または修飾するために使用することができる方法の一部である。任意の適切な蒸着方法、例えば、物理蒸着、プラズマ強化化学蒸着、化学蒸着などを使用することができる。物理蒸着、化学蒸着、プラズマ強化化学蒸着または粒子スパッタリングに適した材料は、限定されないが、金属窒化物または金属ハロゲン化物、例えば、窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、窒化ホウ素、パリレンまたはその誘導体、例えば、パリレン、パリレン-N、パリレン-D、パリレンAF-4、パリレンSF、およびパリレンHTを含み得る。ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）またはTeflon（登録商標）-AFも化学蒸着に使用することができる。

40

【0164】

例えば、フィルタおよび/または筐体を低窒素もしくはアンモニアまたは窒素ガスまたは他のガスあるいは任意の組み合わせ、またはこれらの順の、チャンバでのプラズマを用

50

いて加熱または処理することができ、窒化ケイ素で修飾することができ、または少なくとも1種の酸または少なくとも1種の塩基を用いて処理し、所望の表面電荷および表面種を印加することができる。例えば、ガラスまたはシリカのフィルタおよび/または筐体を窒素またはアルゴン環境において加熱し、フィルタおよび/または筐体の表面から酸化物を除去することができる。加熱時間および温度をフィルタおよび/または筐体材料および所望の反応の程度に応じて変化させることができる。一例において、ガラスのフィルタおよび/または筐体を摂氏約200~1200度の温度に約30分から24時間加熱することができる。

【0165】

別の例において、フィルタおよび/または筐体を1種または複数種の酸または1種または複数種の塩基で処理し、フィルタ表面の陽性度を増大させることができる。好ましい実施形態において、ガラスまたはシリカを含むフィルタおよび/または筐体を少なくとも1種の酸で処理する。

10

【0166】

本発明のフィルタおよび/または筐体を処理するときに使用される酸は、任意の酸であってよい。非限定的な例として、酸はギ酸、シュウ酸、アスコルビン酸であり得る。酸は約0.1N以上の濃度のもの、および好ましくは約0.5N以上の濃度であり、より好ましくは約1Nより高い濃度である。例えば、酸の濃度は好ましくは約1N~約10Nである。インキュベーション時間は1分~数日間であってよいが、好ましくは約5分~約2時間である。

20

【0167】

親水性を増大させるために微細加工されたフィルタおよび/または筐体を処理するのに最適な濃度およびインキュベーション時間は経験的に決定することができる。微細加工されたフィルタおよび/または筐体を任意の時間、好ましくは2分以上、およびより好ましくは約5分超の間、酸の溶液に入れることができる。酸処理は非凍結および非沸騰温度下において、好ましくは室温以上の温度で行われ得る。

【0168】

別法として、限定されないが、ヒドラジン、水素化アルミニウムリチウム、水素化ホウ素、亜硫酸、亜リン酸、ジチオスレイトール、鉄含有化合物、例えば、硫酸鉄(II)などの還元剤を酸の代わりに、もしくは酸に加えて、または任意の順で酸とともに使用することができる。還元溶液は、約0.01M以上の濃度のものであってよく、好ましくは約0.05Mより大きく、より好ましくは約0.1Mより大きい濃度である。微細加工されたフィルタおよび/または筐体を任意の時間、好ましくは2分以上、およびより好ましくは約5分超の間、還元溶液に入れることができる。処理は非凍結および非沸騰温度下において、好ましくは室温以上の温度で行われ得る。

30

【0169】

フィルタおよび/または筐体表面の親水性を増大させるときの物理的または化学的処理の有効性を処理済みまたは非処理フィルタおよび/または筐体の表面に載せた水滴の広がり測定することにより試験することができ、均一な容量の水滴の広がりの増大が表面の親水性の増大を示す(図5)。フィルタおよび/または筐体処理の有効性も、処理済みフィルタおよび/または筐体と細胞または生物学的サンプルをインキュベーションすることにより試験し、処理済みフィルタおよび/または筐体へのサンプル成分の付着の程度を決定することができる。

40

【0170】

別の実施形態において、フィルタおよび/または筐体、例えば限定されないが、ポリマーフィルタおよび/または筐体の表面を化学処理し、フィルタおよび/または筐体の表面の特性を変更することができる。例えば、ガラス、シリカ、または高分子フィルタおよび/または筐体の表面を、サンプル成分とフィルタおよび/または筐体の表面の相互作用を減少させ得る化学基を添加する種々の化学処理のいずれかにより誘導体化することができる。

50

【0171】

1種または複数種の化合物も、任意の適切な材料、例えば、1種または複数種の金属、1種または複数種のセラミック、1種または複数種のポリマー、ガラス、シリカ、窒化ケイ素、またはそれらの組み合わせからなる微細加工されたフィルタおよび/または筐体の表面上に吸着させ、または結合させることができる。本発明の好ましい実施形態において、本発明の微細加工されたフィルタおよび/または筐体の表面または各表面を化合物で被覆し、サンプル成分とフィルタおよび/または筐体の表面の相互作用を減少させることにより濾過の効率を増大させる。

【0172】

例えば、フィルタおよび/または筐体の表面を、分子、例えば限定されないが、タンパク質、ペプチド、またはポリマー、例えば、天然または合成ポリマーで被覆することができる。フィルタおよび/または筐体を被覆するために使用される材料は、好ましくは細胞または生物学的サンプルの他の成分、例えば、タンパク質、核酸などに有害な影響を与えないことを意味する生体適合性である。ウシ血清アルブミン(BSA)などのアルブミンタンパク質は、本発明の微細加工されたフィルタおよび/または筐体を被覆するために使用することができるタンパク質の例である。フィルタおよび/または筐体を被覆するために使用されるポリマーは、フィルタおよび/または筐体への細胞の接着が促進されない任意のポリマー、例えば、非疎水性ポリマー、例えば限定されないが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニル酢酸(PVA)、およびポリビニルピロリドン(PVP)およびセルロースまたはセルロース様誘導体であってよい。

10

20

【0173】

例えば、金属、セラミック、ポリマー、ガラス、またはシリカからなるフィルタおよび/または筐体を任意の実行可能な手段、例えば、吸着または化学結合により化合物で被覆することができる。

【0174】

多くの場合、化合物またはポリマーで被覆する前にフィルタおよび/または筐体を表面処理することは有益となり得る。表面処理は被覆の安定性および均一性を増大させることができる。例えば、化合物またはポリマーでフィルタおよび/または筐体を被覆する前に、フィルタおよび/または筐体を少なくとも1種の酸または少なくとも1種の塩基で、あるいは少なくとも1種の酸および少なくとも1種の塩基で処理することができる。本発明の好ましい態様において、ポリマー、ガラス、またはシリカからなるフィルタおよび/または筐体を少なくとも1種の酸で処理した後、数分から数日の期間に被覆化合物の溶液でインキュベーションする。例えば、ガラスフィルタおよび/または筐体を酸でインキュベーションし、水で洗浄した後、BSA、PEG、またはPVPの溶液にインキュベーションすることができる。

30

【0175】

本発明のいくつかの態様において、好ましくは、酸もしくは塩基処理または酸化剤での処理の前に、および好ましくは化合物またはポリマーでフィルタおよび/または筐体を被覆する前にもう一度、フィルタおよび/または筐体を水(例えば、脱イオン水)または緩衝液で洗浄することができる。2種類以上の処理を微細加工されたフィルタおよび/または筐体に行う場合、洗浄も処理の間、例えば、酸化剤と酸の処理の間、または酸と塩基の処理の間に行うことができる。フィルタおよび/または筐体を水または約3.5~約10.5およびより好ましくは約5~約9のpHである水溶液で洗浄することができる。微細加工されたフィルタおよび/または筐体を洗浄するために適した水溶液の非限定的な例として、塩溶液(塩溶液がマイクロモルの範囲~5M以上の濃度であり得る)、生物学的緩衝液、細胞媒体、または希釈液あるいはそれらの組み合わせがあり得る。洗浄を任意の時間、例えば、数分から数時間行うことができる。

40

【0176】

フィルタおよび/または筐体を被覆するために使用される化合物またはポリマー溶液の濃度は、約0.02%~20%以上に変化してよく、使用される化合物に一部依存する。

50

被覆溶液のインキュベーションは、数分から数日であってよく、好ましくは約10分～2時間である。

【0177】

被覆後、フィルタおよび/または筐体を水または緩衝液で洗浄することができる。

【0178】

本発明の処理方法も、濾過用の孔を備えるチップ以外のものに適用することができる。例えば、金属、セラミック、1種または複数種のポリマー、ケイ素、二酸化ケイ素、またはガラスを含むチップを本発明の方法を使用して物理的または化学的に処理することができる。このようなチップは、例えば、細胞、細胞小器官、複合体、または生体分子（例えば、核酸、タンパク質、小分子）などの生物学的種を分離、検出、または分析する分離、分析、および検出デバイスにおいて使用することができる。チップの処理は、使用される処理、操作される生物学的種の性質、および操作の性質に応じて、生物学的種とチップ表面の相互作用を増強または低下させることができる。例えば、チップを、操作される生物学的種および操作の性質に応じて親水性または疎水性ポリマーで被覆することができる。さらなる例として、チップの表面を親水性ポリマーで被覆することは（例えば限定されないが、チップをPVPまたはPVAで被覆）、チップの表面と細胞との相互作用を減少または最小限にすることができる。

10

【0179】

多重化

本発明のいくつかの実施形態において、2つ以上の濾過チャンバを多重化構成に組み合わせることができる。例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10以上の濾過チャンバを組み合わせることができる。図34は、8個の濾過チャンバを組み合わせた場合の例示的实施形態を示す。いくつかの実施形態において、多重化構成の各濾過チャンバは互いに独立し、すなわち、多重化構成内の他の濾過チャンバと流体接続状態でない。いくつかの実施形態において、多重化構成の濾過チャンバの一部または全ては互いに流体接続状態であってよい。例えば、濾過チャンバの一部または全ては一般的な筐体を有することができる、または流体チャンネルまたは導管により互いに接続されることができる。

20

【0180】

図34に示すように、多重化構成の濾過チャンバを隣り合って配列し、または直線状にあるいはその両方で配列することができる。多重化構成の濾過チャンバを同じ配向、もしくは対向の配向、またはその組み合わせで配列することができる。いくつかの実施形態において、少なくとも2つの濾過チャンバが縦一列に動作し、さらに各濾過チャンバ内のフィルタのスロットは、濾過チャンバがスロット幅が大きくなる順に配列される様々な幅のスロットである。

30

【0181】

いくつかの実施形態において、少なくとも2つの濾過チャンバが縦一列に配列され、続く濾過チャンバがスロット幅が大きくなるフィルタを備える。いくつかの実施形態において、フィルタは流路に沿ってサイズが大きくなるスロット幅を含み、さらに上方濾過チャンバが存在し、濾過後チャンバは多数の仕切りを含有し、1つの仕切り当たり1つの流出ポートを通り流動を外に方向付ける。いくつかの実施形態において、濾過後チャンバの各仕切りセグメントからの流出ポートはその流出と合致し、2.25mm毎もしくは4.5mm毎または9mm毎あるいは18mm毎に配置されたウェルを有するマルチウェル型薬物スクリーニングプレートの個々のウェルに直接その流出を堆積させることができる。

40

【0182】

図37は多重化構成の別の実施形態を例示する。この構成では、2つの濾過チャンバが上方フィルタと微細加工されたフィルタとの間の前方チャンバを通る流体接続状態にある。濾過チャンバのフィルタは様々なスロットサイズを有し、そのため様々な成分を回収領域1および2で回収することができる。

【0183】

自動濾過ユニット

50

いくつかの実施形態において、本発明の濾過チャンバは、濾過チャンバを通して流体流動を制御する手段を備える濾過ユニットの一部である。任意の適切な機構を使用し、濾過チャンバ、例えば、液体ポンプ、弁、導管、チャンネルなどの流体流動を制御することができる。いくつかの実施形態において、制御アルゴリズム、例えば、コンピュータプログラムを使用し、流体流動を制御することができる。前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの両方の流体流動を制御アルゴリズムにより制御することができる。

【0184】

前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動が実質的に逆平行である実施形態において、図33に示されるように、多数の液体ポンプを使用し、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流速を個別に制御することができる。供給ポンプ(3)を使用し、前方チャンバの流速を制御することができ、緩衝液ポンプ(1)および廃棄物ポンプ(2)を使用して、濾過後サブチャンバの流速を制御することができる。

10

【0185】

いくつかの実施形態において、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動を、様々な流速になるように構成することができる。前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動の差が前方チャンバと濾過後サブチャンバとの間のフィルタを通る流体力を生じ得ることが考えられる。

【0186】

いくつかの実施形態において、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動は、陰圧(5)が生じ、成分または細胞がフィルタを通して吸引され得るようになされ得る。いくつかの実施形態において、底部チャンバからの流出は、前方チャンバを移動する流体サンプルの一部を濾過後サブチャンバに吸引することができ、そうして赤血球細胞および血小板が白血球細胞およびフィルタにより前方チャンバに保持される他の有核細胞から分離されるように、底部チャンバへの流入より大きくなる。いくつかの実施形態において、流出液は流入液より含有し得る細胞は少ない。

20

【0187】

例えば、図5に示される、本発明の好ましい1つの濾過ユニットは、サンプルを添加するための弁制御入口(弁A(6))、サンプルの濾過のために陰圧が印加される導管に接続した弁(弁B(7))およびチャンバを洗浄するための濾過チャンバへの洗浄緩衝液の流動を制御する弁(弁C(8))を備える。本発明のいくつかの実施形態において、濾過ユニットは、サンプルが場合によりチャンバに入ることを可能にする自動制御下にあり得る弁、チャンバから排出される廃棄物、および濾過のための流体流動をもたらす陰圧を含み得る。

30

【0188】

溶液または上清を濾過チャンバに移すために、針(限定されないが、規定されたもの)を使用することができる。針を、容量を保持することができる容器(例えば、チューブまたはチャンバ)に接続させることができる。針は、溶液を含有するチューブから細胞を収集し、溶液を押し出し、引き戻すデバイス(例えば、ポンプまたはシリンジ)を使用して別のチャンバに溶液を分注することができる。

【0189】

いくつかの実施形態において、前方チャンバの流入ポートをカラムに接続し、そうしてサンプル溶液の不必要な成分の特異的結合メンバーをカラムの固体表面に固定することができる。例えば、レクチン、受容体リガンドまたは抗体をカラムに固定し、血液サンプルから赤血球細胞、白血球細胞または血小板を除去することができる。

40

【0190】

流体サンプルの成分を分離し、そして分析するための自動システム

本明細書において、濾過チャンバにより分離された標的成分を分析する自動濾過ユニットと流体接続する濾過チャンバを備える、流体サンプルの標的成分を分離し、そして分析する自動システムをさらに記載する。いくつかの実施形態において、濾過チャンバの前方チャンバを直接自動濾過ユニットに接続することができ、そうしてフィルタに保持された

50

有核細胞または希少細胞などの標的成分を直接分析用自動濾過ユニットに入れることができる。前方チャンバまたは収集チャンバの流出ポートも自動濾過ユニット、例えば、フローサイトメーターに接続することができ、そうして分離した成分をさらに操作することなく直接分析することができる。いくつかの実施形態において、標的成分を分析前に標識することができる (the target component by be labeled before the analysis)。

【0191】

電極を備えるフィルタ

いくつかの好ましい実施形態において、進行波誘電泳動力を、濾過チャンバの一部であるチップに組み込まれた電極により生じることができ、細胞などのサンプル成分をフィルタから遠ざかって移動するために使用することができる。この場合、微小電極をフィルタ表面に作製し、電極を進行波誘電泳動が細胞などのサンプル成分を電極板または濾過プロセスを行うフィルタ表面に移動させることができるように配列する。進行波誘電泳動の完全な説明は、弁理士登録番号471842000400の、2000年10月4日出願の“Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof”と題した、米国特許出願第09/679,024号に記載され、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0192】

フィルタの一実施形態において、互いに組み合わせられた微小電極をフィルタ表面、例えば、図2に示されるものまたは“Novel dielectrophoresis-based device of the selective retention of viable cells in cell culture media” Docoslisら, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 54, No. 3, pages 239-250, 1997, および1997年5月7日、Docoslisらに発行された米国特許第5,626,734号に記載のものに作製される。この実施形態において、電極により生じた負の誘電泳動力は、細胞などのサンプル成分をフィルタ表面またはフィルタスロットから反発させることができ、そうしてフィルタに収集された細胞は濾過プロセスの間フィルタを塞ぐことはない。進行波誘電泳動または負の誘電泳動を使用して濾過を強化する場合、流体流動が停止し、または大きく減少した期間、電極要素に濾過プロセス全体を通して定期的にエネルギーを加えることができる。

20

30

【0193】

誘電泳動力を生じることができる電極を組み込むミクロンの範囲のスロットを有するフィルタを図3(AおよびB)に例示する。例えば、ケイ素基板上に作製された18ミクロン幅および18ミクロン溝の組み合わせられた電極をフィルタ上に作製したフィルタを作製している。個々のフィルタスロットは100ミクロン(長さ)×2~3.8ミクロン(幅)の寸法の矩形形状のものであった。各フィルタは独自のスロットサイズ(例えば、長さ×幅:100ミクロン×2.4ミクロン、100ミクロン×3ミクロン、100ミクロン×3.8ミクロン)であった。長さ方向に沿って、隣接するフィルタスロット間の溝は20ミクロンであった。幅方向に沿って、隣接のスロットは整列されておらず、代わりにオフセットされた。別法として、フィルタスロットの隣り合うカラムのオフセット間隔は50ミクロンまたは30ミクロンであった。長さ方向に沿ってスロットの中心線が電極の中心線、もしくは電極の縁部、または電極間の溝の中心線で整列するようにフィルタスロットを電極に対して位置づけた。

40

【0194】

電極はまた、フィルタを囲む濾過チャンバの筐体上に位置づけられ得る。いくつかの実施形態において、電極を前方チャンバおよび/または濾過後サブチャンバに位置づけることができる。電極を誘電泳動力がフィルタに対してフィルタスロット周囲に生じるように位置づけることができる。いくつかの実施形態において、誘電泳動力は、フィルタスロ

50

トまたはフィルタ表面から細胞もしくは他のサンプル成分を遠ざけることができる。

【0195】

以下の議論および参照により、濾過が可能でない細胞などのサンプル成分をフィルタから離れて転位させることにより濾過を促進する電極の設計および使用の骨組みが提供され得る。

【0196】

誘電泳動は、不均一なAC電場の分極した粒子の移動を指す。粒子を電場に入れるときに、粒子およびその周囲の媒体の誘電特性が異なる場合、粒子は誘電分極を行う。したがって、電荷が粒子/媒体の接触面で誘導される。印加された電場が不均一な場合、この時不均一な電場と誘導された分極電荷との間の相互作用が強いまたは弱い電場強度領域に粒子を移動させる、粒子に作用する正味の力が生じる。粒子に作用する正味の力は誘電泳動力と呼ばれ、粒子の動きは誘電泳動である。誘電泳動力は粒子の誘電特性、粒子を囲む媒体、印加された電場の周波数および電場分布に依存する。

10

【0197】

進行波誘電泳動は、進行電場が電場誘導性分極と相互作用し、粒子に作用する電力を生じる誘電泳動と類似している。粒子は進行場の方向に、または方向に反対のいずれかの移動を生じる。進行波誘電泳動力は粒子および粒子が懸濁する媒体の誘電特性、進行場の周波数および大きさに依存する。誘電泳動および進行波誘電泳動の理論および微粒子の操作および処理のための誘電泳動の使用が種々の刊行物に見つけることができる(例えば、“Non-uniform Spatial Distributions of Both the Magnitude and Phase of AC Electric Fields determine Dielectrophoretic Forces”, Wang *et al.*, *Biochim Biophys Acta* Vol. 1243, 1995, pages 185 - 194”、“Dielectrophoretic Manipulation of Particles”, Wang *et al.*, *IEEE Transactions on Industry Applications*, Vol. 33, No. 3, May/June, 1997, pages 660 - 669、“Electrokinetic behavior of colloidal particles in traveling electric fields: studies using yeast cells”, Huang *et al.*, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, Vol. 26, pages 1528 - 1535、“Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and traveling waves”, Fuhr *et al.*, *Sensors and Materials*. Vol. 7: pages 131 - 146、“Dielectrophoretic manipulation of cells using spiral electrodes”, Wang, X-B. *et al.*, *Biophys. J.* Vol. 72, pages 1887 - 1899, 1997、“Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity”, Becker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, Vol. 92, January 1995, pages 860 - 864)。誘電泳動および進行波誘電泳動を用いた微小粒子の操作は、粒子の濃縮/凝集、捕集、反発、直線状もしくは他の方向付けされた動作、浮遊、または分離を含む。粒子は電極反応チャンバの特定の領域で集束され、富化され、捕集され得る。粒子は顕微鏡規模で様々な亜集団に分離され得る。本発明の濾過方法に関連し、粒子を特定の距離に運搬することができる。特定の粒子操作に必要な電場分布は、微小電極構造の寸法および形状に依存し、誘電泳動理論および電場シミュレーション法を使用して設計されることができる。

20

30

40

【0198】

不均一な電場下にある半径 r の粒子に作用する誘電泳動力 $F_{DEP,z}$ は、以下の式によ

50

り表すことができ、

【数 1】

$$F_{DEPz} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} \nabla E_{rms}^2 \cdot \vec{a}_z$$

式中、 E_{rms} は電場強度の R M S の値であり、 ϵ_m は媒体の誘電透過性である。 χ_{DEP} は、

【数 2】

$$\chi_{DEP} = \text{Re} \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right)$$

10

に表される、粒子誘電分極因子または誘電泳動分極因子である。

【0199】

「Re」は「複素数」の実数部分を指す。記号

【数 3】

$$\epsilon_x^* = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{2\pi f}$$

は、複素誘電率 (complex permittivity) である (粒子 $x = p$ 、および媒体 $x = m$)。パラメータ ϵ_p および σ_p は、それぞれ粒子の実効誘電率および導電率である。これらのパラメータは周波数依存性であり得る。例えば、典型的な生物学的細胞は、少なくとも細胞質膜分極のため、周波数依存性、実効導電率および誘電率を有する。

20

【0200】

誘電泳動力の上記の式を以下のように記載することもでき、

【数 4】

$$F_{DEPz} = 2\pi\epsilon_m r^3 \chi_{DEP} V^2 p(z) \vec{a}_z$$

式中、 $p(z)$ は電極上の自動濾過ユニット電圧励起 ($V = 1V$) の平方電場分布であり、 V は印加された電圧である。

【0201】

30

一般に、正極誘電泳動および負の誘電泳動の 2 種類の誘電泳動がある。正極誘電泳動において、粒子は誘電泳動力により強い電場領域に向かって移動する。負の誘電泳動において、粒子は誘電泳動力により弱い電場領域に向かって移動する。粒子が正極および負の誘電泳動を示すかは、粒子が周囲の媒体より分極性が強いまたは弱いかにより依存する。本発明の濾過方法において、濾過チャンバの 1 つまたは複数のフィルタの電極パターンを細胞などのサンプル成分が負の誘電泳動を示し、細胞などのサンプル成分がフィルタ表面の電極から反発して離れるように設計することができる。

【0202】

進行波 DEP 力は進行波電場により粒子または分子に生じる力を指す。進行波電場は AC 電場成分の位相値の不均一分布を特徴とする。

40

【0203】

ここで、理想的な進行波場の進行波 DEP 力を分析する。進行波電場

【数 5】

$$E_{TWD} = E \cos(2\pi(ft - z/\lambda_0)) \vec{a}_x$$

(すなわち、 x 方向電場が z 方向に沿って進行する) 下にある半径 r の粒子に作用する誘電泳動力 F_{DEP} は、以下の式により表され、

【数 6】

$$F_{TWD} = -2\pi\epsilon_m r^3 \zeta_{TWD} E^2 \cdot \vec{a}_z$$

50

式中、 E は電場強度の大きさであり、 ϵ_m は媒体の誘電率であり、 ζ_{TWD} は、
【数 7】

$$\zeta_{TWD} = \text{Im} \left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \right),$$

で表される粒子分極因子であり、「Im」は「複素数」の虚数部分を指す。記号

【数 8】

$$\epsilon_x^* = \epsilon_x - j \frac{\sigma_x}{2\pi f}$$

10

は複素誘電率である（粒子 $x = p$ 、および媒体 $x = m$ ）。パラメータ ϵ_p および σ_p は、それぞれ粒子の実効誘電率および導電率である。これらのパラメータは周波数依存性であり得る。

【0204】

様々な誘電特性（誘電率および導電率により定義される場合）を有する生物学的細胞などの粒子は、様々な誘電泳動力を得る。粒子（生物学的細胞を含む）の進行波 DEP 操作において、10 ミクロン径の粒子に作用する進行波 DEP 力は、およそ 0.01 ~ 1000 pN と変化し得る。

【0205】

20

進行波電場はチップに適切に配列された微小電極に適切な AC 信号を印加することにより確立され得る。進行波電場を生じるために、それぞれが異なる位相値を有する少なくとも 3 種類の電気信号を印加することが必要である。進行波電場を生成する例は、四位相直交信号（0、90、180 および 270 度）を使用し、チップ表面にパターン化した 4 つの線状平行電極にエネルギーを加えることである。このような 4 つの電極は基本的な繰り返し単位を形成する。用途に応じて、互いの隣に位置するこのような単位が 2 つを超えてよい。これにより、電極上または電極附近の空間に進行電場を生じる。電極要素が特定の空間的に連続する順に沿って配列される限り、位相順となる信号を印加することにより、電極に近い領域における進行電場の確立がもたらされる。

【0206】

30

粒子に作用する誘電泳動力および進行波誘電泳動力の両方は、電場分布（例えば、電場成分の大きさ、周波数および位相分布、大きさおよび / または周波数における電場の調節）だけでなく、粒子の誘電特性および粒子が懸濁し、または配置される媒体にも依存する。誘電泳動において、粒子が媒体より強い分極性である場合（例えば、印加された周波数に応じて大きな導電率および / または誘電率を有する）、粒子は正極誘電泳動力を得、強い電場領域に向かって方向付けられる。周囲の媒体より弱い分極性である粒子は負の誘電泳動力を得、弱い電場領域に向かって方向付けられる。進行波誘電泳動において、粒子は、分極因子 ζ_{TWD} に依存して、電場を進行する方向と同じ方向またはそれと反対に促進する誘電泳動力を得ることができる。以下の論文は、誘電泳動および進行波誘電泳動における基本的理論および実施について記載している：Huang ら, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 26: 1528 - 1535 (1993); Wang ら, *Biochim. Biophys. Acta.* 1243: 185 - 194 (1995); Wang ら, *IEEE Trans. Ind. Appl.* 33: 660 - 669 (1997)。

40

【0207】

アクティブチップを備えた濾過チャンバ

濾過チャンバはまた、好ましくは少なくとも 1 つのアクティブチップの少なくとも一部を備え、または係合することができ、アクティブチップは、印加された物理的力を使用し、サンプルの処理または所望の生化学的反応を促進し、強化し、または容易にし、あるいはおよび (or and) 他で生じ得る、またはサンプル内の任意の不必要な影響を低下させ、または減少させるチップである。本発明の濾過チャンバのアクティブチップは好ま

50

しくは、音響要素、電極、またはさらには電磁要素を備える。アクティブチップを使用し、孔もしくはスロットまたは開口部を通過するにはあまりにも大きく、または孔もしくはスロットまたは開口部に凝集するようになるサンプルの成分によるスロットまたはフィルタ（例えば、ブロック、ダム、またはチャンネル、フィルタ基板におよびそれを通してエッチングされたスロット）を作製するために使用される構造の周囲の詰まりを防ぐことができる物理的な力を伝達することができる。例えば、電気信号を印加するとき、音響要素はチャンパ内の成分の混合を生じ、それによりスロットまたは孔から濾過されない成分を取り除くことができる。

【0208】

代替の実施形態において、チップの電極のパターンがサンプル成分の負の誘電泳動をもたらす、スロット、チャンネル、または構造周囲の開口部の周辺から濾過できない成分を移動することができる、スロットまたは開口部に濾過可能なサンプル成分を近づけさせる。「誘電泳動に基づく選択的保持」の異なる動作機構下において、フィルタに作製されたこのような電極アレイの例は、“Novel dielectrophoresis-based device of the selective retention of viable cells in cell culture media”, Docoslisら, Biotechnology and Bioengineering, Vol. 54, No. 3, pages 239 - 250, 1997 (参照により本明細書に組み込まれる), および1997年5月7日、Docoslisらに発行された米国特許第5,626,734号(参照により本明細書に組み込まれる)に記載されている。アクティブチップ、例えば、音響力によりサンプルを混合するために使用することができるチップおよび誘電泳動力によりサンプル成分を含む断片を移動するために使用することができるチップは、「Methods for Manipulating Moieties in Microfluidic Systems」と題した2000年8月10日出願の米国特許出願第09/636,104号、「An Integrated Biochip System for Sample Preparation and Analysis」と題した2000年10月10日出願の米国仮特許出願第60/239,299号、および「Compositions and Methods for Separation of Moieties on Chips」と題した2000年10月10日出願の米国特許出願第09/686,737号に記載され、参照によりこれら全てを本明細書に組み込む。

【0209】

本発明のフィルタの進行波誘電泳動に使用することができる電極ならびに誘電泳動および進行波誘電泳動の原理の組み込みは、本明細書において微細加工されたフィルタのこれまでの記載の中にある。電極も本発明の濾過チャンパに使用されるアクティブチップに組み込まれ、濾過効率を改善することができる。

【0210】

濾過チャンパも電磁要素を備えるチップを備えることができる。このような電磁要素をサンプルを濾過処理する前、または好ましくは後にサンプル成分の捕捉に使用することができる。サンプル成分を磁性ビーズに結合させた後に捕捉することができる。捕捉したサンプル成分は、望ましい成分を含有するサンプルがすでにチャンパから除去された後にチャンパに保持された望ましくない成分であってよく、または捕捉したサンプル成分が、濾過後のチャンパに捕捉された望ましい成分であってよいのいずれかである。

【0211】

音響力チップは濾過チャンパと係合することができ、または濾過チャンパの一部であってよく、あるいは1つまたは複数の音響要素を濾過チャンパの1つまたは複数の壁体に設けることができる。音響力チップの活性化によるサンプルの混合は、濾過手順の間に生じ得る。好ましくは、電源を使用し、電気信号を1つまたは複数の音響チップの音響要素または1つまたは複数の壁体またはチャンパの1つまたは複数の音響要素に伝達する。1つまたは複数の音響要素は濾過手順全体を通して連続して活性であってよく、または濾過手

10

20

30

40

50

順の間に間隔（パルス）毎に活性化され得る。

【0212】

サンプル成分および場合によりサンプルに添加される溶液または試薬を、チャンバ内で液体および断片、例えば限定されないが、分子、複合体、細胞および微粒子の両方に作用する音響力により混合することができる。音響力は音響要素のときに、つまり液体および液体を通して伝達される機械的振動を生じる電気信号によりエネルギーを加えられるときに生じる流体の音響流により混合を生じ得る。さらに、音響エネルギーはサンプル成分（断片）または試薬自体の音響放射力を生じる音波を生じることによりサンプル成分および/または試薬の移動を生じ得る。

【0213】

以下の議論および参照により、混合機能を得るための音響要素の設計および使用のための骨組みを提供することができる。

【0214】

音響力は、音場により断片、例えば、粒子および/または分子に生じる力を指す。（音響放射力とも呼ばれ得る）。音響力を液体中の粒子を操作、例えば、捕集、移動、方向付け、取り扱い、混合するために使用することができる。粒子操作のための定在超音波の音響力を使用して、赤血球の濃縮（Yasudaら, J. Acoust. Soc. Am., 102(1): 642-645 (1997)）、ミクロンサイズのポリスチレンビーズの集束（0.3~10ミクロン径、Yasuda and Kamakura, Appl. Phys. Lett., 71(13): 1771-1773 (1997)）、DNA分子の濃縮（Yasudaら, J. Acoust. Soc. Am., 99(2): 1248-1251, (1996)）、細胞のバッチ式および半連続式凝集および沈降（Puiら, Biotechnol. Prog., 11: 146-152 (1995)）が実証されている。静電および音響放射力を競合させることによる、様々なサイズ及び電荷のポリスチレンビーズの分離が報告されている（Yasudaら, J. Acoust. Soc. Am., 99(4): 1965-1970 (1996)；およびYasudaら, Jpn. J. Appl. Phys., 35(1): 3295-3299 (1996)）。さらに、音響放射力を使用して哺乳類動物細胞を操作したときに、イオン漏出（赤血球において、Yasudaら, J. Acoust. Soc. Am., 102(1): 642-645 (1997)）または抗体産生（ハイブリドーマ細胞において、Puiら, Biotechnol. Prog., 11: 146-152 (1995)）の用語で特徴づけられる損傷または有害な影響はほとんどもしくは全く認められなかった。

【0215】

音波は音響変換器、例えば、PZT材料などの圧電セラミックにより確立することができる。圧電変換器は、加えられた機械的な力により生じた形状変化にさらされたときに電場を生じる（圧電効果または生成器効果）「圧電材料」から作製される。反対に、印加された電場が材料に機械的応力（電歪効果またはモーター効果）を生じる。これらの変換器が機械から電気およびその逆にエネルギーを変換する。AC電圧を圧電変換器に印加するときに、振動が変換器に生じ、このような振動が圧電変換器を備えるチャンバに入れた液体に連結させることができる。

【0216】

音響チップは音響変換器を備えることができ、そして適切な周波数のAC信号が音響変換器の電極に印加されると、交流の機械的応力を圧電材料内に生じ、チャンバの液体溶液に伝達される。チャンバが、定在音波を波動伝搬および波反射の方向（例えば、z軸）に沿って確立するように設定される状況において、液体中のz軸に沿って空間的に変化する定在波を以下のように表すことができる：

【数9】

$$\Delta p(z) = p_0 \sin(kz) \cos(\omega t)$$

式中、 p は z の音圧であり、 p_0 は音圧の大きさであり、 k は波数（ $2\pi/\lambda$ ）、 ω は波

10

20

30

40

50

長である)、 z は圧ノードからの距離であり、 k は角周波数であり、 t は時間である。一実施例において、定在波音場は、チャンバの主要な表面を形成する音響変換器から生じる音波と、音響変換器と並行に位置づけられ、変換器からの音波を反射するチャンバのもう一つの主要な表面からの反射波を重ねることにより生じ得る。YosiookaとKawasimaによって開発された理論 (Acoustic Radiation Pressure on a Compressible Sphere, Yosiooka K. and Kawasima Y., *Acustica, Volume 5, pages 167 - 173, 1955*) に従い、固定定在波場の球体粒子に作用する音響力 $F_{acoustic}$ は、以下の式により表わされ、

【数 10】

$$F_{acoustic} = -\frac{4\pi}{3} r^3 k E_{acoustic} A \sin(2kz)$$

式中、 r は粒子径であり、 $E_{acoustic}$ は平均音響エネルギー密度であり、 A は以下の式で表わされる定数であり、

【数 11】

$$A = \frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p + \rho_m} \frac{\gamma_p}{\gamma_m}$$

式中、 ρ_m および ρ_p は粒子および媒体の密度であり、 γ_m および γ_p はそれぞれ粒子および媒体の圧縮率である。材料の圧縮率は材料の密度と材料の音波の速度の積である。圧縮率は音響インピーダンスと呼ばれることもある。 A は音響分極因子と呼ばれる。

【0217】

$A > 0$ のとき、粒子は定在波の圧ノード ($z = 0$) に向かって移動する。

【0218】

$A < 0$ のとき、粒子は圧ノードから遠ざかるように移動する。

【0219】

粒子に作用する音響放射力は音響エネルギー密度分布および粒子密度ならびに圧縮率に依存する。様々な密度および圧縮率を有する粒子は、同じ定在音場に置かれたときに様々な音響放射力を得る。例えば、10ミクロン径の粒子に作用する音響放射力は、確立した音響エネルギー密度分布に応じて、およそ $< 0.01 \sim > 1000 \text{ pN}$ と変化し得る。

【0220】

上記の分析は、定在音波の粒子に作用する音響放射力を考慮する。さらなる分析は進行波の場合の粒子に作用する音響放射力の場合に拡大され得る。一般に、音場は定在および進行波成分の両方からなり得る。このような場合、チャンバの粒子は上記の式により記載されるもの以外の形態の音響放射力を得る。以下の論文は進行音波および定在音波による球体粒子の音響放射力の詳細な分析について記載している: Yosiookaら., *Acoustic Radiation Pressure on a Compressible Sphere. Acustica (1955) 5: 167 - 173; and Hasegawa, Acoustic-Radiation force on a solid elastic sphere. J. Acoust. Soc. Am. (1969) 46: 1139.*

【0221】

粒子の音響放射力も種々の特別な場合の音波により生じ得る。例えば、音響力は集束された光線 ("Acoustic radiation force on a small compressible sphere in a focused beam", Wu and Du, *J. Acoust. Soc. Am.*, 87: 997 - 1003 (1990)) により、または音響ピンセット ("Acoustic tweezers", Wu *J. Acoust. Soc. Am.*, 89: 2140 - 2143 (1991)) により生じ得る。

10

20

30

40

50

【0222】

液体に確立された音場も音響流と呼ばれる時間非依存性流体流動を誘導することができる。このような流体流動もバイオチップ用途または液体を運搬またはポンプで送るための微小流体用途に利用することができる。さらに、このような音波流体流動を液体中の分子または粒子を操作するために使用することができる。音響流は、音場分布および液体特性に依存する(“Nonlinear phenomena”, Rooney J. A. “Methods of Experimental Physics: Ultrasonics”, Editor: P. D. Edmonds”, Chapter 6.4, pages 319 - 327, Academic Press, 1981; “Acoustic Streaming”, Nyborg W. L. M. “Physical Acoustics, Vol. II - Part B, Properties of Polymers and Nonlinear Acoustics”, Chapter 11, pages 265 - 330, 1965)。

10

【0223】

したがって、1つまたは複数のアクティブチップ、例えば、1つまたは複数の音響力チップも、サンプルの添加および濾過プロセス時、またはその前後にて、濾過チャンバに添加することができる試薬、溶液、または緩衝液の混合を促進するために使用することができる。例えば、試薬、例えば限定されないが、望ましくないサンプル成分の除去に、または望ましいサンプル成分の捕捉に役立つ特異的結合メンバーを、濾過プロセスが完了し、導管を閉じた後に濾過チャンバに添加することができる。アクティブチップの音響要素を使用して、1種または複数種の特異的結合メンバーと、容量が濾過により減少したサンプルの混合を促進することができる。一例はサンプル成分と、サンプル内の特定の細胞型(例えば、白血球細胞、または胎児有核赤血球細胞)を結合することができる抗体を含む磁性ビーズの混合である。磁性ビーズを使用し、望ましくない、または望ましいサンプル成分をそれぞれ、本発明の方法の続く工程で選択的に除去または分離(捕捉)することができる。音響要素を連続混合期間またはパルスにおいて活性化することができる。

20

【0224】

微細加工されたフィルタ

一態様において、本発明は、少なくとも1つのテーパ状の孔を備える微細加工されたフィルタを備え、この場合、孔はフィルタの開口部となる。孔は任意の形状および任意の寸法のものであってよい。例えば、孔は四角形、矩形、楕円形または円形の形状または他の任意の形状のものであってよい。孔は、濾過処理用途に応じて約0.1ミクロン~約1000ミクロン、好ましくは約20~約200ミクロンの径(または最大幅の径)を有し得る。好ましくは、孔はフィルタの機械加工中に形成され、硬質の液体不透過性材料、例えば、ガラス、ケイ素、セラミック、金属、または硬質プラスチック、例えば、アクリル、ポリカーボネートまたはポリイミドを含むフィルタ材料にマイクロエッチングまたは穿孔する。硬質の固体支持体に支持されたフィルタ用の比較的硬質でない表面を使用することも可能である。本発明の別の態様は、材料を修飾することである(例えば限定されないが、材料のケイ素酸化物またはケイ素窒化物への化学修飾または熱修飾)。しかし、好ましくはフィルタはフィルタを通して流体流動の生成に使用される、圧(例えば、吸気圧)により変形されない硬質材料を含む。

30

40

【0225】

スロットは幅よりも長さが大きい孔であり、この場合、「長さ」および「幅」はフィルタの平面の開口部の寸法である。(スロットの「深さ」はフィルタの厚さに対応する)。すなわち、「スロット」はほとんど場合がおおよそ矩形または楕円形であるが、四角形または平行四辺形に近い開口部の形状を説明する。スロット幅がサンプル成分がフィルタを流れ、またはフィルタに保持されるかのいずれかを決定する重要な寸法である本発明の好ましい実施形態において、スロットの形状は末端で変化することができる(例えば、規則的または不規則な形状、曲線または角度)が、好ましくはスロットの長い側が、スロットの長さの大部分において互いに一貫した距離となり、この距離がスロット幅となる。した

50

がって、スロットの長い側がスロットの長さの大部分において平行または非常に平行に近くなる。

【0226】

好ましくは、本発明の濾過に使用されるフィルタは、フィルタ内の孔またはスロットが正確なかつ均一な寸法を得ることができるよう微細加工された、または微細機械加工されたフィルタである。ナイロン、ポリカーボネート、ポリエステル、混合セルロースエステル、ポリテトラフルオロエチレン、ポリエーテルスルホンなどの材料からなる従来の膜フィルタと比べ、このような正確なかつ均一な孔またはスロット寸法が本発明の微細加工された、または微細機械加工されたフィルタの明らか利点である。本発明のフィルタにおいて、個々の孔は単離され、同様なまたはほぼ同一の特徴的なサイズを有し、フィルタ上にパターン化される。このようなフィルタはサイズおよび他の特性に基づき粒子の正確な分離を可能にする。

10

【0227】

フィルタの濾過面積は孔を備える基板の領域により決定される。本発明の微細加工されたフィルタの濾過面積は、約 0.01 mm^2 ～約 0.1 m^2 であり得る。好ましくは、濾過面積は約 0.25 mm^2 ～約 25 cm^2 であり、より好ましくは約 0.5 mm^2 ～約 10 cm^2 である。大きな濾過面積により、本発明のフィルタは、約10マイクロリットル～約10リットルのサンプル容量を処理することが可能となる。孔で取り囲まれた濾過面積の割合は、約1%～約70%であってよく、好ましくは約10%～約50%であり、より好ましくは約15%～約40%である。本発明の微細加工されたフィルタの濾過面積は、任意の数の孔を備えることができ、好ましくは少なくとも2つの孔を備えるが、より好ましくは、本発明のフィルタの濾過面積の孔の数は約4～約1,000,000の範囲であり、さらにより好ましくは約100～約250,000の範囲である。濾過面積のフィルタの厚さは、約10～約500ミクロンの範囲であるが、好ましくは約40～約100ミクロンの範囲である。

20

【0228】

本発明の微細加工されたフィルタはフィルタ基板自体を通してエッチングされるスロットまたは孔を有する。フィルタの孔または開口部は微細加工または微細機械加工の技法と使用することにより、基板材料、例えば限定されないが、ケイ素、二酸化ケイ素、セラミック、ガラス、ポリマー、例えば、ポリイミド、ポリアミドなどに作製することができる。マイクロリソグラフィーおよび微細加工（例えば、Rai-Choudhury P. (Editor), Handbook of Microlithography, Micromachining and Microfabrication, Volume 2: Micromachining and microfabrication. SPIE Optical Engineering Press, Bellingham, Washington, USA (1997)を参照のこと)の当業者に公知のように、種々の作製方法を使用することができる。多くの場合、標準的な微細加工および微細機械加工の方法およびプロトコルを含むことができる。適切な作製方法の一例は1つまたは多数のフォトマスクを含むフォトリソグラフィーである。微細加工のプロトコルは多くの基本的な工程、例えば、フォトリソグラフィマスク生成、フォトレジストの蒸着、「犠牲」材料層の蒸着、マスクおよび現像液を用いたフォトレジストパターンニング、または「犠牲」材料層パターンニングを含み得る。孔は、特定のマスクングプロセス下において基板にエッチングすることにより作製することができ、そうして、マスクされている領域はエッチング除去せず、マスク保護されていない領域をエッチングで除去する。エッチング法は深掘RIE（反応性イオンエッチング）、レーザーアブレーションなどの乾式エッチングであってよく、または湿潤化学物質の使用を含む湿式エッチングであってよい。材料はポジティブ法で成長させることができ、それにより基板材料が蒸着（deposition）し、もしくはその周囲で成長したときにスロットまたは孔が出現し、あるいは材料を、マスクングレジストを除去したときに孔またはスロットが生成されるマスクングレジストの周囲に成長させることができる。

30

40

50

【0229】

好ましくは、適切な微細加工または微細機械加工の技法を選択し、フィルタ孔の所望のアスペクト比を得る。アスペクト比はスロット深さ（孔の領域のフィルタの厚さに対応）とスロット幅またはスロット長の比を指す。大きいアスペクト比（すなわち、スロット深さが大きい）のフィルタスロットの作製は、深掘エッチング法を含み得る。MEMS（微小電気機械システム）デバイスの作製に有用な多くの作製方法、例えば、深掘RIEを微細加工されたフィルタの作製に使用または利用することができる。得られた孔は高いアスペクト比およびエッチング法の結果として、開口部がフィルタの一方から他方に狭くなるように、わずかなテーパ状を有する。例えば、図4において、フィルタ基板を通して真っすぐに穿孔された仮定の孔の角 γ は90度であり、本発明の微細加工されたフィルタのテーパ状の孔が垂直とは異なるテーパ状角 α は、フィルタの厚さ（孔の深さ）に応じて、約0度から約90度および好ましくは0.1度～45度ならびに最も好ましくは約0.5度～10度になる。

10

【0230】

本発明は2つ以上のテーパ状の孔を備える微細加工されたフィルタを備える。フィルタの孔、スロットまたは開口部が作製または機械加工される基板はケイ素、二酸化ケイ素、プラスチック、ガラス、セラミックまたは他の固体材料であってよい。固体材料は多孔性または非多孔性であってよい。微細加工および微細機械加工の作製の当業者であれば、特定のフィルタ形状の作製に使用される作製プロトコールおよび材料を容易に選択し、決定することができる。

20

【0231】

微細加工または微細機械加工の方法を使用して、フィルタのスロット、孔または開口部を正確な形状で作製することができる。使用する作製方法または材料に応じて、フィルタのスロットの単一の寸法（例えば、スロット長、スロット幅）の精度は20%以内、もしくは10%未満、または5%未満であってよい。したがって、本発明のフィルタのフィルタの孔の重要な単一の寸法（例えば、長方形または四角形のスロットにおけるスロット幅）の精度は好ましくは2ミクロン未満、より好ましくは1ミクロン未満、またはさらにより好ましくは0.5ミクロン未満の範囲でなされる。

【0232】

好ましくは、本発明のフィルタをトラックエッチング法を使用して作製することができる。フィルタはガラス、ケイ素、二酸化ケイ素、またはポリカーボネートもしくはポリエステルなどのポリマーからなり、比較的均一な孔のサイズを有する個別の孔が作製される。例えば、フィルタは、Nucleopore Track-etch膜において報告されたトラックエッチング法をフィルタ基板に採用し、適用することにより作製される。膜フィルタを作製するために使用される技法において、ポリマー薄膜をエネルギー重イオンで飛跡し、フィルムに潜在飛跡を生じさせる。次いでフィルムをエッチングし、孔を生成する。

30

【0233】

本発明の細胞分離の方法およびシステムに好ましいフィルタは、フィルタ上の開口部が正確な形状で作製され得る微細加工または微細機械加工されたフィルタを含む。個々の開口部を同様のまたはほぼ同一の特徴のサイズで単離し、フィルタにパターン化する。開口部は、例えば、円形、四角形、または楕円形などの様々な形状のものであってよい。このようなフィルタは、サイズおよび他の特性に基づき正確な粒子の分離を可能とする。

40

【0234】

微細加工されたフィルタの好ましい実施形態において、個々の孔は単離された、円筒形状のものであり、孔のサイズは20%以内のばらつきであり、孔のサイズを孔の最小および最大寸法（それぞれ、幅および長さ）により算出する。

【0235】

II. 微細濾過を使用した流体サンプルの標的成分の分離方法

別の態様において、本発明は、筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える本発明

50

の濾過チャンバを通した濾過を使用して流体サンプルの標的成分を分離する方法を提供する。濾過チャンバは前方チャンバと濾過後サブチャンバにおいて実質的に逆平行の流動を可能にするよう構成されることができる。フィルタの表面および/または筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成することができる。いくつかの実施形態において、フィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する。本方法は、筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備え、または係合する濾過チャンバにサンプルを分注すること、流体サンプルの標的成分が1つまたは複数の微細加工されたフィルタを通して流れ、または保持されるように、濾過チャンバを通してサンプルの流体流動をもたらすことを含む。成分の分離は成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基つきなされ得る。

10

【0236】

いくつかの実施形態において、本方法はさらに、物理的な力を用いて流体サンプルを操作することを含み、上記の操作をフィルタの外部にある構造および/またはフィルタに組み込まれた構造を通して行う。いくつかの実施形態において、本方法はさらに、上記の濾過チャンバから標的成分、例えば、有核細胞または希少細胞を収集することを含み得る。いくつかの実施形態において、濾過は、細胞を濃縮するために、サンプル中にある有核細胞または希少細胞の少なくとも一部分からサンプルの可溶性および小さい成分を分離し、さらなる分離および分析を容易にすることができる。いくつかの態様において、濾過はサンプルから望ましくない成分、例えば限定されないが、望ましくない細胞型を除去することができる。濾過によりサンプル容量の少なくとも50%を減少させ、または50%より大きいサンプルの細胞成分を除去する場合、濾過を分解工程とみなすことができる。本発明は流体サンプルの処理における分解ならびに他の機能、例えば、サンプル成分の濃縮またはサンプル成分の分離など(例えば、望ましくないサンプル成分の除去および望ましいサンプル成分の保持を含む)のための濾過の使用を検討する。

20

【0237】

当技術分野において公知の、および2007年7月13日出願の米国特許出願第11/777,962号、2006年8月2日出願の米国特許出願第11/497,919号、2004年9月15日出願の米国特許出願第11/264,413号、2003年11月4日出願の米国特許出願第10/701,684号、2002年10月10日出願の米国特許出願第10/268,312号に開示され、血液サンプルから血液サンプルの調製および希少細胞の単離の全ての開示を参照により本明細書に組み込まれた、流体サンプルの調製および希少細胞の富化方法を本明細書に開示の方法および設計と組み合わせることができる。

30

【0238】

サンプル

サンプルは環境サンプルなどの任意の流体サンプル、例えば、空気のサンプル、水のサンプル、食物のサンプル、および生物学的サンプル、例えば、懸濁液、抽出液または環境または生物学的サンプルの浸出液であってよい。生物学的サンプルは、血液、骨髓サンプル、任意の種類、滲出液、腹水、骨盤洗浄液、または胸膜液、髄液、リンパ液、血清、粘液、痰、唾液、尿、精液、眼液、鼻腔の抽出液、咽頭もしくは生殖器スワブ、消化組織からの細胞懸濁液、または糞便材料の抽出液であってよい。生物学的サンプルはまた、器官または組織のサンプル、例えば、腫瘍、例えば、器官または組織の癌流からの細針吸引物またはサンプルであってよい。生物学的サンプルは細胞培養物のサンプル、例えば、初代培養物および細胞株の両方であってもよい。サンプルの容量は非常に小さく、例えば、マイクロリットルの範囲であってよく、さらに希釈を必要とし、またはサンプルが非常に大きく、例えば、最大約2リットルの腹水であってよい。好ましいサンプルは血液サンプルである。

40

【0239】

血液サンプルは、対象から最近採取された、保存していたものから採取された、衣類、

50

布地、道具などの対象の外部の供給源から取り出された任意の血液サンプルであってよい。それゆえ、血液サンプルは、例えば、血液を含有する物質を緩衝液または溶液に浸漬することにより得られる抽出物であってよい。血液サンプルは、未処理または透析した、試薬を添加したなどの部分的に処理された血液サンプルであってよい。血液サンプルは任意の容量のものであってよい。例えば、血液サンプルは、用途に応じて5マイクロリットル未満、または5リットル超であってよい。しかし、好ましくは、本発明の方法を使用して処理される血液サンプルは約10マイクロリットル～約2リットル容量、より好ましくは約1ミリリットル～約250ミリリットル容量、および最も好ましくは約5～50ミリリットル容量である。

【0240】

サンプルから富化される希少細胞は、流体サンプルの1ミリリットル当たり100万個未満の細胞が存在する任意の細胞型のもの、または流体サンプルの総有核細胞集団の1%未満を構成する任意の細胞型のものであってよい。希少細胞は、例えば、細菌細胞、真菌細胞、寄生生物細胞、寄生生物、細菌またはウイルスに感染した細胞、または限定されないが線維芽細胞または血液細胞などの真核細胞であってよい。希少血液細胞は、RBC（例えば、サンプルが1ミリリットル当たり100万個未満の赤血球細胞を含有する抽出物または浸出液である場合）、WBCまたはWBCの亜型（例えば、T細胞またはマクロファージ）などの血液細胞および血液細胞型の亜集団、有核赤血球細胞であってよく、または胎児細胞（限定されないが、有核赤血球細胞、トロホプラスト、顆粒球、または単球）であってよい。希少細胞は任意の種類の前駆細胞または前駆細胞であってよい。希少細胞はまた、限定されないが新生物細胞、悪性細胞および転移細胞を含むがん細胞であってよい。血液サンプルの希少細胞はまた、限定されないが上皮細胞などの非造血細胞であってよい。

【0241】

胎児細胞単離のための母体血サンプル選択

本発明は、特定の胎児細胞型の単離のための特定の妊娠期の血液サンプルの選択を含む血液サンプルからの希少細胞単離のための方法を含む。

【0242】

本発明の好ましい一実施形態において、胎児有核細胞の単離のための母体血サンプルを約4週から約37週、好ましくは約7週～約24週、およびより好ましくは約10週～約20週の妊娠期から選択する。この実施形態において、胎児有核細胞の単離のための母体血サンプルを約4週～約37週、好ましくは約7週から約24週、およびより好ましくは約10週～約20週の妊娠期の妊娠対象から採血する。本明細書において使用される場合、妊娠対象は血液サンプル採取の24時間以内に流産した所与の妊娠期の女性を含み得る。

【0243】

母体血サンプルからの胎児細胞単離のための第2の洗浄上清の使用

本発明はまた、分解または分離工程の前の細胞を洗浄するために、血液サンプルに行われる第2の遠心分離の上清を胎児細胞が単離されるサンプルの少なくとも一部として使用する、母体血サンプルから胎児細胞を単離するための方法を含む。

【0244】

濾過チャンバへのサンプルの分注

サンプルを任意の簡便な手段により本発明の濾過チャンバに分注することができる。非限定的な例として、サンプルは、チャンバにサンプルをポンプで送り、または注入する導管（例えば、チューブ）を使用して導入することができ、または直接注ぎ入れ、注入し、もしくは分注し、または重力による供給または機械により手動でピペット操作することができる。本発明の濾過チャンバへのサンプルの分注は、濾過チャンバに直接もしくは間接的に供給する充填リザーバーを介して濾過チャンバに直接であってよく、または濾過チャンバにつながる導管にであってよく、あるいは1つまたは複数の導管を介して濾過チャンバにつながる容器にであってよい。チューブまたはチャンバと液体連通する針（または任

10

20

30

40

50

意の液体採取デバイス)を使用し、チューブを挿入することができる。針は溶液を含有するチューブから細胞を収集し、溶液を押し出し、または吸引するデバイス(例えば、ポンプまたはシリンジ)を使用して別のチャンバに溶液を分注することができる。

【0245】

濾過処理

本発明の濾過チャンバに添加後に、濾過処理をチャンバを通して流体流動をもたらすことにより行う。任意の手段、例えば、陽圧または陰圧(例えば、手動により、または機械により操作されるシリンジ型システム)、ポンプ送達またはさらに重力によって流体流動をもたらすことができる。濾過チャンバは緩衝液または溶液および流体サンプルまたはその成分が流れることができる導管に接続されるポートを有することができる。濾過ユニットもチャンバを通して流体流動を制御することができる弁を有することができる。サンプルを濾過チャンバに添加し、流体流動をチャンバを通して方向付けするときに、フィルタスロットが液体、サンプルの可溶成分および流体サンプルの濾過可能な不溶性成分をフィルタを通して通過させることができるが、スロット寸法により流体サンプルの他の成分がフィルタを通して通過することを防ぐことができる。

10

【0246】

いくつかの実施形態において、前方チャンバおよび濾過後サブチャンバの流体流動は実質的に逆平行である。濾過チャンバの流入および/または流出ポートを通る自動手段により流動が生じ得る。さらなる流入ポートを設けた実施形態において、実質的に逆平行の流動に垂直な溶液の流体流動を導入することができる。例えば、上方チャンバおよび前方チャンバに前方チャンバを分割する上方フィルタを含む場合、前方チャンバをフィルタ(各フィルタ)を横切る流体流動に使用し、フィルタ(各フィルタ)を横切る流体サンプルの成分を押し出すことができる。

20

【0247】

好ましくは、本発明の濾過チャンバを通る流体流動を自動化し、ポンプまたは陽圧もしくは陰圧システムにより生じさせるが、これは本発明の必須要件ではない。最適な流速は濾過されるサンプル、例えば、サンプル中の濾過可能な、および濾過不可能な成分の濃度およびフィルタに凝集し、詰まらせる性質に依存する。例えば、濾過チャンバを通る流速は1時間当たり1ミリリットル未満~1時間当たり1000ミリリットル超であってよく、流速は本発明の実施において決して限定されない。しかし、好ましくは血液サンプルの濾過は、1時間当たり5~500ミリリットルの量で生じ、より好ましくは1時間当たり約5~約40ミリリットルの量で生じる。

30

【0248】

血液(全血または希釈された全血のいずれか)は、送達機構、すなわち流入ポートに密閉され、ポンプもしくは重力により、または任意の流動生成方法により駆動されることができるピペット、を係合することにより前方チャンバに導入され、フィルタの前方チャンバを通して連続して公知の血液量を送達し、前方チャンバの流出ポートから分解した血液を収集することができる。別法として、固定量の血液または血液混合物を流入ポートの一部であるリザーバーに送達することができ、流動機構が前方チャンバの流出ポートと係合し、所望の容量を収集するまで、前方チャンバを通して連続して上記のサンプルを採取する。

40

【0249】

頂部チャンバを血液が通過する間、底部チャンバは流入および流出ポートを有し、その両方を、頂部チャンバの一部の含有量がフィルタを通り、そして濾過後サブチャンバにゆっくり採取されるように、流出速度が流入速度より大きくなるポンプに接続する。濾過後サブチャンバを通る流動が、図33に示すように、フィルタを横切る粒子が多く含有されることのない血液の領域にフィルタを通して拡散して戻らないように、好ましくは頂部チャンバの流動に対向方向または逆平行の流動になる。そうすると、血液は小さい粒子、すなわち血小板および/または赤血球細胞および好ましくはその両方が取り除かれる。

【0250】

50

フィルタ材料の横断を場合により、2つ以上の電極を各ポートのいずれかに導入することにより静電流、電磁流、電気泳動流、または電気浸透流により、または対面するチャンバの天井および床を形成し得る自動濾過ユニットに一体化された電極に接続することにより補助することができる。場合により、サイズによる粒子の分離を、ポンプを振動させることにより生じる振動流により、またはフィルタを横切る流動に対して音響力を導入することにより補助することができる。この音響力は、流体に沿って、または廃棄チャンバ（濾過後サブチャンバ）に埋め込まれたスピーカーまたは圧電デバイスにより生じるあらゆるところの、または濾過後サブチャンバの流体に沿ってあらゆるところの衝撃からの圧力波であり得る。

【0251】

いくつかの実施形態において、デバイスを上下逆に配向して、または不必要な粒子を除去する底部チャンバが側部チャンバまたは頂部チャンバで実際に機能し得るようにその側部で操作することができる。

【0252】

フィルタ基板を通してフィルタのスロットを作製するとき、スロットの深さ方向に沿ってわずかにスロットをテーパ状にすることができる。したがって、具体的なスロット幅は、フィルタの全体の深さを通して一定に維持されることはなく、典型的に、フィルタの表面のスロット幅は対面する表面の幅より大きい。このようなテーパ状のスロット幅を有するフィルタを利用するとき、サンプルと対面するフィルタの狭小のスロット面を有し、そうして濾過処理する間、サンプルがまずスロットの狭小幅の面を通過した後に、濾過された細胞はスロットの幅広の面で排出されることが好ましい。これにより、じょうご型のスロット内で濾過される細胞を捕集することが避けられる。しかし、1つまたは複数のテーパ状のスロットを有するフィルタの配向は、本発明のフィルタを使用するときには制限されない。特定の用途に応じて、フィルタのスロットの幅広の面がサンプルに対面するような配向でフィルタを使用することもできる。

【0253】

本発明の方法において、好ましくは望ましい成分、例えば、富化が望ましい希少細胞をフィルタに保持する。好ましくは本発明の方法において、サンプルの目的の希少細胞がフィルタに保持され、サンプルの1種または複数種の望ましくない成分がフィルタを流れて、それによりサンプルのフィルタに保持された部分の希少細胞の総細胞に対する割合が増大することによりサンプルの目的の希少細胞を富化させるが、これは本発明の必須要件ではない。例えば、本発明のいくつかの実施形態において、濾過はサンプルの容量を減少させ、それにより希少細胞を濃縮することにより流体サンプルの希少細胞を富化することができる。

【0254】

望ましくない成分を除去するための特異的結合メンバー

本発明の沈降する溶液の成分に加え、本発明の混合溶液は血液サンプルの望ましくない成分（例えば限定されないが、白血球細胞、血小板、血清タンパク質）に選択的に結合することができる。望ましい成分にあまり結合しない少なくとも1種の特異的結合メンバーを含むことができる。血液サンプルの非RBCの望ましくない成分と選択的に結合することができる1種または複数種の特異的結合メンバーを使用し、サンプルの望ましくない成分を除去することができる。サンプルの希少細胞の相対的割合を増大させ、そうしてサンプルの希少細胞の富化に寄与することができる。「選択的に結合する」とは、1種または複数種の望ましくないサンプル成分を除去するために本発明の方法において使用される特異的結合メンバーが流体サンプルの目的の希少細胞に明らかに結合しないことを意味する。「明らかに結合しない」とは、目的の1種または複数種の細胞の30%以下、好ましくは20%以下、より好ましくは10%以下およびさらにより好ましくは1.0%以下と流体サンプルから非RBCの望ましくない成分を除去するために使用される特異的結合メンバーが結合することを意味する。多くの場合、血液サンプルの望ましくない成分は白血球細胞である。本発明の好ましい実施形態において、本発明の混合溶液を赤血球細胞を沈降させ

10

20

30

40

50

、そして血液サンプルから白血球細胞を選択的に除去するために使用することができる。

【0255】

白血球細胞と特異的に結合することができる特異的結合メンバーは、非限定的な例として、抗体、受容体のリガンド、輸送体、白血球細胞の表面のチャンネルまたは他の断片、または白血球細胞の表面で特定の炭水化物断片と特異的に結合することができるレクチンまたは他のタンパク質（例えば、セレクチン）であってよい。

【0256】

好ましくは、白血球細胞と選択的に結合する特異的結合メンバーは白血球細胞と結合するが有核細胞と明らかに結合しない抗体、例えば、CD3、CD11b、CD14、CD17、CD31、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102、またはCD166に対する抗体などである。抗体は例えば、Dako, BD Pharmingen, Antigenix America, Neomarkers, Leinco Technologies, Research & Diagnostic Systems, Serotec, United States Biological, Bender Medsystems Diagnostics, Ancell, Leinco Technologies, Cortex Biochem, CalTag, Biodesign, Biomeda, Accurate Chemicals & ScientificおよびChemicon Internationalの供給業者などから市販され購入することができる。抗体の、白血球細胞と結合し、効率的に除去し (bind an efficiently remove white blood cells)、サンプルから目的の希少細胞の富化させる能力を、当技術分野において周知の捕捉アッセイを使用して試験することができる。

10

20

【0257】

本発明の1種または複数種の望ましくない成分に選択的に結合する特異的結合メンバーを使用し、望ましくない成分を結合する領域または容器から流体サンプルの1種または複数種の望ましい成分を除去することができるように、1種または複数種の非RBCの望ましくない成分を捕捉することができる。このように、望ましくない成分を、分離される希少細胞を含むサンプルの他の成分から分離することができる。捕捉は、望ましくない成分または各成分を認識する特異的結合メンバーを固体支持体に付着させることにより、または望ましくない成分または各成分と結合する特異的結合メンバーを認識する第2の特異的結合メンバーを固体支持体に結合させることにより行うことができ (affected)、それにより望ましくない成分が個体支持体に付着される。本発明の好ましい実施形態において、本発明の混合溶液に得られた望ましくないサンプル成分を選択的に結合する特異的結合メンバーを、微粒子などの固体支持体に連結させるが、これは本発明の必須要件ではない。

30

【0258】

磁性ビーズは、望ましくないサンプル成分と選択的に結合する特異的結合メンバーを連結することができる本発明の方法で使用するための好ましい固体支持体である。磁性ビーズは当技術分野において公知であり、市販されている。抗体およびレクチンなどのタンパク質を含む分子を磁性ビーズなどの微粒子に連結する方法は、当技術分野において公知である。本発明の好ましい磁性ビーズは0.02~20ミクロン径、好ましくは0.05~10ミクロン径、およびより好ましくは0.05~5ミクロン径、さらにより好ましくは0.05~3ミクロン径であり、好ましくは本発明の混合溶液中に、第1の特異的結合メンバー、例えば、サンプルから除去される細胞と結合することができる抗体、または第2の特異的結合メンバー、例えば、望ましくないサンプル成分と結合する第1の特異的結合メンバー（例えば、ビオチン化された第1の特異的結合メンバー）と結合することができるストレプトアビジンで被覆されて得られる。

40

【0259】

本発明の好ましい実施形態において、流体サンプルは母体血サンプルであり、分離が望ましい希少細胞は胎児細胞であり、サンプルから除去されるサンプルの望ましくない成分

50

は白血球細胞である。これらの実施形態において、白血球細胞と選択的に結合する特異的結合メンバーを使用して、磁気捕捉によりサンプルから白血球細胞を除去する。好ましくは、得られた特異的結合メンバーを、直接の捕捉のために磁性ビーズに付着させ、またはストレプトアビジン被覆磁性ビーズにより白血球細胞の間接的な捕捉のためにビオチン化形態で提供する。

【0260】

本発明の血液サンプルの希少細胞を富化させるための混合溶液も他の成分、例えば限定されないが塩、緩衝剤、特定の浸透圧を維持する物質、キレート化剤、タンパク質、脂質、小分子、抗凝集剤などを含むことができる。例えば、本発明のいくつかの好ましい態様において、混合溶液は生理学的塩溶液、例えば、PBS、カルシウムおよびマグネシウムを含まないPBSまたはハックス平衡食塩溶液を含む。本発明のいくつかの好ましい態様において、EDTAまたはヘパリンは赤血球細胞の詰まりを防ぐために含まれる。

10

【0261】

本発明はまた、血小板または血小板に関連する分子と特異的に結合することができる抗体または分子の使用を含む。非限定的な例として、本発明の抗体または分子は、CD31、CD36、CD41、CD42(a、b、c)、CD51またはCD51/61に特異的に結合し得る。CD31は胎児細胞に最小限に結合する内皮のおよび血小板細胞マーカーである。血小板を血液サンプルから分離するときの使用は実施例に記載される。

【0262】

サンプル成分の捕捉のための改良された磁性構成

20

分解されたサンプル、例えば、分解された血液サンプルを1種または複数種の特異的結合メンバー、例えば限定されないが流体サンプルの1種または複数種の望ましくない成分を特異的に認識する抗体とインキュベーションすることができる。濾過チャンバをサンプルの分解に使用した場合、1種または複数種の特異的結合メンバーとサンプルの混合およびインキュベーションを場合により濾過チャンバで行うことができる。1種または複数種の望ましくない成分を特異的結合メンバーへの結合を介して直接または間接的のいずれかで捕捉することができる。例えば、特異的結合メンバーを固体支持体、例えば、ビーズ、膜、またはカラムマトリクスに結合することができ、流体サンプルと特異的結合メンバーをインキュベーション後、未結合の成分を含有する流体サンプルを固体支持体から除去することができる。別法として、1種または複数種の第1の特異的結合メンバーを流体サンプルとインキュベーションすることができ、好ましくは、未結合の特異的結合メンバーを除去するために洗浄後、流体サンプルを、固体支持体と結合することができ、または固体支持体に結合される第2の特異的結合メンバーと接触させることができる。このように、サンプルの1種または複数種の望ましくない成分を固体支持体に結合させることができ、流体サンプルから望ましくない成分の分離を可能にする。

30

【0263】

本発明の好ましい態様において、妊娠個体由来の分解した血液サンプルを、白血球細胞と特異的に結合する抗体で被覆されるが、胎児有核細胞と明らかに結合しない磁性ビーズとインキュベーションする。磁性ビーズを活性化電磁自動濾過ユニット(例えば、電磁チップ)による捕捉、または流体サンプルを含有するチューブまたはカラムなどの容器に物理的に近い少なくとも1種の永久磁石による捕捉を使用して収集する。磁石による磁性ビーズの捕捉後、残存する流体サンプルを容器から除去する。サンプルを、例えば、ピペット操作により、または重力などの物理的な力により、または分離カラムを通した流体流動により手動で除去することができる。このように、望ましくない白血球細胞を母体血サンプルから選択的に除去することができる。サンプルを場合により本発明の微細加工されたフィルタを使用してさらに濾過することができる。濾過は好ましくは、残りの赤血球細胞をサンプルから除去し、さらにサンプルを濃縮することができる。

40

【0264】

好ましい一実施形態において、望ましくない成分とサンプルを特異的に結合する特異的結合メンバーを含む磁性ビーズのインキュベーション後、サンプルは、少なくとも1つの

50

磁石を備え、または係合する分離カラムを通して運搬される。サンプルがカラムを通り流れると、磁性ビーズに結合する望ましくない成分が磁石または各磁石に隣接するチューブの1つまたは複数の壁体に付着する。代替の実施形態は磁性分離器、例えば、Immunicon (Huntingdon Valley, PA) により製造された磁性分離器を使用する。磁気捕捉も電磁物理的な力を生成する要素、例えば、Zhouらに2002年3月12日に発行された“Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips”と題した米国特許第6,355,491号、弁理士登録番号ART-00104.P.2の、2001年9月18日出願の、“Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips”と題した米国特許出願第09/955,343号および弁理士登録番号ART-00104.P.1.1の、2000年10月10日出願の、“Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips in Horizontal Configurations”と題した米国特許出願第09/685,410号に記載のものを含む電磁チップを使用することができる。さらに別の好ましい実施形態において、サンプルおよび磁性ビーズを含有するチューブを、磁性ビーズに結合する望ましくない成分の捕捉のための1種または複数種の磁石の隣に位置づける。ビーズがチューブ壁で収集された後に、1種または複数種の望ましくない成分の枯渇した上清をチューブから除去することができる。

10

20

30

40

50

【0265】

本発明のいくつかの好ましい実施形態において、サンプルからの白血球細胞の除去を、赤血球細胞の選択的な沈降により血液サンプルを分解すると同時に行う。これらの実施形態において、赤血球細胞を選択的に沈降する溶液を血液サンプルに添加し、磁性ビーズなどの固体支持体に結合する白血球細胞と特異的に結合する特異的結合メンバーを血液サンプルに添加する。混合後、赤血球細胞を沈殿させ、白血球細胞を、例えば、磁性捕捉により捕捉する。これは、沈降する溶液および好ましくは磁性ビーズに結合する特異的結合メンバーを添加することができるチューブにおいて簡便に行うことができる。チューブをサンプルを混合する期間振動させ、次いで磁性ビーズの捕捉のための1種または複数種の磁石の隣に位置づける。このように、1回のインキュベーションおよび分離工程において、RBCのおよび99%およびWBCの99%をサンプルから除去することができる。上清をチューブから除去することができ、本発明の微細加工されたフィルタを使用して濾過させる。濾過により残存するRBCが除去され、希少細胞、例えば、胎児細胞、がん細胞または幹細胞などが富化したサンプルを生じる。

【0266】

サンプルの望ましくない成分を特異的結合メンバーを使用するもの以外の方法により除去することができる。例えば、特定の細胞型の誘電特性を使用し、誘電泳動的に望ましくない成分を分離することができる。例えば、図22は赤血球細胞をチャンバを通して洗浄した後に誘電泳動チップの電極に保持された希釈された血液サンプルの白血球細胞を示す。

【0267】

赤血球細胞を沈降させ、血液サンプルの望ましくないサンプル成分を選択的に除去するための混合溶液

本発明の好ましい実施形態において、赤血球細胞を沈降する溶液も、赤血球細胞以外の望ましくないサンプル成分を血液サンプルから選択的に除去するために使用することができる1種または複数種のさらなる特異的結合メンバーを含むことができる。これに関して、本発明は赤血球細胞を沈降する血液サンプルの希少細胞を富化するための混合の沈降溶液を含み、サンプルの他の望ましくない成分の除去のための試薬を提供する。したがって、血液サンプルを処理するための混合溶液は、デキストラン、赤血球細胞の凝集を誘導することができる少なくとも1種の特異的結合メンバー、およびRBC以外のサンプルの望ましくない成分と特異的に結合することができる少なくとも1種のさらなる特異的結合メ

ンバーを含む。

【0268】

さらなる富化工程

本発明は、流体サンプルの希少細胞を富化するときを使用することができる他の工程と組み合わせて濾過を使用することも検討する。例えば、分解工程または分離工程を、限定されないが2003年11月4日出願の“Methods, Compositions, and Automated Systems for Separating Rare Cells from Fluid Samples”と題した米国特許出願第10/701,684号、2002年10月10日出願の、“Methods, Compositions, and Automated Systems for Separating Rare Cells from Fluid Samples”と題した米国特許出願第10/268,312号、これらとともに、流体サンプルの希少細胞を富化するときを使用することができる分解および分離方法に関する全ての開示において参照により本明細書に組み込む、に開示されるように濾過前または濾過後に使用することができる。

10

20

30

40

50

【0269】

III. 流体サンプルの標的成分を分離する自動濾過ユニットを使用する方法

さらに別の態様において、本発明はまた、本明細書に開示の自動濾過ユニットを使用する流体サンプルの標的成分を分離する方法であって、a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注することと、b) 濾過チャンバの前方チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらす、そして濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通して溶液の流体流動をもたらすことを含み、流体サンプルの標的成分をフィルタに保持し、またはフィルタを通して流す方法を含む。

【0270】

サンプル

サンプルは任意の流体サンプル、例えば、環境的サンプル、例えば、空気サンプル、水サンプル、食物サンプル、および生物学的サンプル、例えば、生物学的サンプルの抽出物であってよい。生物学的サンプルは、血液、骨髄サンプル、任意の種類の滲出液、腹水、骨盤洗浄液、胸膜液、髄液、リンパ液、血清、粘液、痰、唾液、尿、膣または子宮洗浄液、精液、眼液、鼻腔の抽出物、咽頭または生殖器スワブ、消化組織由来の細胞懸濁液、または糞便材料の抽出物であってよい。生物学的サンプルはまた、器官または組織のサンプル、例えば、腫瘍、例えば、器官または組織の癌からの細針吸引物またはサンプルであってよい。生物学的サンプルは細胞培養物のサンプル、例えば、初代培養物および細胞株の両方であってもよい。サンプルの容量は非常に小さく、例えば、マイクロリットルの範囲であってよく、さらに希釈を必要とし、またはサンプル非常に大きく、例えば、最大10リットルの腹水であってよい。好ましいサンプルは尿サンプルである。別の好ましいサンプルは血液サンプルである。混合種、もしくは混合サイズのいずれかの研究室で培養された細胞のサンプルまたはサンプルから除去される必要がある汚染物質または未結合試薬を含有する細胞のサンプルも検討する。いくつかの実施形態において、流体サンプルは標識試薬で調製された細胞サンプルであり、除去される細胞および成分により結合もしくは吸収または取り込まれることを意味する標識試薬は標識試薬の未結合または間質成分である。

【0271】

生物学的サンプルは、対象から最近採取された、保存していたものから採取された、または衣類、布地、道具などの対象の外部の供給源から取り出された任意のサンプルであってよい。一例として、それゆえ、血液サンプル例えば血液を含有する物質を緩衝液または溶液に浸漬することにより得られる抽出物であってよい。生物学的サンプルは未処理または部分的に処理された、例えば、透析された、試薬を添加されたなどの血液サンプルであってよい。生物学的サンプルは任意の容量のものであってよい。例えば、血液サンプルは用途に応じて、5マイクロリットル未満、または5リットル超であってよい。しかし、好

ましくは本発明の方法を使用して処理される生物学的サンプルは約10マイクロリットル～約2リットルの容量、より好ましくは約1ミリリットル～約250ミリリットルの容量および最も好ましくは約5～50ミリリットルの容量である。

【0272】

サンプルの導入

本発明のいくつかの好ましい実施形態において、1種または複数種のサンプルを自動システムのラックに入れることができる1つまたは複数のチューブに設けることができる。ラックはサンプル操作のための自動システムと自動で、または手動で係合することができる。

【0273】

別法として、サンプルは自動システムの入口を通してサンプルをピペット操作または注入することにより本発明の自動システムに分注することができ、または自動システムの導管またはリザーバーに注ぎ入れ、ピペット操作し、またはポンプにより送ることができる。ほとんどの場合において、サンプルは沈降した細胞の最適な分離のために設けられたチューブ内であってよいが、流体サンプルを保持するための任意の種類容器、例えば、プレート、皿、ウェル、またはチャンパ内であってよい。

【0274】

サンプルを自動システムの容器またはチャンパに分注する前に、溶液または試薬を場合によりサンプルに添加することができる。溶液または試薬は場合によりサンプルが本発明の自動システムに導入される前、またはサンプルが本発明の自動システムに導入された後にサンプルに添加することができる。サンプルが本発明の自動システムに導入された後に溶液または試薬をサンプルに添加する場合、サンプルが混合、インキュベーション工程、沈殿工程または濾過チャンパへの導入の前にチューブ、容器、またはリザーバー内に含有される間に溶液または試薬をサンプルに場合により添加することができる。別法として、溶液または試薬を1つまたは複数の導管、例えば、チューブを通してサンプルに添加することができ、サンプルと溶液または試薬の混合が導管で行われる。サンプルが本発明のチャンパ（例えば限定されないが、濾過チャンパ）に導入された後に、1種類以上の溶液または試薬を、直接チャンパにまたはチャンパにつながる導管を通してそれらの1種類以上を添加することにより溶液または試薬を添加することも可能である。

【0275】

サンプル（および場合により任意の溶液または試薬）を陽圧または陰圧により、例えば、シリンジ型ポンプにより自動システムに導入することができる。サンプルを自動システムに一度に全て添加することができ、またはサンプルの一部が濾過され、さらなるサンプルを添加するように徐々に添加することができる。サンプルは、サンプルの第1の部分が添加され、チャンパを通して濾過された後にサンプルの追加のバッチを連続して添加し、濾過するようにバッチで添加することもできる。

【0276】

自動濾過ユニットの濾過チャンパを通してサンプルを濾過処理する

サンプルを、1つまたは複数の分解工程または1つまたは複数の分離工程を行う前後に本発明の自動濾過ユニットで濾過することができる。これらの分解または分離工程は、限定されないがRBC沈降工程または特異的結合メンバーによる除去を含むことができる。サンプルを直接濾過チャンパ（例えば、手動または自動分注により）に移すことができ、または導管を通して濾過チャンパに入れることができる。サンプルを濾過チャンパに添加した後に、サンプルを濾過してサンプルの容量を減少させ、場合によりサンプルの望ましくない成分を除去する。サンプルを濾過するため、流体流動をチャンパを通して方向付ける。チャンパを通る流体流動を好ましくは、手動手段よりむしろ自動手段により、例えば、自動シリンジ型ポンプにより方向付ける。ポンプは濾過チャンパにつながる導管を通して陽圧または陰圧が作用することにより動作することができる。

【0277】

いくつかの実施形態において、前方チャンパおよび濾過後サブチャンパの流体流動は実

10

20

30

40

50

質的に逆平行である。濾過チャンバの流入および/または流出ポートを通る自動手段により流動を生じさせることができる。さらなる流入ポートを設けた実施形態において、実質的に逆平行の流動に垂直な溶液の流体流動を導入することができる。例えば、前方チャンバを上方チャンバと前方チャンバに分割する上方フィルタを含む場合、前方チャンバをフィルタ（各フィルタ）を横切る流体流動に使用し、フィルタ（各フィルタ）を横切る流体サンプルの成分を押し出すことができる。

【0278】

前方チャンバの流速および濾過後サブチャンバの流速は、前方チャンバから濾過後サブチャンバに流れるよう流体力が流体サンプルの成分に生じるように異なっておりよい。本明細書において使用される場合、「流速」はフィルタを横切る液体流速を指し、「供給速度」は前方チャンバの液体流速を指し、「緩衝液速度」および「廃棄速度」は濾過後サブチャンバの流入ポートおよび流出ポートの液体流速をそれぞれ指す。さらに、濾過後サブチャンバの流入速度および流出速度はフィルタを横切る流速を方向付ける所望の流体力を生じるよう異なっておりよい。例えば、流出速度は濾過後サブチャンバの流入速度より大きいとき、流体力は前方チャンバから濾過後サブチャンバに生じ、そうして前方チャンバの流体サンプルの成分がフィルタを通して濾過後サブチャンバに吸引される。

10

【0279】

濾過チャンバを通る流体流動の速度は効率的な濾過処理を可能にする任意の速度であってよく、全血サンプルに対して、好ましくは最大約10 mL/分、より好ましくは約10 ~ 約500 μ L/分および最も好ましくは約80 ~ 約140 μ L/分である。前方チャンバの流体流動の速度はフィルタ速度の約1 ~ 10倍であってよい。濾過チャンバにサンプルを添加した後、ポンプまたは液体分注処理システムは場合により緩衝液または溶液の流体流動をチャンバに方向付け、チャンバを通してさらなる濾過可能なサンプル成分を洗浄することができる。

20

【0280】

サンプルを濾過チャンバに添加し、流体流動をチャンバを通して方向付けるときに、フィルタまたは各フィルタの孔またはスロットは、1つまたは複数のフィルタを通して液体、サンプルの可溶成分、および流体サンプルの一部の不溶性成分を通過させることができるが、寸法により1つまたは複数のフィルタを通して流体サンプルの他の成分の通過を防ぐことができる。

30

【0281】

例えば、好ましい実施形態において、流体サンプルを複数のスロットを備える少なくとも1つのフィルタを備える濾過チャンバに分注することができる。チャンバは緩衝液または溶液および流体サンプルまたはその成分が流れることができる導管に場合により接続されるポートを有し得る。サンプルをチャンバに添加し、流体流動をチャンバを通して方向付けるときに、スロットは、フィルタを通して液体および場合により流体サンプルの一部の成分を通過させることができるが、フィルタを通して流体サンプルの他の成分の通過を防ぐことができる。

【0282】

本発明のいくつかの実施形態において、濾過チャンバの一部であるアクティブチップを使用し、濾過手順の間にサンプルを混合することができる。例えば、アクティブチップは、1つまたは複数の音響要素を備える音響チップであってよい。電源からの電気信号が音響要素を活性化するとき、振動エネルギーを生じサンプルの成分を混合させる。本発明の濾過チャンバの一部であるアクティブチップはフィルタの表面の微小電極を備える誘電泳動チップであってよい。電源からの電気信号が電極に伝達するとき、フィルタ表面からサンプルの成分を反発させ得る負の誘電泳動力を生じる。この実施形態において、フィルタ/チップの表面の電極は好ましくは間欠的に活性化し、この時流体流動が停止し、または大きく減少する。

40

【0283】

濾過の間のサンプルの混合は、サンプル成分の凝集に基づく濾過の効率の低下を避ける

50

ために、および特にサイズまたは形状に基づいた濾過処理が生じるチャンバの位置、例えばダム、スロットなどでチャンバを通る流体流動に反応して収集される傾向を避けるため行われる。混合は、濾過手順を通して、例えば、音響要素の連続的な活性化を通して連続して行われ、または濾過手順の間、間隔毎に、例えば、音響要素または電極の短い活性化を通して行われることができる。誘電泳動を使用して濾過チャンバ内でサンプルを混合する場合、好ましくは誘電泳動力を濾過手順の間、短い間隔（例えば、約2秒～約15分間、好ましくは約2～約30秒の長さ）で生じ、例えば、濾過手順の間パルスを与え約15分毎、またはより好ましくは濾過手順の間、約10秒毎～約1分毎に与えることができる。生じた誘電泳動力は、限定されないがスロットなどの濾過処理機能をもたらす機構からサンプル成分を遠ざけるよう作用する。

10

【0284】

濾過手順の間、濾過されたサンプル液を、濾過されたサンプルを含有するための1種または複数種の容器につながる導管を通る自動流体流動により濾過チャンバから除去することができる。好ましい実施形態において、これらの容器は廃棄物入れである。濾過後、流体流動を場合によりフィルタを通して逆方向に方向付け、フィルタに対して沈殿または滞留し得る保持成分を懸濁することができる。

【0285】

濾過手順（および場合により、1種または複数種の特異的結合メンバーと混合およびインキュベーション）後、濾過手順後の濾過チャンバに残存するサンプル成分を収集チューブまたは容器に、またはさらなる処理工程のための自動システムの他の要素につながるさらなるポートおよび導管を通してチャンバから外に方向付けることができ、またはピペット操作または液体取り込み手段により濾過チャンバまたは収集容器から除去することができる。ポートは流体流動を制御するための弁または他の機構を有し得る。ポートの開閉は自動的に制御することができる。したがって、分解した（保持した）サンプルを濾過チャンバの外に（例えば他のチャンバまたは回収容器に）流すことができるポートを濾過手順の間閉じることができ、濾過されたサンプルを濾過チャンバの外に流すことができる導管を場合により濾過手順後に閉じ、残存するサンプル成分の効率的な除去を可能にすることができる。

20

【0286】

洗浄

流体サンプルの濾過処理後、場合により緩衝液を濾過チャンバを通して洗浄し、任意の残りの成分、例えば、望ましくない細胞を通して洗浄することができる。緩衝液はサンプルと同じように、すなわち、好ましくは自動流体流動により、例えば、ポンプまたは圧力系により、または重力により濾過チャンバを通して簡便に方向付けることができ、または緩衝液はサンプルと異なる流体流動手段を使用することができる。1回または複数回の洗浄を同じまたは異なる洗浄緩衝液を使用して行うことができる。さらに、場合により空気を、例えば、陽圧またはポンプ操作により濾過チャンバに強制的に入れ、濾過チャンバを通して残りの細胞を押し出すことができる。また、チャンバの洗浄または望ましくない細胞の除去を助けるため、あるいは望ましい細胞の回収を助けるため、濾過チャンバに1種または複数種の洗浄液をバックフラッシュすることができる。

30

40

【0287】

洗浄工程の間、供給速度はフィルタ速度未満またはこれに等しくてもよく、そうして洗浄試薬、例えば、EDTAがフィルタを横切り前方チャンバに入り、フィルタのスロットを遮断する任意の残りの成分を除去することができる。

【0288】

標識

場合により、分離した標的成分を本発明の自動濾過ユニットを使用して標識することができる。例えば、分離した有核細胞または希少細胞をさらなる分析のために抗体またはアッセイ試薬を用いて標識することができる。いくつかの実施形態において、抗体またはアッセイ試薬を検出可能な分子、例えば、放射性または蛍光性染料と結合させることができ

50

る。

【0289】

標識試薬を、標的成分を濾過後に収集する収集チャンバに添加することができる。別法として、標識試薬を、標的成分が局在する場所に依じて前方チャンバまたは濾過後サブチャンバに添加することができる。試薬の添加を自動濾過ユニットの流体ポンプおよび導管により行うことができ、制御アルゴリズムにより制御することができる。

【0290】

標識工程の間、流体流動を濾過チャンバ内で停止し、標的成分と標識試薬を効率的に結合させることができる。適切な標識時間、例えば、約1～10分を使用することができる。

10

【0291】

標識工程の後に、未結合の標識試薬を、濾過チャンバに洗浄緩衝液を添加することにより洗い流すことができる。

【0292】

回収

回収工程の間、分離した標的成分を収集する。いくつかの実施形態において、フィルタの標的成分をフィルタスロットから浮かせて、収集チャンバに押し込む。フィルタスロットを遮断する任意の成分を浮かせる流体力は、例えば、濾過後サブチャンバの流出を停止することにより、または濾過後サブチャンバの流入速度未満となるように濾過後サブチャンバの流出速度を減少させることにより生じさせることができる。別法として、浮かせる工程は緩衝液速度および供給速度をそれぞれ約1～10mL/分および約0.5～5mL/分増加させることを介してであってよい。浮かせる工程の期間は例えば、10m秒～1秒以上と変化し得る。さらに、浮かせる工程を、適切な濾過効果を得るように濾過全体を通して間欠的に行うことができる。いくつかの実施形態において、チャンバを通して流れる洗浄緩衝液の速度は、サンプルのものより大きくなり得る。

20

【0293】

サンプルの望ましくない成分の選択的除去

場合により、濾過手順時、または前後のいずれかに濾過チャンバに残存するサンプル成分を、サンプルの望ましくない成分をサンプルから分離することができる自動システムの要素に流体流動により方向付けることができる。本発明のいくつかの実施形態において、濾過チャンバにサンプルを添加する前、または濾過チャンバに保持された分解したサンプルを除去する前のいずれかに1種または複数種の特異的結合メンバーを分解したサンプルに添加し、例えば、混合のための物理的な力をもたらす濾過チャンバに係合し、またはその一部となる1つまたは複数アクティブチップを使用して濾過チャンバの前および後のいずれかで混合することができる。好ましくは1種または複数種の特異的結合メンバーを濾過チャンバの分解したサンプルに添加し、チャンバのポートを閉じ、分解したサンプルと特異的結合メンバーのインキュベーションの間、連続的またはパルス状態のいずれかで音響要素を活性化させる。好ましくは1種または複数種の特異的結合メンバーは磁性ビーズに結合する抗体である。特異的結合メンバーは、胎児有核細胞などの望ましいサンプル成分を結合する抗体であってよいが、好ましくは特異的結合メンバーは望ましいサンプル成分と最小限に結合しながら、白血球細胞などの望ましくないサンプル成分と結合する抗体である。

30

40

【0294】

本発明の好ましい実施形態において、濾過手順後の濾過チャンバに残存するサンプル成分を磁性ビーズを用いてインキュベーションし、インキュベーション後に、流体流動により分離カラムに方向付ける。好ましくは本発明の方法で使用される分離カラムは、約1ミリリットル～10ミリリットルの容量能を有し、カラムの反対の末端部に注入および排出ポートを有する、円筒形ガラス、プラスチック、またはポリマーカラムである。好ましくは本発明の方法に使用される分離カラムは、カラムの長さに沿って存在する少なくとも1つの磁石を備え、または磁石に並行して位置し得る。磁石は永久磁石であってよく、また

50

は電源により活性化される1つまたは複数のチップ上の1つまたは複数の電磁自動濾過ユニットであってよい。

【0295】

濾過手順後に濾過チャンバに残存するサンプル成分は流体流動により分離カラムに方向付けられ得る。好ましくは磁性ビーズの調製を含む試薬を、チャンバに添加する前後にサンプル成分に添加することができる。好ましくは試薬を、サンプル成分を分離チャンバに移す前に添加する。好ましくは、サンプルに添加された磁性ビーズの調製物は、少なくとも1種の特異的結合メンバー、好ましくはサンプルの少なくとも1種の望ましくない成分と直接結合することができる特異的結合メンバーを含む。しかし、サンプルの少なくとも1種の望ましくない成分と間接的に結合することができる少なくとも1種の特異的結合メンバーを含む磁性ビーズの調製物を添加することも可能である。この場合、サンプルの望ましくない成分に直接結合することができる第1の特異的結合パートナーを添加することも必要である。第1の特異的結合パートナーを、第2の特異的結合パートナーを含む磁性ビーズの調製物をサンプルに添加する前にサンプルに添加することが好ましいが、これは本発明の必須要件ではない。ビーズ調製物および第1の特異的結合パートナーを、分離カラムにサンプルを個別にまたは併せて添加する前または後にサンプルに添加することができる。

10

【0296】

磁性ビーズが第1の特異的結合メンバーを含む実施形態において、サンプルおよび磁性ビーズの調製物を、磁気分離の前に約5～約60分間合わせてインキュベーションすることが好ましい。分離カラムが1つまたは複数の永久磁石を備え、または永久磁石に隣接する実施形態において、自動システムの分離カラムに、導管、チャンバ、または容器にサンプルを添加する前にインキュベーションを行うことができる。分離カラムが1種または複数種の電流活性化電磁要素を備え、またはこの要素に隣接する実施形態において、1種または複数種の電磁要素を活性化する前に分離カラムでインキュベーションを行うことができる。しかし、好ましくは、サンプルを濾過後に、および濾過チャンバに向かう導管および濾過チャンバから出てくる導管を閉じた後に、特異的結合メンバーを含む磁性ビーズとサンプルのインキュベーションを濾過チャンバで行う。

20

【0297】

第2の特異的結合メンバーを含む磁性ビーズを使用する場合、場合により、2回以上のインキュベーションを行うことができる（例えば、サンプルと、第1の特異的結合メンバーの第1のインキュベーション、およびサンプルと、第2の特異的結合メンバーを含むビーズの第2のインキュベーション）。サンプルの望ましくない成分の分離を、望ましくない成分を直接または間接的に結合する電磁ビーズを生じる磁力によりなされることができる。これは、サンプルおよび磁性ビーズをカラムに添加するとき、または1つまたは複数の電磁自動濾過ユニットが電源を有する電磁自動濾過ユニットを活性化することにより利用される実施形態において、生じ得る。非捕捉サンプル成分を流体流動により分離カラムから除去することができる。好ましくは、非捕捉サンプル成分は、導管に係合する門部を通りカラムから排出される。

30

【0298】

所望の成分の分離

濾過処理後、サンプルを場合により希少細胞の分離のための分離チャンバへの流体流動により方向付けることができる。

40

【0299】

分解されたサンプルの望ましくない成分を分離カラムで除去する好ましい態様において、分解されたサンプルを好ましくは場合によりサンプルの希少細胞の分離のための分離チャンバに移す前に第2の濾過チャンバに移す。第2の濾過チャンバはサンプルの容量をさらに減少させ、また、場合により希少細胞の分離および1種または複数種の特異的結合メンバーとサンプルの混合に使用することができる特異的結合メンバーの添加を可能にする。サンプルの、分離カラムから分離チャンバへの移動は、分離カラムから第2の濾過チャ

50

ンバにつながる導管を通る流体流動による。第2の濾過チャンバは好ましくはスロットを備える少なくとも1つのフィルタを備え、1時間当たり約1～約500ミリリットル、より好ましくは1時間当たり約2～約100ミリリットル、および最も好ましくは1時間当たり約5～約50ミリリットルの速度でチャンバを通る流体流動は、サンプルの濾過を促進する。このようにして、望ましくない成分が選択的に除去された分解されたサンプルの容量をさらに減少させることができる。第2の濾過チャンバは1つまたは複数のアクティブチップを備え、または係合することができる。アクティブチップ、例えば、音響チップまたは誘電泳動チップを濾過手順の時、または前後にサンプルを混合するために使用することができる。

【0300】

第2の濾過チャンバは場合によりサンプルと希少細胞の分離に使用することができる1種または複数種の試薬の添加に使用することもできる。サンプルの濾過後、チャンバからのサンプルまたはサンプル成分を担持する導管を閉じることができ、チャンバにつながる1つまたは複数の導管を1種または複数種の試薬、緩衝液、または溶液、例えば限定されないが、希少細胞と結合することができる特異的結合メンバーの添加に使用することができる。閉口した分離チャンバで、例えば、サンプルの成分を移動することができる物理的な力を生じ、それゆえ、混合機能をもたらすことができる1つまたは複数のアクティブチップ上の1種または複数種の音響要素または複数の電極の活性化により、1種または複数種の試薬、緩衝液、または溶液を混合することができる。本発明の好ましい態様において、希少細胞を認識する少なくとも1つの抗体で被覆される磁性ビーズを濾過チャンバでサンプルに添加する。磁性ビーズを導管を介して添加し、第2の濾過チャンバに一体化し、または係合する1つまたは複数のアクティブチップの活性化によりサンプルと混合する。特異的結合メンバーとサンプルのインキュベーションは継続して、約5分から約2時間、好ましくは約8～約30分間であってよく、インキュベーション全体にわたり、定期的にまたは連続して混合させることができる。

【0301】

1種または複数種の試薬、溶液、または緩衝液とサンプルの添加および混合に使用されない第2の濾過チャンバを有することは本発明の範囲内である。1種または複数種の試薬、溶液、または緩衝液とサンプルの添加および混合に使用することができるが、濾過機能を行わない希少細胞の分離のための分離チャンバに先行するチャンバを有することも本発明の範囲内である。介入する濾過または混合チャンバを有することなく、分離カラムから分離チャンバに移るサンプルを有することも本発明の範囲内である。しかし、本方法が血液サンプルから希少細胞の分離に向かって方向付けられる態様において、1種または複数種の試薬とサンプルの添加および混合のためにも使用される第2の濾過チャンバの使用が好ましい。

【0302】

サンプルを流体流動により分離チャンバに移す。好ましくは、希少細胞の分離のための分離チャンバは分離を行うことができる少なくとも1種のアクティブチップを備え、または係合する。このようなチップは、チャンバのある領域からチャンバの別の領域へサンプル成分を移動し、または操作するために使用することができる物理的な力を少なくとも一部生じることができる機能的要素を備える。サンプル成分を操作するためのチップの好ましい機能的要素は電極および電磁自動濾過ユニットである。本発明のアクティブチップ上のサンプル成分を転位させるために使用される力は、誘電泳動力、電磁力、進行波誘電泳動力、または進行波電磁力であってよい。希少細胞を分離するために使用されるアクティブチップは好ましくはチャンバの一部である。チャンバは、任意の適切な材料のものおよび任意のサイズおよび寸法のものであってよいが、好ましくはサンプルから希少細胞を分離するために使用されるアクティブチップを備えるチャンバ(「分離チャンバ」)は、約1マイクロリットル～10ミリリットル、より好ましくは約10マイクロリットル～約1ミリリットルの容量を有する。

【0303】

10

20

30

40

50

本発明のいくつかの実施形態において、アクティブチップは、電極を備える誘電泳動または進行波誘電泳動チップである。このようなチップおよびこれらの使用は、2001年10月9日出願の“An Integrated Biochip System for Sample Preparation and Analysis”と題した米国特許出願第09/973,629号、2000年10月10日出願の、“Compositions and Methods for Separation of Moieties on Chips”と題した米国特許出願第09/686,737号、2000年8月10日出願の、“Methods for Manipulating Moieties in Microfluidic Systems”と題した米国特許出願第09/636,104号、および弁理士登録番号471842000400の、2000年10月4日出願の“Apparatuses Containing Multiple Active Force Generating Elements and Uses Thereof”と題した米国特許出願第09/679,024号に記載され、全て参照により組み込まれる。希少細胞を本発明のサンプルから、例えば、誘電泳動チップ上のそれらの選択的な保持により分離することができ、流体流動がサンプルの非保持成分を除去することができる。

【0304】

本発明の他の好ましい実施形態において、アクティブチップは電磁自動濾過ユニット、例えば、Zhouらに2002年3月12日に発行された、“Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips”と題した米国特許第6,355,491号、弁理士登録番号ART-00104.P.2の、2001年9月18日出願の“Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips”と題した米国特許出願第09/955,343号、および弁理士登録番号ART-00104.P.1.1の、2000年10月10日出願の“Individually Addressable Micro-Electromagnetic Unit Array Chips in Horizontal Configurations”と題した米国特許出願第09/685,410号に記載の電磁チップを備える電磁チップである。電磁チップを磁気泳動または進行波電磁泳動による分離に使用することができる。好ましい実施形態において、希少細胞を、電磁チップを備えるチャンバに添加する前または後に、希少細胞と直接または間接的に結合することができる特異的結合メンバーを含む磁性ビーズとインキュベーションすることができる。好ましくは、希少細胞が電磁チップに捕捉される実施形態において、サンプルを混合チャンバで特異的結合メンバーを含む磁性ビーズと混合する。好ましくは、混合チャンバはサンプルとビーズを混合するための音響チップを備える。細胞を混合チャンバから分離チャンバに導管を通り方向付けることができる。希少細胞を、分離チャンバのアクティブチップの表面での磁気捕捉により、流体サンプルから分離することができ、他のサンプル成分を流体流動により洗い流すことができる。

【0305】

本発明の方法はまた、希少細胞の分離に使用されるアクティブチップが多機能チップである実施形態を含む。例えば、希少細胞の分離に使用される多機能チップは電極および電磁自動濾過ユニットの両方を備えることができる。これは2種以上のサンプル成分の分離のために設けることができる。例えば、磁気捕捉を使用し希少細胞を単離することができる一方で、負の誘電泳動を使用し、多機能チップを備えるチャンバから望ましくない細胞を除去する。

【0306】

分離チャンバから望ましくないサンプル成分を除去した後、負の誘電泳動などの活発な物理的な力を通して、または流体流動によるいずれかで捕捉した希少細胞を、細胞をチップ表面に付着させる物理的な力を除去し、流体流動を使用して容器の細胞を収集することにより回収することができる。

10

20

30

40

50

【0307】

血液サンプルの赤血球細胞を沈降させ、望ましくないサンプル成分を選択的に除去するための混合溶液

本発明の好ましい実施形態において、赤血球細胞を沈降させる溶液は、血液サンプルからの赤血球細胞以外の望ましくないサンプル成分を選択的に除去するために使用することができる1種または複数種のさらなる特異的結合メンバーも含むことができる。これに関して、本発明は赤血球細胞を沈降させる血液サンプルの希少細胞を富化させるための混合沈降溶液を含み、サンプルの他の望ましくない成分の除去のための試薬を提供する。したがって、血液サンプルを処理するための混合溶液は、デキストラン、赤血球細胞の凝集を誘導することができる少なくとも1種の結合メンバー、およびRBC以外のサンプルの望ましくない成分に特異的に結合することができる少なくとも1種のさらなる特異的結合メンバーを含む。

10

【0308】

サンプルへの沈降溶液の添加

赤血球細胞が沈降する溶液を、任意の簡便な手段、例えば、ピペット操作、自動液体取り込み/分注デバイスまたはシステム、導管を通るポンプ操作などにより血液サンプルに添加することができる。血液サンプルに添加される沈降溶液の量は様々であってよく、血液サンプルと混合したときに濃度が最適となるように、沈降溶液中のデキストランおよび特異的結合メンバー（ならびに他の成分）の濃度によりおもに決定される。最適には、血液サンプルの容量を評価し、サンプル容量の0.01~100倍、好ましくはサンプル容量の0.1~10倍およびより好ましくはサンプル容量の0.25~5倍、ならびにさらにより好ましくはサンプル容量の0.5倍~2倍の範囲の適切な割合の沈降溶液の容量を血液サンプルに添加する。（血液サンプルまたはその一部を赤血球細胞を沈降する溶液に添加することも可能である。この場合、沈降溶液の既知の容量をチューブまたは他の容器に採ることができ、血液サンプルの容量を測定して沈降溶液に添加することができる。）

20

【0309】

望ましくない成分を除去するための特異的結合メンバー

本発明の沈降溶液の成分に加えて、本発明の混合溶液は、血液サンプルの望ましくない成分（限定されないが赤血球細胞、白血球細胞、血小板、血清タンパク質）と選択的に結合することができる。サンプルの望ましくない成分と選択的に結合することができる1種または複数種の特異的結合メンバーを使用し、サンプルの望ましくない成分を除去することができる。サンプル中の希少細胞の相対的な割合を増加させ、したがってサンプルの希少細胞の富化に寄与することができる。「選択的に結合する」とは、1種または複数種の望ましくないサンプル成分を除去する本発明の方法で使用される特異的結合メンバーがサンプルの望ましい細胞に明らかに結合しないことを意味する。「明らかに結合しない」とは、1種または複数種の望ましい細胞の30%以下、好ましくは10%以下、およびより好ましくは1.0%以下がサンプルから望ましくない成分を除去するために使用される特異的結合メンバーにより結合することを意味する。多くの場合、血液サンプルの望ましくない成分は白血球細胞である。本発明の好ましい実施形態において、本発明の混合溶液を赤血球細胞を沈降させるため、および血液サンプルから白血球細胞を選択的に除去するために使用することができる。

30

40

【0310】

白血球細胞と特異的に結合することができる特異的結合メンバーは、非限定的な例として、抗体、受容体のリガンド、輸送体、白血球細胞の表面のチャンネルもしくは他の断片、または白血球細胞の表面の特定の炭水化物断片（例えば、硫化ルイス型炭水化物、糖脂質、プロテオグリカンまたはセレクチン）に特異的に結合することができるレクチンもしくは他のタンパク質であってよい。

【0311】

好ましくは、白血球細胞と選択的に結合する特異的結合メンバーは、白血球細胞に結合

50

するが胎児有核細胞に明らかに結合しない抗体、例えば、CD3、CD11b、CD14、CD17、CD31、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102、またはCD166などに対する抗体である。抗体は、例えば、Dako、BD Pharmingen、Antigenix America、Neo markers、Leinco Technologies、Research & Diagnostic Systems、Serotec、United States Biological、Bender Medsystems Diagnostics、Ancell、Leinco Technologies、Cortex Biochem、CalTag、Biodesign、Biomeda、Accurate Chemicals & Scientific および Chemicon International などの供給業者から市販され購入することができる。抗体の、白血球細胞と結合し、効率的に除去し (bind an efficiently remove white blood cells)、サンプルから望ましい細胞を富化させる能力を、当技術分野において周知の捕捉アッセイを使用して試験することができる。

10

【0312】

流体サンプルの1種または複数種の望ましい成分を望ましくない成分が結合する領域または容器から除去することができるように、本発明の1種または複数種の望ましくない成分に選択的に結合する特異的結合メンバーを使用し、1種または複数種の望ましくない成分を捕捉することができる。このようにして、望ましくない成分を、分離される希少細胞を含むサンプルの他の成分から分離することができる。捕捉は望ましくない成分または各成分を認識する特異的結合メンバーを固体支持体に付着させることにより、または望ましくない成分または各成分に結合する特定の結合メンバーを認識する第2の特異的結合メンバーと固体支持体を、望ましくない成分が固体支持体に付着するように結合させることにより行うことができる。本発明の好ましい実施形態において、本発明の混合溶液に得られる望ましくないサンプル成分に選択的に結合する特異的結合メンバーを、微粒子など固体支持体に連結させるがこれは本発明の必須要件でない。

20

【0313】

磁性ビーズは、望ましくないサンプル成分と選択的に結合する特異的結合メンバーを連結させることができる本発明の方法での使用に好ましい固体支持体である。磁性ビーズは当技術分野において公知であり、市販されている。抗体、レクチンならびにアビジンおよびその誘導体などのタンパク質を含む分子を磁性ビーズなどの微粒子と連結させる方法が当技術分野において公知である。本発明の好ましい磁性ビーズは0.02~20ミクロン径、好ましくは0.05~10ミクロン径、およびより好ましくは0.05~5ミクロン径ならびにさらに好ましくは0.05~3ミクロン径であり、好ましくは第1の特異的結合メンバー、例えば、サンプルから除去される細胞に結合することができる抗体、または第2の特異的結合メンバー、例えば、望ましくないサンプル成分に結合する第1の特異的結合メンバー(例えば、ビオチン化された第1の特異的結合メンバー)に結合することができるstreptavidinまたはneutravidinを用いて被覆された本発明の混合溶液に得られる。

30

【0314】

本発明の好ましい実施形態において、流体サンプルは母体血サンプルであり、分離が望ましい希少細胞は胎児細胞であり、サンプルから除去されるサンプルの望ましくない成分は白血球細胞および他の血清成分である。これらの実施形態において、白血球細胞に選択的に結合する特異的結合メンバーを使用し、磁気捕捉によりサンプルから白血球細胞を除去する。好ましくは得られた特異的結合メンバーを直接捕捉のための磁性ビーズに付着させ、またはstreptavidin被覆磁性ビーズによる白血球細胞の間接的な捕捉のためのビオチン化形態で得られる。

40

【0315】

本発明の血液サンプルの希少細胞を富化させるための混合溶液は、他の成分、例えば限定されないが、塩、緩衝剤、特定の浸透圧を維持する物質、キレート化剤、タンパク質、

50

脂質、小分子、抗凝結剤などを含むことができる。例えば、本発明のいくつかの好ましい態様において、混合溶液は生理学的塩溶液、例えば、P B S、カルシウムおよびマグネシウムを含まないP B Sまたはハックス平衡食塩溶液を含む。本発明のいくつかの好ましい態様において、E D T AもしくはヘパリンまたはA C Dは赤血球細胞の詰まりを防ぐために含まれる。

【0316】

混合

血液サンプルおよび赤血球細胞を沈降する溶液を、R B C凝集化学物質（例えば、ポリマー、例えば、デキストランなど）と沈降溶液の1種または複数種の特異的結合メンバーと血液サンプルの成分がサンプル容器全体に分散されるように混合する。混合は、好ましくは細胞の破壊の可能性が最も少ない振動および反転などの方法を用いて、電気を動力とした音響混合、攪拌、振動、反転、激しい攪拌などのすでに行われている手段であってよい。

10

【0317】

血液サンプルおよび沈降溶液のインキュベーション

沈降溶液と混合したサンプルを赤血球細胞が沈降するようにインキュベーションさせる。好ましくは、サンプルを含む容器は、細胞が効率よく沈殿することができるように沈降の間固定される。沈降は約5 ~ 約37の任意の温度で行うことができる。ほとんどの場合、約15 ~ 約27で本方法の工程を行うことが簡便である。沈降インキュベーションに最適な時間を、溶液中のデキストランおよび特異的結合メンバーの濃度、沈降溶液を添加後の血液サンプルの希釈因子、およびインキュベーションの温度などのパラメータを変更しながら、所与の沈降溶液に対して経験的に決定することができる。沈降インキュベーションは、好ましくは5分~24時間、より好ましくは10分~4時間、および最も好ましくは約13分~約1時間である。本発明のいくつかの好ましい態様において、インキュベーション時間は約30分である。

20

【0318】

I V . 流体サンプルの標的成分を分離するための自動濾過ユニットを使用する方法

さらに別の態様において、本発明はまた、本明細書に開示の自動システムを使用して流体サンプル中の成分を富化し、そして分析する方法であって、a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注すること、b) 濾過チャンバの前方チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらすこと、c) 濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通して溶液の流体流動をもたらすこと、およびd) 分析装置を使用して標識された標的成分を分析することを含む方法を含む。

30

【0319】

V . 例示的实施形態

1 . 筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備え、前方チャンバの流体流路が濾過後サブチャンバの流体流路と実質的に対向する、濾過チャンバ。

【0320】

2 . 前方チャンバおよび濾過後サブチャンバのそれぞれが流入ポートおよび/または流出ポートを有する、実施形態1の濾過チャンバ。

40

【0321】

3 . 前方チャンバが少なくとも2つの流入ポートを備える、実施形態2の濾過チャンバ。

【0322】

4 . 前方チャンバが上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを作製する、実施形態3の濾過チャンバ。

【0323】

5 . 前方チャンバと上方チャンバの間の上方フィルタがゆっくりした流動状態下において平坦度を維持するのに十分な硬さがある、実施形態4の濾過チャンバ。

50

- 【0324】
6. 上方フィルタが約5ミクロンより小さい開口部を有する孔またはスロットを備える、実施形態4または5に記載の濾過チャンバ。
- 【0325】
7. 流入ポートおよび流出ポートを交換可能に使用することができる、実施形態2～6のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0326】
8. 微細加工されたフィルタが1つまたは複数のテーパ状のスロットを備える、実施形態1～7のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0327】
9. 微細加工されたフィルタが約100～5,000,000個のテーパ状のスロットを備える、実施形態8の濾過チャンバ。
- 【0328】
10. 微細加工されたフィルタの厚さが約20～約200ミクロンである、実施形態1～9のいずれか1つの濾過チャンバ。
- 【0329】
11. 微細加工されたフィルタの厚さが約40～約70ミクロンである、実施形態10の濾過チャンバ。
- 【0330】
12. テーパー状のスロットがおよそ20ミクロン～200ミクロン長および約2ミクロン～約16ミクロン幅であり、上記のスロットのテーパリングが約0度～約10度であり、上記のテーパ状のスロットのスロットサイズのばらつきが約20%未満である、実施形態8～11のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0331】
13. テーパー状のスロットのサイズが20%超で変化する、実施形態8～11のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0332】
14. テーパー状のスロットのサイズが50%超で変化する、実施形態13の濾過チャンバ。
- 【0333】
15. テーパー状のスロットのサイズが100%超で変化する、実施形態14の濾過チャンバ。
- 【0334】
16. テーパー状のスロットのサイズが前方チャンバの流体流路に沿って変化する、実施形態13～15のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0335】
17. 濾過後サブチャンバが少なくとも2つの流出ポートを備える、実施形態2～16のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0336】
18. 少なくとも2つの流出ポートが前方チャンバの流体流路に沿って配列される、実施形態17の濾過チャンバ。
- 【0337】
19. 2つ以上の電極を備える、実施形態1～18のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0338】
20. 電極が微細加工されたフィルタの反対側に配置される、実施形態19の濾過チャンバ。
- 【0339】
21. 電極が濾過チャンバの筐体に配置される、実施形態19または20に記載の濾過チャンバ。

- 【0340】
22. 電極が前方チャンバおよび/または濾過後サブチャンバに配置される、実施形態19~21のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0341】
23. 電極が前方チャンバおよび/または濾過後サブチャンバと相互作用するポートまたは接続の1つまたは複数に組み込まれ、または配置される、実施形態19~21のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0342】
24. 濾過チャンバが少なくとも1つの音響要素を備える、実施形態1~23のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。 10
- 【0343】
25. 前方チャンバの流出ポートが収集チャンバまたは収集ウェルに接続される、実施形態1~24のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0344】
26. 筐体が頂部部分および底部部分を備え、頂部部分および底部部分が一緒になって係合し、または接合して濾過チャンバを形成する、実施形態1~25のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0345】
27. 濾過チャンバが約1mm~約10cmの長さ、約1mm~約3cmの幅、および約0.02mm~約20mmの深さを有する、実施形態1~26のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。 20
- 【0346】
28. 濾過チャンバが約10mm~約50mmの長さ、約5mm~約20mmの幅、および約0.05mm~約2.5mmの深さを有する、実施形態27の濾過チャンバ。
- 【0347】
29. 濾過チャンバが約30mmの長さ、約6mmの幅、および約1mmの深さを有する、実施形態28の濾過チャンバ。
- 【0348】
30. 筐体が外形寸法として約38mmの長さ、約12mmの幅、および約20mmの深さを有する、実施形態1~29のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。 30
- 【0349】
31. その前方チャンバが約1mm~約10cmの長さ、約1mm~約3cmの幅、および約0.01mm~約10mmの深さを有する、実施形態27~30のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0350】
32. その前方チャンバが約10mm~約50mmの長さ、約5mm~約20mmの幅、および約0.01mm~約1mmの深さを有する、実施形態31の濾過チャンバ。
- 【0351】
33. その前方チャンバが約30mmの長さ、約6mmの幅、および約0.1~0.4mmの深さを有する、実施形態32の濾過チャンバ。 40
- 【0352】
34. 前方チャンバの容量が約0.01μL~約5mLである、実施形態31~33のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。
- 【0353】
35. 前方チャンバの容量が約1μL~約100μLである、実施形態34の濾過チャンバ。
- 【0354】
36. 前方チャンバの容量が約40~80μLである、実施形態35の濾過チャンバ。
- 【0355】
37. 濾過後サブチャンバが約1mm~約10cmの長さ、約1mm~約3cmの幅、 50

および約 0.01 mm ~ 約 1 cm の深さを有する、実施形態 27 ~ 36 のいずれか 1 つに記載の濾過チャンバ。

【0356】

38. 濾過後サブチャンバが約 10 mm ~ 約 50 mm の長さ、約 5 mm ~ 約 20 mm の幅、および約 0.2 mm ~ 約 1.5 mm の深さを有する、実施形態 37 の濾過チャンバ。

【0357】

39. 濾過後サブチャンバが約 30 mm の長さ、約 6.4 mm の幅、および約 0.6 ~ 1 mm の深さを有する、実施形態 38 の濾過チャンバ。

【0358】

40. 筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する、濾過チャンバ。

10

【0359】

41. 濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備える、実施形態 40 の濾過チャンバ。

【0360】

42. 前方チャンバが上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを作製する、実施形態 41 の濾過チャンバ。

【0361】

43. 上方フィルタの表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生じる、実施形態 42 の濾過チャンバ。

20

【0362】

44. 修飾が物理蒸着による、実施形態 40 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の濾過チャンバ。

【0363】

45. 修飾がプラズマ強化化学蒸着による、実施形態 40 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の濾過チャンバ。

【0364】

46. 蒸着が金属窒化物または金属ハロゲン化物のものである、実施形態 40 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の濾過チャンバ。

30

【0365】

47. 金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である、実施形態 46 の濾過チャンバ。

【0366】

48. 修飾が化学蒸着による、実施形態 40 ~ 43 のいずれか 1 つに記載の濾過チャンバ。

【0367】

49. 化学蒸着がパリレンまたはその誘導体による、実施形態 48 の濾過チャンバ。

【0368】

50. パリレンまたはその誘導体がパリレン、パリレン - N、パリレン - D、パリレン AF - 4、パリレン SF、およびパリレン HT からなる群から選択される、実施形態 49 の濾過チャンバ。

40

【0369】

51. 修飾がポリテトラフルオロエチレン (PTFE) による、実施形態 48 の濾過チャンバ。

【0370】

52. 修飾が Teflon (登録商標) - AF による、実施形態 48 の濾過チャンバ。

【0371】

53. 修飾がパーフルオロカーボンによる、実施形態 40 または 43 に記載の濾過チャンバ。

50

【0372】

54．パーフルオロカーボンが1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ(1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチル)シランまたはトリクロロ(オクタデシル)シランであり、液体形態である、実施形態53の濾過チャンバ。

【0373】

55．フィルタおよび/または筐体がケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、金属、炭素、セラミック、プラスチック、またはポリマーを含む、実施形態40～54のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0374】

56．フィルタおよび/または筐体が窒化ケイ素または窒化ホウ素を含む、実施形態40～54のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0375】

57．筐体に囲まれた微細加工されたフィルタを備える濾過チャンバであって、上記のフィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレンまたはその誘導体、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標) - AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する、濾過チャンバ。

【0376】

58．濾過チャンバが前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを備える、実施形態57の濾過チャンバ。

【0377】

59．前方チャンバが上方フィルタを備え、それにより上方チャンバを作製する、実施形態58の濾過チャンバ。

【0378】

60．上方フィルタの表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレンもしくはその誘導体、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標) - AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する、実施形態59の濾過チャンバ。

【0379】

61．金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である、実施形態57～60のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0380】

62．パリレンまたはその誘導体がパリレン、パリレン - N、パリレン - D、パリレンAF - 4、パリレンSF、およびパリレンHTからなる群から選択される、実施形態57～60のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0381】

63．パーフルオロカーボンが1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ(1H, 1H, 2H, 2H - パーフルオロオクチル)シランまたはトリクロロ(オクタデシル)シランであり、パーフルオロカーボンが表面に共有結合する、実施形態57～60のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0382】

64．フィルタおよび/または筐体がケイ素、二酸化ケイ素、ガラス、金属、炭素、セラミック、プラスチック、またはポリマーを含む、実施形態57～63のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0383】

65．フィルタおよび/または筐体が窒化ケイ素または窒化ホウ素を含む、実施形態57～63のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0384】

66．フィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を蒸着、昇華、気相表面反応、または粒子スパッタリングにより修飾し、均一な被膜を生成する、実施形態1～39

10

20

30

40

50

のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0385】

67. 蒸着が金属窒化物または金属ハロゲン化物のものである、実施形態66の濾過チャンバ。

【0386】

68. 金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である、実施形態67の濾過チャンバ。

【0387】

69. 修飾が化学蒸着による、実施形態66の濾過チャンバ。

【0388】

70. 修飾がパーフルオロカーボンによる、実施形態66の濾過チャンバ。

【0389】

71. パーフルオロカーボンが1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ(1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロオクチル)シランまたはトリクロロ(オクタデシル)シランであり、液体形態である、実施形態70の濾過チャンバ。

【0390】

72. フィルタの表面および/または上記の筐体の内部表面を金属窒化物、金属ハロゲン化物、パリレン、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、Teflon(登録商標)-AFまたはパーフルオロカーボンにより修飾する、実施形態1~39のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0391】

73. 金属窒化物が窒化チタン、窒化ケイ素、窒化亜鉛、窒化インジウム、および/または窒化ホウ素である、実施形態72の濾過チャンバ。

【0392】

74. パーフルオロカーボンが1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロオクチルトリエトキシラン、1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロデシルトリエトキシシラン、トリクロロ(1H, 1H, 2H, 2H-パーフルオロオクチル)シランまたはトリクロロ(オクタデシル)シランであり、パーフルオロカーボンが表面に共有結合する、実施形態72の濾過チャンバ。

【0393】

75. 少なくとも2つの微細加工されたフィルタを備える、実施形態1~74のいずれか1つに記載の濾過チャンバ。

【0394】

76. 少なくとも2つの微細加工されたフィルタが縦一列に配列される、実施形態75の濾過チャンバ。

【0395】

77. 縦一列に配列された実施形態1~76のいずれか1つに記載の少なくとも2つの濾過チャンバを備える、濾過チャンバ。

【0396】

78. 少なくとも2つの濾過チャンバの前方チャンバが流体接続状態にある、実施形態77の濾過チャンバ。

【0397】

79. 少なくとも2つの濾過チャンバが1つの微細加工されたフィルタおよび/または上方フィルタを共有する、実施形態78の濾過チャンバ。

【0398】

80. 各濾過チャンバ内のフィルタのスロットが様々な幅のものであり、濾過チャンバがスロット幅が大きくなる順に配列される、実施形態77または78に記載の濾過チャンバ。

【0399】

10

20

30

40

50

81. 実施形態1～80のいずれか1つに記載の濾過チャンバを備える、カートリッジ。
- 【0400】
82. 少なくとも2つの濾過チャンバを備える、実施形態81のカートリッジ。
- 【0401】
83. 8個の濾過チャンバを備える、実施形態82のカートリッジ。
- 【0402】
84. 実施形態1～80のいずれか1つに記載の濾過チャンバを備える、流体サンプル中の標的成分を分離するための自動濾過ユニット。 10
- 【0403】
85. さらに、濾過チャンバの流体流動を制御するための制御アルゴリズムを備える、実施形態84の自動濾過ユニット。
- 【0404】
86. 少なくとも2つの濾過チャンバを備える、実施形態84または85に記載の自動濾過ユニット。
- 【0405】
87. 少なくとも2つの濾過チャンバが縦一列に配列され、濾過チャンバがスロット幅が大きくなるフィルタを備える、実施形態86に記載の自動濾過ユニット。
- 【0406】
88. フィルタが流路に沿ってサイズが大きくなるスロット幅を含有する、実施形態86または87に記載の自動濾過ユニット。 20
- 【0407】
89. 上方チャンバを備える、実施形態88の自動濾過ユニット。
- 【0408】
90. 濾過後サブチャンバが、複数の仕切りを備え、各仕切りが流出ポートを含む、実施形態84～89のいずれか1つに記載の自動濾過ユニット。
- 【0409】
91. 濾過後チャンバの各仕切りからの流出ポートがマルチウェルプレートの個々のウェルと整列する、実施形態90の自動濾過。
- 【0410】 30
92. ウェルが約1～100mm毎に配置される、実施形態91の自動濾過。
- 【0411】
93. ウェルが約2.25mm毎に配置される、実施形態91の自動濾過。
- 【0412】
94. ウェルが約4.5mm毎に配置される、実施形態91の自動濾過。
- 【0413】
95. ウェルが約9または18mm毎に配置される、実施形態91の自動濾過。
- 【0414】
96. 8個の濾過チャンバを備える、実施形態84～95のいずれか1つに記載の自動濾過ユニット。 40
- 【0415】
97. 濾過チャンバで流体流動を生じさせるための手段を備える、実施形態84～96のいずれか1つに記載の自動濾過ユニット。
- 【0416】
98. 流体流動を生じさせる手段が流体ポンプである、実施形態97の自動濾過ユニット。
- 【0417】
99. 分離した標的成分を収集するための手段を備える、実施形態84～98のいずれか1つに記載の自動濾過ユニット。
- 【0418】 50

100. 実施形態84～98のいずれか1つに記載の自動濾過ユニットおよび濾過ユニットに接続された分析装置を備える、流体サンプル中の標的成分を分離し、そして分析する自動システム。

【0419】

101. 分析装置が細胞選別デバイスまたはフローサイトメーターである、実施形態100の自動システム。

【0420】

102. 流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、

a) 実施形態1～80のいずれか1つに記載の濾過チャンバに流体サンプルを分注する工程と、

b) 濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらす工程であって、流体サンプルの標的成分がフィルタに保持され、またはフィルタを通過する、工程とを含む、方法。

【0421】

103. 濾過チャンバの前方チャンバを通る流体サンプルの流体流動、および濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通る溶液の流体流動をもたらす、必要に応じて、濾過チャンバの上方チャンバを通して溶液の流体流動をもたらす工程を含む、実施形態102の方法。

【0422】

104. 流体サンプルが成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および/または結合特異性に基づき分離される、実施形態102または103に記載の方法。

【0423】

105. 流体サンプルが前方チャンバの流入ポートを通して分注される、実施形態103または104に記載の方法。

【0424】

106. 溶液が濾過後サブチャンバの流入ポートに導入される、実施形態103～105のいずれか1つに記載の方法。

【0425】

107. 溶液が上方濾過チャンバの流入ポートに導入される、実施形態103～105のいずれか1つに記載の方法。

【0426】

108. 流体サンプルがフィルタの外部にある構造および/またはフィルタに組み込まれた構造を介して作用する物理的な力で操作される、実施形態102～107のいずれか1つに記載の方法。

【0427】

109. 物理的な力が誘電泳動力、進行波誘電泳動力、磁力、音響力、静電力、機械力、光学放射力および熱対流力からなる群から選択される、実施形態108の方法。

【0428】

110. 誘電泳動力または進行波誘電泳動力が電極により生じる電場を介して作用する、実施形態109の方法。

【0429】

111. 音響力が定在波音場または進行波音場を介して作用する、実施形態109の方法。

【0430】

112. 音響力が圧電材料により生じる音場を介して作用する、実施形態109の方法。

【0431】

113. 音響力がボイスコイルまたはオーディオスピーカーを介して作用する、実施形態109の方法。

【0432】

10

20

30

40

50

- 114 . 静電力が直流 (D C) 電場を介して作用する、実施形態 109 の方法。
 【 0 4 3 3 】
- 115 . 光学放射力がレーザーピンセットを介して作用する、実施形態 109 の方法。
 【 0 4 3 4 】
- 116 . 流体サンプルが血液、滲出液、尿、骨髓サンプル、腹水、骨盤洗浄液、胸膜液、髄液、リンパ液、血清、粘液、痰、唾液、精液、眼液、鼻腔の抽出物、咽頭もしくは生殖器スワブ、消化組織由来の細胞懸濁液、糞便材料の抽出物、混合種および / もしくは混合サイズのいずれかの培養細胞、または除去される必要のある汚染物質または未結合の反応物質を含有する細胞である、実施形態 102 ~ 115 のいずれか 1 つに記載の方法。
 【 0 4 3 5 】 10
- 117 . 流体サンプルが血液サンプルであり、除去される成分が血漿、血小板および / または赤血球細胞 (R B C) である、実施形態 116 の方法。
 【 0 4 3 6 】
- 118 . 流体サンプルが、除去される必要のある汚染物質または未結合の反応物質を含有する細胞であり、反応物質が細胞を標識する試薬である、実施形態 116 の方法。
 【 0 4 3 7 】
- 119 . 流体サンプルが血液サンプルであり、標的成分が有核細胞、例えば、非造血細胞、血液細胞の亜集団、胎児赤血球細胞、幹細胞、またはがん性細胞である、実施形態 116 の方法。
 【 0 4 3 8 】 20
- 120 . 流体サンプルが滲出液サンプルまたは尿サンプルであり、標的成分が有核細胞、例えば、がん性細胞または非造血細胞である、実施形態 116 の方法。
 【 0 4 3 9 】
- 121 . 実施形態 84 ~ 99 のいずれか 1 つに記載の自動濾過ユニットを使用する流体サンプル中の標的成分を分離する方法であって、
 a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注する工程と、
 b) 濾過チャンバを通して流体サンプルの流体流動をもたらす工程であって、流体サンプルの標的成分がフィルタに保持され、またはフィルタを通して流れる、工程とを含む、方法。
 【 0 4 4 0 】 30
- 122 . 流体サンプルが成分のサイズ、形状、変形能、結合親和性および / または結合特異性に基づき分離される、実施形態 121 の方法。
 【 0 4 4 1 】
- 123 . 前方チャンバの流体サンプルが濾過後サブチャンバの溶液に実質的に逆平行に流れる、実施形態 121 または 122 に記載の方法。
 【 0 4 4 2 】
- 124 . フィルタ速度が約 0 ~ 5 m L / 分である、実施形態 121 ~ 123 のいずれか 1 つに記載の方法。
 【 0 4 4 3 】
- 125 . フィルタ速度が約 10 ~ 500 μ L / 分である、実施形態 124 の方法。
 【 0 4 4 4 】 40
- 126 . フィルタ速度が約 80 ~ 140 μ L / 分である、実施形態 125 の方法。
 【 0 4 4 5 】
- 127 . 供給速度がフィルタ速度の約 1 ~ 10 倍である、実施形態 124 ~ 126 のいずれか 1 つに記載の方法。
 【 0 4 4 6 】
- 128 . さらに、
 c) 流体サンプルの保持成分を、さらなるサンプル非含有洗浄試薬で洗浄する工程を含む、実施形態 102 ~ 127 のいずれか 1 つに記載の方法。
 【 0 4 4 7 】 50

- 1 2 9 . 洗浄工程中、供給速度がフィルタ速度未満またはこれに等しい、実施形態 1 2 8 の方法。
【 0 4 4 8 】
- 1 3 0 . 洗浄試薬が濾過後サブチャンバに導入される、実施形態 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。
【 0 4 4 9 】
- 1 3 1 . 洗浄試薬が前方チャンバおよび / または上方チャンバに導入される、実施形態 1 2 8 または 1 2 9 に記載の方法。
【 0 4 5 0 】
- 1 3 2 . d) 標的成分に結合させるための標識試薬を提供する工程
をさらに含む、実施形態 1 0 2 ~ 1 3 1 のいずれか 1 つに記載の方法。 10
【 0 4 5 1 】
- 1 3 3 . 標識試薬が抗体である、実施形態 1 3 2 の方法。
【 0 4 5 2 】
- 1 3 4 . 標識試薬が収集チャンバに添加される、実施形態 1 3 2 または 1 3 3 に記載の方法。
【 0 4 5 3 】
- 1 3 5 . 標識試薬が前方チャンバおよび / または上方チャンバに添加される、実施形態 1 3 2 または 1 3 3 に記載の方法。
【 0 4 5 4 】 20
- 1 3 6 . 標識工程中、濾過後サブチャンバの流体流動が休止する、実施形態 1 3 2 ~ 1 3 5 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 4 5 5 】
- 1 3 7 . e) 未結合の標識試薬を除去する工程
をさらに含む、実施形態 1 3 2 ~ 1 3 6 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 4 5 6 】
- 1 3 8 . f) 収集チャンバの標的成分を回収する工程
をさらに含む、実施形態 1 0 2 ~ 1 3 7 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 4 5 7 】
- 1 3 9 . 回収工程中、供給速度が約 5 ~ 2 0 m L / 分である、実施形態 1 3 8 の方法。 30
【 0 4 5 8 】
- 1 4 0 . 回収工程中、流出速度が濾過後サブチャンバの流入速度に等しい、実施形態 1 3 8 または 1 3 9 に記載の方法。
【 0 4 5 9 】
- 1 4 1 . 回収工程中、流出が約 5 0 m 秒間停止する、実施形態 1 3 8 ~ 1 4 0 のいずれか 1 つに記載の方法。
【 0 4 6 0 】
- 1 4 2 . 流体サンプルが血液サンプルであり、特異的結合メンバーを使用して望ましくない成分の少なくとも 1 種を除去することを含む、実施形態 1 2 1 ~ 1 4 1 のいずれか 1 つに記載の方法。 40
【 0 4 6 1 】
- 1 4 3 . 少なくとも 1 種の望ましくない成分が白血球細胞 (W B C) である、実施形態 1 4 2 の方法。
【 0 4 6 2 】
- 1 4 4 . 特異的結合メンバーが W B C に選択的に結合し、固体支持体に連結する、実施形態 1 4 3 の方法。
【 0 4 6 3 】
- 1 4 5 . 特異的結合メンバーが W B C に選択的に結合する抗体または抗体フラグメントである、実施形態 1 4 4 の方法。
【 0 4 6 4 】 50

146. 特異的結合メンバーがCD3、CD11b、CD14、CD17、CD31、CD45、CD50、CD53、CD63、CD69、CD81、CD84、CD102またはCD166に選択的に結合する抗体である、実施形態145の方法。

【0465】

147. 特異的結合メンバーがCD35および/またはCD50に選択的に結合する抗体である、実施形態146の方法。

【0466】

148. 血液サンプルと第2の特異的結合メンバーを接触させる工程をさらに含む、実施形態142～147のいずれか1つに記載の方法。

【0467】

149. 上記の第2の特異的結合メンバーがCD31、CD36、CD41、CD42(a、bまたはc)、CD51またはCD51/61に選択的に結合する抗体である、実施形態148の方法。

【0468】

150. 実施形態100または101に記載の自動システムを使用する流体サンプルの標的成分を富化し、そして分析する方法であって、

a) 濾過チャンバに流体サンプルを分注する工程、

b) 濾過チャンバの前方チャンバを通る流体サンプルの流体流動、および濾過チャンバの濾過後サブチャンバを通る溶液の流体流動をもたらす工程であって、流体サンプルの標的成分が前方チャンバに保持され、非標的成分が濾過後サブチャンバにフィルタを通して流れる、工程

c) 標的成分を標識する工程、および

d) 分析装置を使用して標識された標的成分を分析する工程

を含む、方法。

【0469】

151. 上方チャンバに流体流動をもたらすことを含む、実施形態150の方法。

【0470】

152. 標的成分が細胞または細胞小器官である、実施形態150または151に記載の方法。

【0471】

153. 細胞が有核細胞である、実施形態152の方法。

【0472】

154. 細胞が希少細胞である、実施形態152の方法。

【実施例】

【0473】

実施例1

赤血球細胞を血液サンプルから除去するためのフィルタの作製

各寸法(1.8cm×1.8cm×500ミクロン)のケイ素チップを使用し、約0.1ミクロン～約1000ミクロン、好ましくは約20～200ミクロン、好ましくは約1～10ミクロン、より好ましくは2.5～5ミクロンの寸法のスロットを有する1cm×1cm×50ミクロンの濾過面積を作製した。スロットは垂直に一直線であり、最大のテーパ状の角度が2%未満、好ましくは約0.5%未満であり、フィルタのスロットの隣接するカラム間のオフセット距離が1～500ミクロン、好ましくは5～30ミクロンである。

【0474】

製造は上記に参照した寸法を有するケイ素チップを得、誘電層を有するケイ素チップの頂部および底部を被覆することを含んだ。次いでチップの底部部分に沿った空洞を作製した。誘電層から適切な空洞パターンを除去した後、所望の厚さに達するまで、概ねパターンに従いケイ素チップをエッチングすることにより空洞を形成した。チップを再び酸化さ

10

20

30

40

50

せ、輪郭領域を被覆した。次いで、空洞と（空洞上に）実質的に一列のケイ素チップの頂部を被覆する誘電層から、フィルタパターンを除去した。ケイ素チップを、チップの頂部に沿って作製されたパターンから始め、ケイ素層が完全にエッチングされるまで、上記に参照した角度で（例えば、深掘 R I E または I C P プロセスを介して）エッチングした。次いで、頂部および底部から誘電層を除去した。空洞内の誘電層の除去により、スロットと呼ばれる貫通孔を作製した。限定されないがシリカまたはプラスチックなどのポリマーを含む材料を穿孔する（*bore though*）ように、レーザーカットを使用してこれらのスロットを作製することも可能である。

【0475】

実施例 2

微細加工されたフィルタの化学処理

実施例 1 に記載のように作製されたフィルタチップをオープンセラミック加熱プレートに載せ、酸素含有気体（例えば、空気）中で摂氏 800 度にて 2 時間加熱した。次いで加熱源を切り、チップを一晩ゆっくり冷却させる。これによりチップの表面上に熱により成長した層が生じる。

【0476】

窒化物層もフィルタ表面に堆積させることができる。最大約 900 の温度の反応器での低圧化学蒸着（LPCVD）によりチップの表面に酸化層が被覆される。堆積した膜は反応器に供給された供給源の気体間での化学反応の生成物である。典型的にはこのプロセスを基板の両側で同時に行い、 Si_3N_4 の層を形成する。

【0477】

実施例 3

ポリビニルピロリドン（PVP）およびポリビニルアルコール（PVA）フィルタ被膜

実施例 1 の方法により作製されたフィルタチップを PVP または PVA のいずれかで被覆した。PVP または PVA のいずれかでチップを被覆するために、チップを以下のように前処理した：フィルタチップを脱イオン水で洗浄した後、6 N の硝酸に浸漬させた。チップを摂氏 50 のシェーカーに 30 分間入れた。酸処置の後、チップを脱イオン水で洗浄した。

【0478】

PVP 被覆のために、チップを 0.25% のポリビニルピロリドン（K-30）に室温にて、チップを使用する状態になるまで浸漬させた。次いでチップを脱イオン水で洗浄し、圧縮空気により乾燥させた。

【0479】

PVA 被覆のために、酸処置および水で洗浄後に、被覆する前にチップを水中で保存した。0.25% PVA（Mn35, 000~50, 000）溶液を作製するために、摂氏 80 にゆっくり過熱し、静かに攪拌しながら、水に PVA を溶解させた。被覆するために、チップを加温した PVA 溶液に浸漬し、1~2 時間加熱した。次いで、チップを脱イオン水で洗浄し、圧縮空気により乾燥させた。

【0480】

実施例 4

ウシ血清アルブミン（BSA）フィルタ被膜

フィルタチップを BSA で被覆するために、チップを以下のように前処理した：フィルタチップを脱イオン水で洗浄した後、95% エタノールに 10 秒間、室温にて浸漬させ、次いで脱イオン水で再び洗浄した。

【0481】

次いで、チップを 2% BSA の PBS に室温にて 2 分間浸漬させた。次いでチップを脱イオン水で洗浄し、圧縮空気により乾燥させた。

【0482】

実施例 5

PEG フィルタ被膜

10

20

30

40

50

チップ表面に PEG を結合させるため、フィルタチップを DBE - 814 (ポリシロキサンを含有する PEG 溶液、Gel est 製、Morrisville, PA) の 5% 塩化メチレン溶液に浸漬させた。浸漬したチップを摂氏 70 度にて 3 時間、真空下において加熱した。インキュベーション後、PEG 被覆したチップを脱イオン水で洗浄し、圧縮空気により乾燥させた。

【0483】

実施例 6

母体血由来の有核胎児細胞を富化するためのプロセスフローチャート

図 13 は、母体血サンプル由来の胎児有核細胞を富化するためのプロセスフローチャートを示す。プロセス全体は以下の工程を含む：

- (1) 血液サンプルを遠心チューブに移すことができる。
- (2) サンプルは自動装置に添加する前に洗浄する必要はないが、洗浄してもよい。
- (3) プロセスはチューブ (各チューブ) 内の血液サンプルの容量が 10 ml (3 ~ 40 ml) で開始する。

【0484】

流体レベル検出工程を使用し、処理されるチューブ内の血液サンプルの正確な容量を決定する。

【0485】

チューブ内の血液サンプルに、ある容量の混合試薬 (例えば、実施例 6 に記載の試薬に等量) を添加する。

【0486】

0.5 時間 (0.1 ~ 2 時間)、溶液を回転 / 振とう / 激しく攪拌 / 混合させる。

【0487】

凝集した RBC がチューブの底部に沈殿することがきでるように、チューブの溶液を 30 分間 (0.1 ~ 2 時間) 直立に沈殿させる。この期間に同時に、磁場を印加し、磁性ビーズ (血液成分に結合し得る、または結合し得ない) をチューブの側部に集め、引き付ける。

【0488】

別の流体レベル検出工程を行い、「未凝集の」細胞懸濁液がチューブにどれくらいの容量存在するかを決定する。

【0489】

チューブから胎児細胞濾過チャンバ (または胎児細胞カセットプロセス) に適切な容量の液体を吸引する。

【0490】

胎児細胞濾過チャンバ / カセットでサンプルを 0.2 ~ 2 時間濾過する (濾過プロセスのさらなる詳細は以下の「実施例 8」に含まれる)。

【0491】

濾過カセットの頂部チャンバから溶液を抽出し、保存試験チューブに分注する。

【0492】

実施例 7

ケイ素膜濾過プロセスのためのプロセスフローチャート

図 14 は微細濾過プロセスを示す概略図を示す。簡単なプロセス工程は以下を含む：

- (1) 弁 B および D を閉じ、弁 A および C を開く。
- (2) 試験サンプル (「実施例 9」の手順の第 1 の工程からのもの) を 45 mL の充填リザーバーに入れる。
- (3) 保存リザーバーに充填したサンプルが微細加工されたフィルタを通して濾過されるように 1 時間廃棄物ポンプを動作させる。
- (4) 充填リザーバーに 1 ~ 10 mL の洗浄溶液を加える。
- (5) 弁 A を閉じ、弁 B を開く。
- (6) 底部サブチャンバを 1 ~ 5 mL で洗浄する。

10

20

30

40

50

- (7) 弁 C を閉じ、弁 D を開く。
- (8) カセットおよび濾過チャンバを 180 度回転させる。
- (9) 弁 B からフィルタを洗い流す。
- (10) 弁 D からの容量を収集する。

【0493】

実施例 8

母体血から胎児細胞を単離するための自動システムの使用

妊娠女性（妊娠 6 ~ 30 週期）の血液サンプル 10 ミリリットルを PBE でサンプルを希釈することにより洗浄し、470 x g で 6 分間（50 ~ 900 x g、3 ~ 20 分間）遠心分離した。上清を吸引して除去し、PBE をペレットに添加し、混合した。再び、サンプルを遠心分離し、上清を吸引し除去した。最終のペレットを PBE を含め元の容量に再懸濁させる。混合試薬（カルシウムおよびマグネシウムを含まない PBS であって以下を含む PBS : 5 ミリモルの EDTA、2 % デキストラン（分子量 70 ~ 200 キロダルトン）、グリコホリン A に対して IgM 抗体 1 ミリリットル当たり 0.05 マイクログラム（0.01 ~ 数 μ g）およびおよそ $1 \sim 10 \times 10^9$ の予め被覆された磁性ビーズ）10 ミリリットルをサンプルチューブに手動で添加する。

【0494】

希少細胞単離自動システムは自動処理工程のための制御回路および 110 ボルトのコンセントへのプラグを有する。サンプルを含有するチューブを希少細胞単離自動システムのラックに載せる。チューブは自動システムのラックで 30 分間（5 ~ 120 分間）、自動で回転する。次いで、チューブを直立に静置させ、その間に磁場を有する第 2 のラックがチューブラックの隣に自動的に位置づけられる。限定されないが、電磁場を含む他の種類の磁場であることも可能である。凝集した RBC をチューブの底部に沈殿させることができ、WBC 磁性ビーズ凝集物を磁石に隣接した各チューブの側部に引き付けるように、チューブを 30 分間（5 ~ 120 分間）直立の位置で保持する。細胞を沈殿させた後、上清の容量を、光透過 - 光センサー透明度測定デバイスを使用して自動システムにより決定する。

【0495】

透明度測定デバイスは、サンプルチューブに集束することができる照合された光源（バーの数がチューブの数に対応）をそれぞれが有するバーと、チューブの反対側に位置づけられる光検出器からなる。光源は赤外線（780 ナノメートル）の光を放射するレーザー光線を使用し、3 ミリワットより強い強度を有する。光源からの光をサンプルチューブを通して集束し、サンプルチューブのもう一方の側で、強度測定デバイスを有する光検出器がサンプルを通過した光量を記録する（レーザー出力測定）。低ワット数のレーザーを有するバーと光検出器は、チューブの底部の位置から上方に移動する。各レーザーが、対応するチューブ内の凝集した細胞と最初に接触する場合、レーザー出力測定をゼロとする。所与のチューブの強度の測定値が出発点の値（threshold value）より上に上昇し始める時、バーの垂直な動きが止まる。次いでバーを移動させ、透過した光と出発点の値が等しい正確な垂直点を見つける。このようにして、凝集された細胞 / 細胞上清の界面の垂直点の位置を決定する。この位置が決定すると、液体処理自動濾過ユニットがプレセットの場所に移動し、容量検出ルーティンを使用し、バーの位置（界面の位置に対応）を見つける。このデータを使用して、液体処理により正確に液体容器から上清を除去する。上清は濾過ユニットの充填リザーバーに直接自動的に分注される。

【0496】

希少細胞単離自動システムにより行われた自動分離プロセスの以下の説明では、図 23 に示すように濾過ユニット（濾過チャンバ、充填リザーバーならびに関連のポートおよび弁）を使用する。この設計では、濾過チャンバは濾過ユニット内で 180 度以上回転することができる。

【0497】

濾過チャンバは 1 枚のフィルタ（603）で分離された前方チャンバ（604）および

10

20

30

40

50

濾過後サブチャンバ(605)を備える。微細加工されたフィルタは1.8cm×1.8cmであり、およそ1cm×1cmの濾過面積を有する。フィルタは図2に示すように並列構成に配列されたおよそ94,000個のスロットを有し、スロットが1~2度のテーパーおよび3ミクロン×100ミクロンの寸法を各寸法において10%のばらつき内で有する。フィルタのスロットは1~10ミクロン×10~500ミクロンの寸法を有し、標的に応じて0.2~10度の垂直なテーパーを有し得る。フィルタの厚さは50ミクロン(10~200ミクロンの範囲)である。フィルタは2つのピースの濾過チャンバに位置づけられ、頂部半分(前方チャンバ)がおよそ0.5ミリリットルの容量の、上方にテーパー状になるおよそ矩形の濾過前方チャンバである。底部の濾過後サブチャンバもおよそ円形であり、底部に向かってテーパー状になり、およそ0.5ミリリットルの容量を有する。フィルタは基本的に(頂部)前方チャンバの底部領域全体と、基本的に(底部)濾過後サブチャンバの頂部領域全体を被覆する。

10

【0498】

濾過チャンバに加え、濾過ユニットは、充填リザーバー(610)を有する「フレーム」、充填リザーバーから濾過チャンバにサンプルの流動を制御する弁(「弁A」、606)および廃棄物および濾過されたサンプルの流出のための分離ポート(廃棄物ポート、634)および富化した希少細胞の収集のための分離ポート(収集ポート、635)を備える。濾過後サブチャンバ(605)は緩衝液の添加に使用することができる側部ポート(632)および廃棄物(または濾過されたサンプル)の流出のための濾過中に廃棄物ポートと係合することができる出口を備える。前方チャンバ(604)は、濾過中にサンプル充填弁(弁A、606)と係合することができ、富化された細胞の収集中に収集ポート(635)と係合することができる入口を備える。自動システムの動作中、濾過チャンバ(前方チャンバ(604)、濾過後サブチャンバ(605)および側部ポート(632)を含む)が濾過ユニットのフレームに位置する。

20

【0499】

濾過中、弁Aを開き、濾過後サブチャンバの出口を廃棄物ポートと一列にし、濾過チャンバを通して充填リザーバーからのサンプルを濾過処理するための、および廃棄物への流路を可能にする。シリンジポンプが、プロセス工程に応じて、1時間当たり約10~500ミリリットルの流速でチャンバを通り液体を吸引する。

30

【0500】

各チューブから濾過ユニットの充填リザーバーに適切な容量の上清を分注する前に、濾過ユニットの側方ポート(632)および廃棄物ポート(634)を閉じ、弁A(606)を開く(図23を参照のこと)。(濾過ユニットが充填/濾過処理位置にあるとき、濾過チャンバは収集ポート(635)と係合しない)。濾過ユニットの側方ポートを開き、緩衝液がサンプルリザーバーの底部に達するまで自動濾過ユニットを側方ポートからPBEで充填する。次いで側方ポートを閉じ、血液サンプルの上清を充填リザーバーに入れる。

【0501】

希少細胞単離自動システムは清澄度において同時にいくつものサンプルを分離することができるが、以下の分離プロセスの説明では単一のサンプルの濾過について説明する。サンプルを濾過するために、濾過ユニットの廃棄物ポート(634)を開き、チューブを通して廃棄物ポートに接続されたシリンジポンプを使用して、サンプルの上清を濾過チャンバに、および濾過チャンバを通して吸引する。サンプルがチャンバを通る場合、より大きな細胞が頂部のチャンバ(前方チャンバ)に滞留し、より小さな細胞がフィルタを通り下部チャンバ(濾過後サブチャンバ)に進んだ後、廃棄ポートを通り廃棄物に進む。濾過処理は1時間当たりおよそ2~100ミリリットルの速度で行われる。

40

【0502】

サンプルが濾過チャンバを通過した後(典型的には濾過処理の30分~2時間後)、3~5ミリリットルのPBEを充填リザーバーに添加し(弁Aは開口したままである)、廃棄物ポートに接続されたシリンジポンプを使用して濾過チャンバを通して吸引し、前方チ

50

チャンバを洗浄し、全ての小さな細胞が洗い流されたことを目視により確認する。

【0503】

次いで、弁A(606)を閉じ、側方ポート(632)を開く。5~10ミリリットルの緩衝液を、廃棄物ポート(634)に取り付けたチューブに接続したシリンジポンプを使用して側方ポート(632)から添加し、底部の濾過後サブチャンバを洗浄する。残りの細胞を濾過後サブチャンバ(605)から洗浄した後、底部(濾過後)サブチャンバをさらに側方ポート(632)を通して空気を押し出すことにより洗浄する。

【0504】

次いで、フィルタカートリッジを、前方チャンバ(604)が濾過後サブチャンバ(605)の下になるように濾過ユニット内でおよそ180度回転させる。チャンバを収集位置に回転させるとき、濾過後サブチャンバの出口を廃棄物ポートから離し、濾過後サブチャンバが前方チャンバの上に位置づけられるようにするとき、「出口」は反転した濾過チャンバの頂部に位置づけられるが、濾過ユニットの任意の開口部を係合しないため、遮断される。これが起こった場合、前方チャンバが反転した濾過ユニットの底部に回転し、そうして前方チャンバの入口が弁Aから離れ、代わりに濾過の自動濾過ユニットの底部で収集ポートに係合する。この濾過処理の位置から収集位置への回転の間、側方ポートは位置を変化させない。濾過チャンバの回転の軸に沿って整列し、濾過後サブチャンバの一部および機能的ポートはそのままである。この回転の結果として、濾過チャンバは収集位置にある。したがって、収集位置では、側方ポートを有するがこの時その出口を閉じられている濾過後サブチャンバは前方チャンバの上にある。前方チャンバの「入口」は収集ポートと一列となり、開口している。

10

20

【0505】

およそ2ミリリットルの緩衝液を側方ポートを通して濾過チャンバにポンプで送り、前方チャンバに残る細胞を収集する。細胞をサンプル収集ポートの部位で濾過ユニットに取り付けたバイアルに、またはサンプル収集ポートからつながるチューブを介して収集し、サンプルを収集チューブに分注する。およそ2ミリリットルの追加のPBEとおよそ2~5ミリリットルの空気をフィルタの残りの細胞を除去するために側方ポートを通して、そして収集バイアルにポンプで送る。

【0506】

富化された希少細胞を顕微鏡、または多くのアッセイのうちのいずれかを使用して分析することができ、または保存することができ、あるいは培養液に入れることができる。

30

【0507】

実施例9

磁性粒子捕捉のための改良された磁石構成

磁性粒子の捕捉を使用する流体サンプルからの細胞などの成分をチューブまたは他の容器の一部に分離する効率を改善するために、いくつかの磁石構成を試験した。

【0508】

9/16 x 1.25 x 1/8インチの寸法の磁石(Forcefield(Fort Collins, Co)NdFeBブロック、品番27、ニッケルプレート、最大残留磁束密度12,100ガウス、最大エネルギー積35MGOe)を使用し、磁場強度を試験した。これらの実験において、最も強力な磁場を使用して、白血球細胞と特異的に結合する抗体で被覆された磁性ビーズを捕捉し、市販の磁気細胞分離自動濾過ユニットMPC-1(Dynal, Brown Deer, WI)に比べ血液サンプルからの白血球細胞の除去を改善することができた。

40

【0509】

磁石は、図9に概略的に示すように、いくつかの構成および配向で、50ミリリットルチューブを保持するよう設計されたポリプロピレンスタンドに取り付けられた。チューブの右、中央および左の磁場をガウスメーター(Job Master Magnets(Randalstown, MD)型GM1、プローブ型PT-70、品番373を使用)により測定した。

50

【0510】

実施例10

細胞分析のための微細加工されたフィルタを用いた全血白血球の単離

白血球は免疫系の健全性における診断情報を担持し、フローサイトメトリーおよび他の細胞分析器により分析される第1のサンプルである。フローサイロメーター分析のための全血サンプルを調製するとき、白血球をはじめに蛍光標識したモノクローナル抗体で染色し、次いで標識された白血球を赤血球から分離する。従来的には、血液細胞の分離は密度勾配遠心分離により行われ、最近では赤血球の溶解が一般的に使用される方法になりつつある。

【0511】

FICOLL (商標) HYPAQUE (商標) 密度勾配遠心分離は血液の他の要素から単核細胞間の密度差を利用し、この分離を行う (Boyum A. Scand J Clin Lab Invest (1968) 21 (Suppl 97): 77-89)。異なる細胞集団を密度に基づいて異なる層の遠心分離後にフィコール溶液に分布させる。したがって、単核細胞は、その特定の層に細胞を回収することによって精製され得る。クエン酸ナトリウムを用いた BD Vacutainer (登録商標) (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) CPTM Cell Preparation Tube は、FICOLL HYPAQUE 法を簡略化し、クエン酸抗凝血剤を含有する血液収集チューブおよび FICOLL HYPAQUE 密度液ならびに2つの液体を分離するポリエステルゲルバリアを組み合わせる。しかし、内部での試験では白血球の7%の量が細心の遠心分離工程の間でも失われ (データは図示せず)、単核細胞帯がサンプル源または遠心分離プロセスにより破壊されている可能性があり、したがって所望の純度はCPTチューブを用いてであっても得られないことを示している (クエン酸ナトリウム含有の BD Vacutainer (登録商標) CPT (商標) Cell Preparation Tube の製品情報)。

【0512】

全血溶解法が、多くのサンプル調製プロトコールにおける密度勾配分離に取って代わっている。市販の溶解試薬が多く存在するが、BD FACS 溶解溶液は、溶解洗浄および溶解非洗浄アッセイの両方に使用される標準的な試薬の1つである。しかし、白血球を単離するために使用するとき溶解試薬が人為的な結果を生じ得ることが報告されている (Maceyら, Cytometry (1999) 38: 153-160)。赤血球溶解後の遊離ヘモグロビンの存在が、特定のサイトカインを放出するよう刺激することにより白血球の性質を変化させる可能性もある (McFaulら, Blood (1994) 84: 3175-3181)。

【0513】

膜フィルタはサイズに基づき粒子または分子を除去することができるとしてサンプルの浄化に広く適用される。しかし、伝統的なフィルタ膜は均一で正確に制御された孔のサイズではなく、そのためこの分離の分解能は限定されており、定量的結果をもたらすに過ぎない。伝統的なフィルタを用いたフィルタに保持された粒子は高収率で回収されることはまれにしかない。例えば、全血からRNAの調製に使用されるフィルタ膜はフィルタの頂部に白血球を保持するが、赤血球は通過させる。しかし、白血球が再収集されることなくフィルタ上で溶解し、RNAはフィルタ膜に保持される (Applied Biosystems, Instruction Manual: LeukoLOCK (商標) Total RNA Isolation System; Life Technologies)。最近では、単核細胞富化のためのフィルタ系技術が市場に出ているが、単核細胞の回収は70%に過ぎない (PALL Medical. Application Note: Performance Characterization of the Purecell (商標) Select System for Enrichment of Mononuclear Cells from Human Whole Blood; Pall Medical - Cell Therapy)。

10

20

30

40

50

【0514】

白血球から完全に赤血球を除去し、95%より高い、亜集団のバイアスのない高収率で白血球を回収する細胞分析のためのサンプル調製技術を有することが望ましい。フローサイトメリー分析用の白血球細胞を調製するための微細加工されたケイ素フィルタデバイスの性能特性の評価を示す (Yura, Whole Blood Leukocytes Isolation with Microfabricated Filter for Cell Analysis. Manuscript submitted to Cytometry)。

【0515】

材料および方法

血液サンプル

血液サンプルを健常なドナーからBD血液ドナープログラムを通して得た。全てのサンプルをK₃EDTA (Vacutainer; Becton Dickinson) を用いて凝血を抑制した。他に異なる明示がされない限り、サンプルは静脈切開後4時間以内に処理された。

【0516】

濾過、溶解/非洗浄および溶解/洗浄調製物

フィルタのチップおよびカートリッジをAVIVA Biosciences (San Diego, CA) により製造した。微細加工されたフィルタをチップ上に微細エッチングされたチャンネルを有するケイ素ウエハーから作製した。フィルタカートリッジは、図25に示すように、サンプルリザーバー、洗浄リザーバー、およびカートリッジの内外の液体を制御するシリンジポンプに接続される弁を有する。健常ドナーの全血からの白血球単離の性能において、2つのバッチの40のデバイス(第1のバッチの30および第2のバッチの10)を評価した。濾過後の白血球および亜集団のおもな回収、濾過プロセスの堅牢性、および濾過後の細胞持続可能性を注意深く評価した。カートリッジは単回使用が推奨されるが、試行の間の洗浄で連続試行において再利用可能であることがわかった。(再利用は汚染を回避するため同じドナーの血液に限定された)。

【0517】

カートリッジは最初に専有洗浄緩衝液のAVI Wash-Pで感作させ、次いで希釈した全血(CD45-PerCPで標識した10 μ lもしくは50 μ lまたは250 μ lに希釈されたMultitest(商標)試薬)を上部フィルタチャンバに導入した。緩衝液またはサンプル溶液をデバイスの下部出口チャンバに取り付けられたシリンジポンプによりフィルタのチップを通して0.33または0.18ml/分のいずれかの速度で吸引した。この後に2つの洗浄工程、フィルタの頂部を洗浄およびフィルタの底部を洗浄が続いた。最終的に、2mlの溶出緩衝液をフィルタカートリッジに添加し、3mlシリンジを使用し、フィルタ膜の頂部に保持された白血球を収集した(図32)。収集された白血球を、フローサイトメーター分析用にBD Trucount (商標) Absolute Counting Tube (品番340334)に移した。

【0518】

各血液サンプルも、総白血球数(WBC)、赤血球数(RBC)、およびリンパ球、単球および顆粒球の割合を得るためにABX Micros 60 Hematology Analyzer (Horiba ABX) で試験した。ABXの計数を、濾過デバイスからの総白血球およびその3つの亜集団の回収を評価するときに参照数として使用した。

【0519】

各血液サンプル50 μ lも溶解非洗浄法[CD45-PerCP (BD Biosciences, San Jose, CA, 品番340665)で染色した細胞またはBD Multitest CD3 FITC/CD16+56 PE/CD45 PerCP/CD19 APC試薬(BD Biosciences、品番340500、CD3クローンSK7、CD16クローンB73.1、CD56クローンNCAM16.2、CD45クローン2D1、およびCD19クローンSJ25C1)]およびBD Biosc

10

20

30

40

50

iencesウェブサイト (<http://www.bdbiosciences.com/support/resources/flowcytometry/index.jsp#protocols>) に公開されたプロトコールに従った溶解洗浄法に従い、1×FACS溶解 (BD Biosciences, 品番349202) 溶液を用いて処理した。溶解非洗浄サンプルを染色し、Trucount Absolute Counting Tubeで溶解し、溶解洗浄サンプルを洗浄後 Counting Tubeに移した。

【0520】

細胞生存性およびアポトーシス試験

濾過後の白血球生存性をBD (商標) Cell Viability Kit (BD Biosciences, 品番349480) を用いて試験した。アポトーシス試験 (Annexin V FITC, BD Biosciences, 品番556547) も細胞の持続可能性を試験するために濾過から回収した白血球に行われた。

【0521】

フローサイトメーター分析

サンプルを、BD FACSComp (商標) およびBD CellQuest (商標) Proソフトウェアを備えたBecton Dickinson FACSCalibur (商標) フローサイトメーターで分析した。サイトメーターは、BD Calibrите (商標) Calibrите 3 (品番340486) およびAPC (品番340487) ビーズを用いて、サイトメーターの構成および補償 (表1) が溶解非洗浄サンプルおよび溶解洗浄サンプルの個々に対して自動的に設定されるFACSCompプログラムを試行することにより毎日較正された。溶解洗浄構成を濾過したサンプルに適用した。

【表1】

表1 サイトメーター構成および補償

レーザー	チャンネル	検出器 電圧	検出器 増幅	様式
青色レーザー 488nm	FSC	E00	2.00	直線
	SSC	346	1.00	直線
	FL1 (FITC)	649	1.00	対数
	FL2 (PE)	734	1.00	対数
	FL3 (PerCP)	610	1.00	対数
赤色レーザー 635nm	FL4 (APC)	591		対数

FL1-2.1%FL2, FL2-25.4%FL1, FL2-0.0%FL3, FL3-19.2%FL2, FL3-0.8%FL4, FL4-50.4%FL3

【0522】

サイトメーターの4つ蛍光チャンネルをFL1 FITC、FL2 PE、FL3 PerCP、およびFL4 APCとして明記する。閾値をFL3 (PerCP) に設定した。他に異なる明記がされない限り、合計1万のイベントを各試験毎に獲得した。カウンティングビーズはFL3の強い蛍光シグナルでゲーティングし、白血球集団は同様にFL3のCD45+イベントでゲーティングした。リンパ球、単球、および顆粒球は白血球の「娘細胞集団」であり、側方散乱および蛍光に基づきゲーティングした。T、B、およびNK細胞はリンパ球の「娘細胞集団」であり、特異的抗体-蛍光結合標識に基づきさらにゲーティングした。Multitest試薬で染色されたサンプルにおいて、T細胞をCD3+リンパ球として定義し、NK細胞をCD16+CD56+リンパ球として定義し、B細胞はCD19+CD3-リンパ球であった (図27a)。全てのデータをBD FACS Diva (商標) ソフトウェアで分析した。絶対細胞数を以下のように細胞イベントとTrucountビーズイベントを比較することにより得た：

1 μl 当たりの細胞 = 細胞イベント数 × チューブ当たりのビーズ数 / ビーズイベント数 × サンプル容量 (μl)。

10

20

30

40

50

【0523】

結果

濾過後の白血球回収と全血溶解法の比較

微細加工されたフィルタを用いた全血からの白血球の単離は効率よく赤血球細胞を除去し、これはフローサイトメーター分析用のサンプルを浄化している。図26は、溶解非洗浄手順、溶解洗浄手順、および濾過手順に従い調製された同じ血液サンプルに対するFSCとSSC、およびFL3とSSCの点プロットを示す。溶解非洗浄のサンプルは、獲得した総イベントの91%を表す点プロットに見ることができるように、実質的に赤血球細胞片に汚染されている。溶解洗浄のサンプルでは、赤血球細胞片が遠心分離により除去され、点プロットに示されるイベントの13%のみが細胞片由来である。濾過プロセスから回収された白血球は、総イベントの4%と、バックグランド粒子の割合が最も小さく、赤血球細胞が効率よく白血球から分離されていることを示す。

10

【0524】

濾過プロセスから、白血球細胞の減少が全くないか最小である結果となった。各サンプルの白血球数をBD TruCount内部標準カウンティングビーズを参照して算出し、全体の回収は、この結果と、ABX血液分析器から得られた完全な血液数の比に基づいた。図27は、総白血球、3つの主要白血球集団および3つのリンパ球亜集団(T、B、およびNK細胞)に対する回収結果の比較を示す。10例の異なるドナーの血液の白血球回収において、10個のフィルタカートリッジの合計を試験し、各サンプルを3連フィルタにかけた。その最適作業条件(表2に記載)にて、フィルタはLNWの100.2%±6.0%およびLWの86.2%±7.8%に比べ総白血球の平均回収98.6%±4.4%を得た。濾過後の細胞の回収は、血液溶解法に比べリンパ球、単球、および顆粒球の間でバイアスはなかった。フィルタの第2のバッチの評価の間、新鮮な血液サンプルをMultiTest試薬で染色し、リンパ球、T、B、およびNK細胞の亜集団の回収を検討した。5つのサンプル、5つのフィルタ、および各フィルタを通して3連試行する各サンプルを用いて、T細胞の106%±5.6%の回収、NK細胞の98.5%±1.9%の回収、およびB細胞の83.5%±1.2%の回収が観察された。NK細胞およびB細胞の回収の偏差が大きいのは血液中のこれらの細胞の割合が小さく、サンプル数が少ないことによると考えられる。

20

【表2】

30

表2 種々の動作条件での濾過後の白血球回収の比較

細胞負荷	流速	
	0.18ml/分	0.33ml/分
10ul (51.1±7.5)×1000個の細胞	0.98±0.04	0.92±0.07
50ul (350±14.1)×1000個の細胞	0.75±0.18	0.35±0.15

40

【0525】

濾過後の細胞生存性および持続可能性

フィルタから回収された白血球の生存性を試験し、塩化アンモニウムで溶解させた全血を含む白血球のものと比較した。FACS溶解液はホルムアルデヒドを含有することにより使用されなかったため、白血球を赤血球溶解中に固定する。両方の場合、赤血球を除去した後白血球の95%が生存したままであり、白血球が死滅していない(図28a)。細胞の濾過の耐容性をさらに試験するために、ヨウ化プロビジウム(PI)と組み合わせ

50

た F I T C A n n e x i n V で細胞染色した。A n n e x i n V の陽性は血漿膜の欠失に先行し、これは細胞死 (P I 陽性) につながるアポトーシスの初期段階を示す。結果 (図 2 8 b) は、血液が採血 1 時間以内で濾過されるときは、濾過から回収された細胞の 9 5 % がアポトーシスの兆候を示さず、採血後 8 時間の血液に濾過が行われるときは、回収された細胞のなお 9 0 % が健常なままであることを示す。

【 0 5 2 6 】

動作条件の最適化

最も良い回収率を得るために、サンプル濾過手順をさらに詳細に調整した。全て血液細胞を「吸引」モードに設定したシリンジポンプを用いてフィルタを通して吸引し、2つの異なるポンプ速度を試験した。表 1 に示すように、流速の高い (0 . 3 3 m l / 分) 白血球の回収は、流速の低い (0 . 1 8 m l / 分) ものより低く、細胞数を多くフィルタに充填したときに効果はより明らかであった。高い流速時の吸引力は白血球に物理的な変形を誘導し、フィルタのスロットを通過させるのに十分な圧を生じる。ポンプを低い流速 (0 . 1 8 m l / 分) に設定したときでも、B D フローサイトメーターアッセイに必要な典型的な容量である、平均 3 5 0 , 0 0 0 個の白血球を含む全血 5 0 μ l がフィルタを通して吸引され、平均 5 0 , 0 0 0 個の細胞を含む全血 1 0 μ l を適用したときと同じくらい白血球の回収は良くなかった。これは、試験した構成において、フィルタが過剰時に細胞減少につながる限界保持能を有し得ることを示唆する。表 1 に示される結果は各条件において少なくとも 5 つのフィルタカートリッジから得られた試験の平均であった。フィルタのサイズ、流速、および全体の回収の最適な関係を決定するために、さらなる試験を行う。

【 0 5 2 7 】

赤血球溶解に依存する白血球単離方法は迅速で簡便であるが、F A C S 溶解液が細胞を固定するとして生細胞を必要とする場合、分析の選択肢が制限される可能性があり、インキュベーション時間を注意深く制御しない場合、塩化アンモニウム溶解がサンプル分解を生じる可能性がある。それゆえ、フローサイトメリー適用のための代替のサンプル調製方法があることが望ましい。本明細書において評価される微細加工されたフィルタは、白血球垂集団のバイアスを導入することなく、白血球回収の高い、迅速な簡易の全血分離を行うことができる。フィルタは赤血球、血小板、血漿タンパク質、および未結合の染色試薬を除去する。この緩やかな濾過プロセスは白血球に任意の明らかな損傷を与えることなく、サイトメリー分析のための非常にはっきりと染色された白血球を生成する。現在のフィルタカートリッジはフローアッセイに典型的に必要な細胞数を処理することができる。フローサイトメリーのサンプル調製におけるその適用は、方法の標準化に役立ち、労力および材料を削減し、手動により動作を最小限にする。

【 0 5 2 8 】

全血中の他の成分からの白血球の単離は、フローサイトメリー細胞分析において非常に重要な工程である。一般に使用される方法である、F I C O L L H Y P A Q U E 密度勾配遠心分離および赤血球溶解は、用途の制限が挙げられている。本明細書において、血液分離における微細加工された濾過デバイスの評価結果を報告し、これによりフローサイトメリー分析のための染色された浄化された生存白血球を調製する新しい方法を提供することが可能となる。本明細書において評価された微細加工されたフィルタは、白血球垂集団のバイアスを導入することなく、白血球回収の高い、迅速で簡易な全血分離を行うことを可能にする。フィルタは赤血球、血小板、血漿タンパク質、および未結合の染色試薬を除去する。本明細書に報告された結果は、フローの標準化および簡潔な動作を可能にするサンプル調製方法とともにフローサイトメリー利用者に恩恵をもたらすであろう。さらなる情報については、Y u , W a r n e r , W a r n e r , R e c k t e n w a l d , Y a m a n i s h i , G u i a , a n d G h e t t i . W h o l e b l o o d l e u k o c y t e s i s o l a t i o n w i t h m i c r o f a b r i c a t e d f i l t e r f o r c e l l a n a l y s i s . C y t o m e t r y A , 7 9 A (1 2) : 1 0 0 9 - 1 0 1 5 , 2 0 1 1 を参照のこと。

【 0 5 2 9 】

実施例 1 1

逆並行流動の濾過チャンバを使用する血液サンプルから有核細胞を分離する方法

2つの個別の筐体部分によりフィルタの両側に形成された前方チャンバおよび濾過後サブチャンバを有する濾過チャンバの例示的实施形態を図33に示す。

【0530】

前方チャンバの深さは400 μm である。約200 μm 以下の深さの前方チャンバの実施形態も検討する。いくつかの実施形態において、2つの筐体部分はレーザーにより接合され得る。いくつかの実施形態において、液体接着剤を使用し、2つの筐体部分を接合することができる。頂部の筐体部分は34.0mm \times 7.9mmであり、流入側(小さいポート)が四角形であり、流出側(大きい収集ウェル)が円形である。流出受入ウェルは300 μL を保持し、150 \times 150mm²の濾過面積を有し、前方チャンバはおよそ65 \pm 6 μL の液体を保持する(接着剤の厚さに依存)。前方チャンバの深さが200 μm である実施形態において、容量は約30 μL であってよい。流入ポートは、2.4mmの標的を有し、この標的が1.1mmポートにじょうご状に小さくなる(19個のゲージチューブもしくはピペットチップまたはロボットインジェクターチップに係合し、封止する)。

10

【0531】

濾過後サブチャンバの深さは、流入のための右側の500 μm に始まり、(廃棄細胞を含有する滲出液の濃度を増加させるために部分的に補正する)流出のための左側の700 μm で終わる、非均一なものである。底部筐体部分の外周は、デバイスに血液がオーバーフローする事故または流入ポートの外側に血液が分注される事故の場合に使用時の計器の汚染を防ぐことを意味する背の高いウェルを含有する。オーバーフローのウェルの最大寸法は37.7mm \times 11.6mmである。ポートは1.1mm径(19個のゲージチューブ)であるパイプに係合し、封止するサイズであり、約29.1mmの間隔(縮小後約29.0mm)に配置される。濾過後サブチャンバは前方チャンバより約400 μm 広く、筐体の部分の間に任意の接着剤の残りを保持する。頂部の筐体部分は底部の筐体部分と、水平の接触面だけでなく、周囲が約1mmより狭く、各角部にほとんど余分な空間が無い見かけ上垂直な側部壁と接触する外周とも係合する。

20

【0532】

血液サンプルから有核細胞を分離する方法

血液細胞が約10 μm 径であり、全血の約45%を構成するため、400 μm の深さが、細胞を25~30個の細胞の深さ(血小板は計数しない)に積み上げることが可能にするはずである。試験において、濾過による変化のほとんどは濾過の最初の115秒間に起こる。続く試験において、2つの濾過処理モードを使用する：

30

1. 50 μL の血液を注入後、細胞に対して清潔な媒体を少なくとも5容量(250~300 μL)通過させ、血漿、血小板、および赤血球細胞を洗い流し、次いで150 μL の媒体中で回収する。

2. チャンバを清潔な媒体で予め充填した後、フィルタを通してゆっくり連続的に100 μL の血液を進め、さらなる容量の清潔な媒体を追加する一方で、フィルタ下方から陽圧の小さいパルスを繰り返し印加し、保持した細胞を流出受入チャンバに向かって流し続ける。

40

【0533】

濾過処理の第2のモードにおいて、パルス幅、パルス高、パルスプロファイル、および負荷時間を、赤血球細胞、血漿、および血小板を最大限に除去する一方で損傷なく白血球および希少細胞を回収するよう最適化する。

【表 3】

表 3 細胞を分離し、かつ標識するための例示的流動速度

工程	説明	ポンプ1			ポンプ2			ポンプ3			ポンプ4		ポンプ5	
		緩衝液 μL	μL/分	秒	廃棄物 μL	μL/分	秒	供給 μL	μL/分	秒	回収 (雰囲気) μL	μL/分	濾過 (縦一列) μL	μL/分
1	フィルタを血液で充填	150	900	10	167	1000	10	20	120	10	3	20	17	100
2	緩衝液で血液を洗浄	2250	900	150	2500	1000	150	250	100	150	0	0	250	100
3	バイオマーカーを 添加 (任意)	0	0	0	50	100	30	-150	250	-36	-200	150	50	100
4	充填時間 (条件付き)	0	0	0	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0
5	バイオマーカーを 洗浄 (条件付き)	2250	900	150	2500	1000	150	250	100	150	0	0	250	100
6	細胞を浮遊	5	5000	0	0	5000	0	0	1000	0	5	1000	-5	0
7	回収	35	900	2	35	900	2	195	5000	2	195	5000	0	0

なお、太字は制御された要素であり、太字でないものは生成された (算出された) 要素である。

NB:

ポンプ 5 = ポンプ 2 - ポンプ 1
ポンプ 4 = ポンプ 5 - ポンプ 3

10

20

30

40

【 0 5 3 4 】

実施例 1 2

血液サンプルから細胞を分離し、そして分析する自動システム

フローサイトメーターに直接接続した濾過チャンバを有する自動システムの例示的実施形態を図 3 5 に示す。

【 0 5 3 5 】

50

サイホンは、受動ポンプとして環境圧を使用してサンプル細胞、好ましくは全血の10倍～100倍希釈液、または任意の他の混合細胞サンプルを取り込む。

【0536】

ポンプ1、2、および3は濾過速度を生じる流速をプログラム可能な計量ポンプである。ポンプ4は標準のフローサイトメーターの流動の集中（流動の集束）を標準的に生じるポンプである。フローセルは、その遠位端で真空圧によりポンプ操作される。

【0537】

濾過チャンバには2つのフィルタがあり、1つ目がプレフィルタ（セルフローチャンバの上方）であり、このフィルタは任意のフィルタおよび好ましくは本方法の非接着面で被覆される市販のSSフィルタであってよく、サンプルが流動する場合に濾過処理チャンバを横切り溶液の流動を方向づけるようにのみ作用する。第2のフィルタは本発明において記載されるスロット型フィルタであり、これも細胞に接着しないよう被覆される。血漿、赤血球細胞、血小板および未結合のマーカ-は、廃棄物ポンプによりスロットフィルタを通り除去される。

10

【0538】

実施例13

高洗浄能濾過チャンバ

高洗浄能濾過チャンバの例示的实施形態を図36に示す。高洗浄能濾過チャンバは、赤血球が底部フィルタを通過するときに洗い流されるだけでなく、上部から洗浄緩衝液を添加しフィルタを通して多くの細胞を押し出し、そして回収チャンバへの供給ポンプからの高い流速を可能にする、2つの洗浄緩衝液入口点（1および3）を有する。この実施形態において、ポンプ2 - ポンプ1の速度差と0の間で交互するポンプ3と協働して、ポンプ1および2が同じ速度で破棄物流出の高い方に交互するパルス流動が好ましい。ポンプ3が0の流速であるとき、ポンプ1および2は同じ速度で流れる。これは、保持した細胞が血漿、血小板、赤血球、未結合マーカ-、可溶性抗原などの分解物になると、供給ポンプ4が保持した細胞をフィルタを横切り、そして回収チャンバに間欠的におよび徐々に押し出すことを可能にする。この配列には2つのフィルタがあり、底部フィルタはスロット型のフィルタであり、頂部フィルタは低い流動状態の中で平坦度を保持し、必要に応じて非粘着面で被覆することができる任意の一般的なフィルタであってよい。頂部フィルタは、例えば、およそ0.05～2ミクロン径の任意の形状の孔を有する鋼鉄シートまたはポリイミドシートであってよい。濾過中その平坦度を維持するために、頂部フィルタをフィルタの上方の緩衝液分布チャンバの構造により支えることができる。

20

30

【0539】

回収ポンプは架空（雰囲気圧）のものであり、その流速はポンプ4 - ポンプ2 + ポンプ1 + ポンプ3により算出することができる。濾過処理ポンプ（底部のスロット型フィルタ）は架空（縦一列に作用する他のポンプにより制御）のものであり、その流速はポンプ2 - ポンプ1により算出することができる。

【0540】

実施例14

縦一列の2つの濾過チャンバ

縦一列の2つの濾過チャンバの例示的实施形態を図37に示す。2つの濾過チャンバは互いに、すなわち前方チャンバを重複する2つのフィルタ間で流体接続状態にある。

40

【0541】

実施例15

多数の出力ポートを有する濾過チャンバ

多数の出力ポートを有する濾過チャンバの例示的实施形態を図38に示す。各フィルタ毎にサイズが大きくなるスロット幅を有する縦一列の2つ以上のフィルタを濾過チャンバで囲むことができる。頂部チャンバを通して流路に沿って連続して大きな細胞を除去するために、底部に多数の出力ポートを有する単一の長いフィルタを使用することも可能であり得る。

50

【0542】

実施例16

ホールウエハーフィルタ膜からのフィルタの作製

以下の工程を使用して、ケイ素ウエハーを犠牲担体として作用するガラスウエハーと接合し、次いで薄くし、マスクし、エッチングし、ウエハーの表面全体に連続フィルタを生成する。

【0543】

接合化合物を犠牲ガラスウエハー上に均一な厚さにスピンコーティングし、ケイ素ウエハーを犠牲ウエハー上に押圧し、硬化の間に気泡を除去し、接着剤を焼成し硬化させた。

【0544】

付着したケイ素ウエハーを、表面全体の厚さが40~60 μm および特に55 μm ~60 μm の厚さになるまでCMPにより薄くした。

【0545】

次いで、硬質マスクとして機能させるために、二酸化ケイ素などの誘電層をケイ素ウエハー上に蒸着させた。

【0546】

次いで、ポリマーマスク層(軟質マスク)をスピンコーティング法により硬質マスクの頂部に積層し、ホットプレートで固化させた。

【0547】

次いで、軟質マスクを、表面全体をスロットとなる連続の矩形領域を除き紫外線光で硬化させるように投影マスクを使用して表面全体にわたりパターン化した。

【0548】

未硬化の軟質マスク材料とその下の露出した硬質マスクをエッチングして除去した。

【0549】

次いで、Bosch法に従ったプロセスである、深掘り反応性イオンエッチングのDRIEを使用して、ウエハーを深掘エッチングした。このプロセスは軟式マスクを除去し、ウエハーを通してパターン化したスロットをエッチングし、2つのウエハーの間にある基剤となるウエハー接合化合物の一部を継続して除去した。マスクサイジングおよびDRIEプロセスは、得られたスロットが2.8 μm 幅 \times 55~60 μm 深さ \times 50 μm 長となり、ウエハーの表面全体にわたり、短軸に沿って9 μm 毎に、長軸に沿って70 μm 毎に連続するよう構成された。ウエハーの外周は、縁部から5mmのエッチングされていないリング領域であり、後のハンドリングで使用され得る強化した外周縁部となる。

【0550】

次いで、ウエハーをプラズマエッチング蒸着チャンバに入れ、TiNをその表面全体に蒸着させた。

【0551】

犠牲ウエハーとフィルタウエハーとの間の接合化合物を、フィルタウエハーが剥離し、犠牲ウエハーから浮遊して除去される(次にさらなるウエハーのために再利用することができ)まで酸素非含有1-ドデセンを使用して溶解させた。

【0552】

遊離したフィルタウエハーをメタノールで十分に洗浄後、真空オープンに入れ乾燥させた。

【0553】

次いで、ウエハーをプラスチックハンドリング用リングに、ならびにTiNで蒸着被覆された射出成形プラスチックフィルタ体の筐体の一方に接合させる。

【0554】

接合後、筐体は、フィルタの接合セグメントを保持して切り離され、成形されたフィルタ筐体の残り半分に取り付けられ、TiNで蒸着被覆され、すぐ使用できるフィルタを生成した。

【0555】

10

20

30

40

50

本出願および参考文献一覧ならびに添付文書において参照した特許文書および科学論文を含む全ての刊行物は、個々の刊行物それぞれが個々に参照により組み込まれるのと同じ範囲において参照によりその全体が組み込まれる。

【0556】

全ての表題は読み手の便宜上のためであり、そのように明記されない限り、表題に続く本文の意味を制限するために使用されないものとする。

【0557】

上記の実施例は、例示目的のために含まれるに過ぎず、本発明の範囲を制限するものではない。上記の実施例に対する多くの変形例が可能である。上記の実施例に対する変更例および変形例が当業者であれば明らかであるため、本発明は添付された特許請求の範囲によってのみ制限されるものとする。

【0558】

上記の刊行物または文書の引用は、上記のいずれかが関連の先行技術であるとの容認を意図するものではなく、これらの刊行物または文書の内容または日付に関して任意の容認をなすものではない。

【図1】

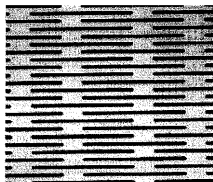
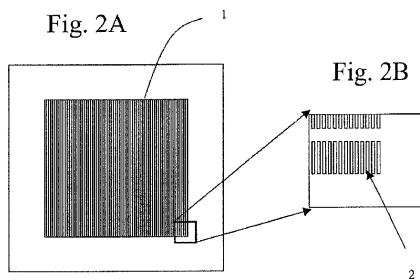


Fig. 1

【図2A - 2B】



【図2C】



Fig. 2C

【図3A】

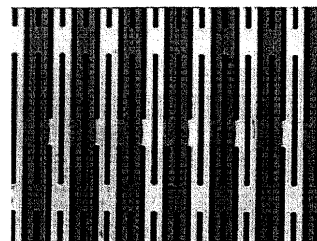


Fig. 3A

【図3B】

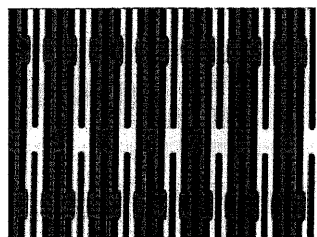


Fig. 3B

【 図 4 】

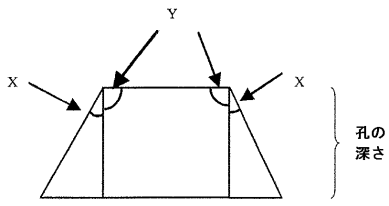


Fig. 4

【 図 5 】

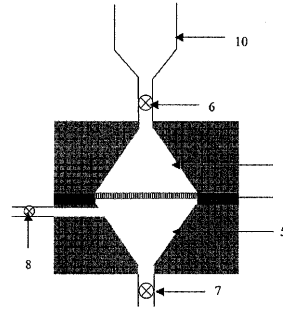


Fig. 5

【 図 6 】

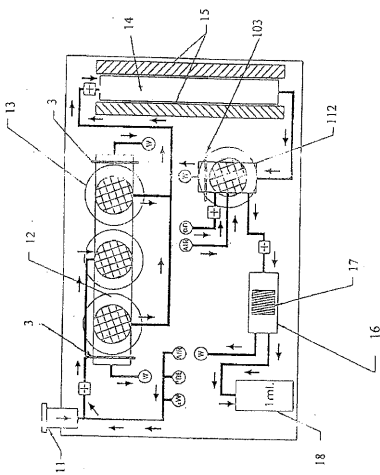


Fig. 6

【 図 7 】

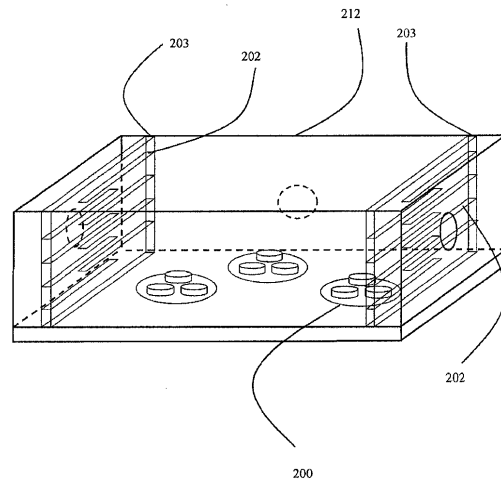


Fig. 7

【 図 8 】

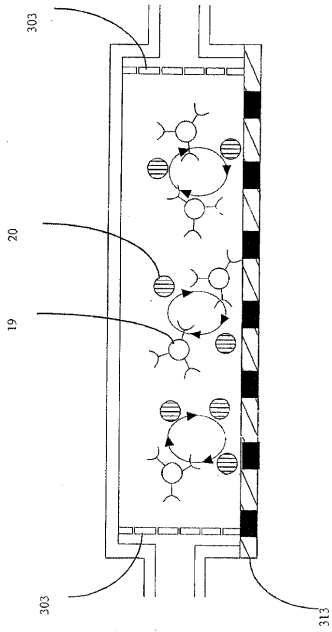


Fig. 8

【 図 9 】

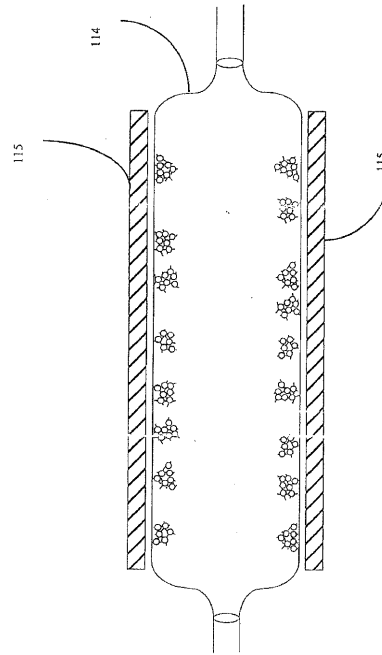


Fig. 9

【 図 10 】

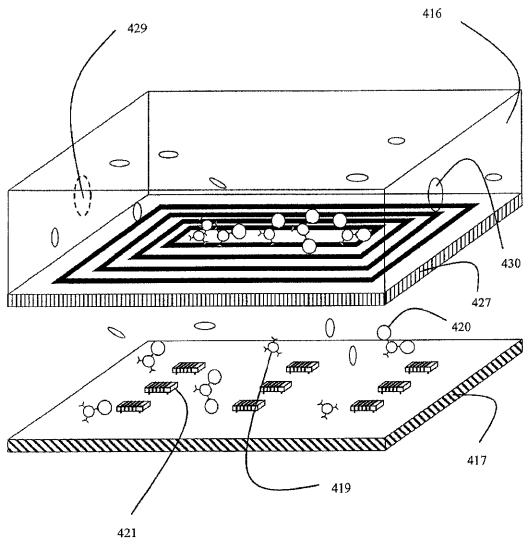


Fig. 10

【 図 11 】

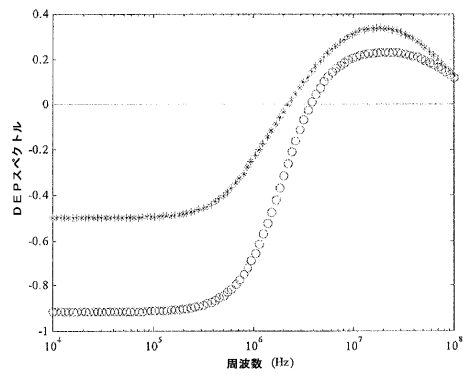


Fig. 11

【 図 1 2 】

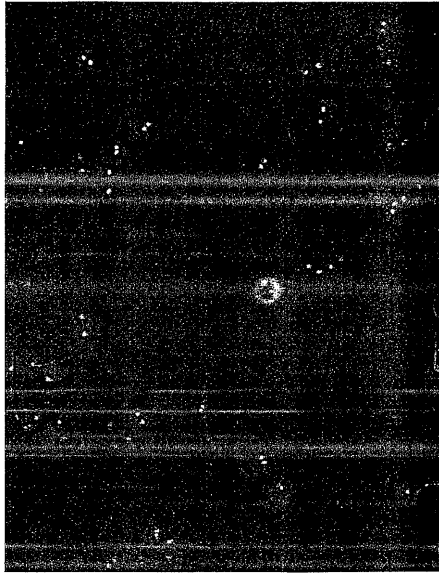


Fig. 12

【 図 1 3 】

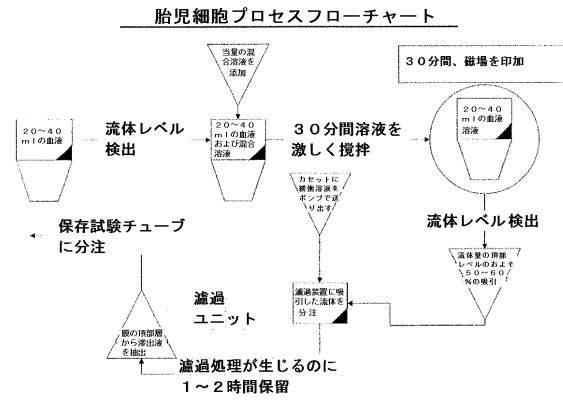


Fig. 13

【 図 1 4 】

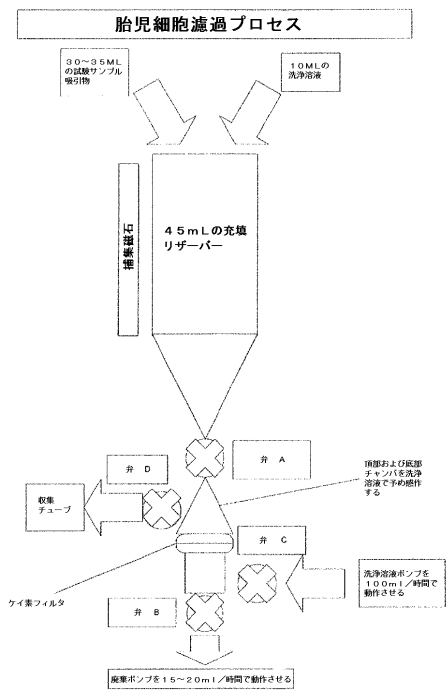


Fig. 14

【 図 1 5 】

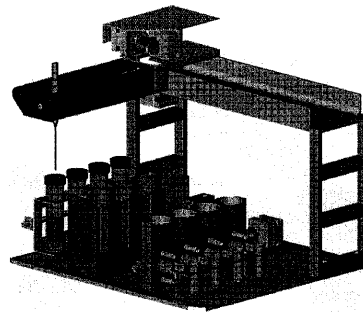


Fig. 15

【 図 1 6 A 】

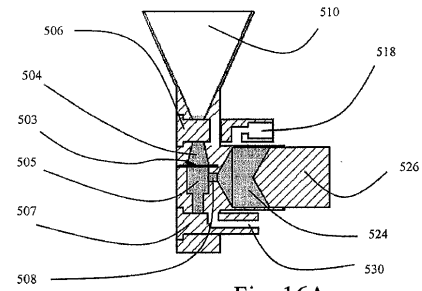


Fig. 16A

【 図 1 6 B 】

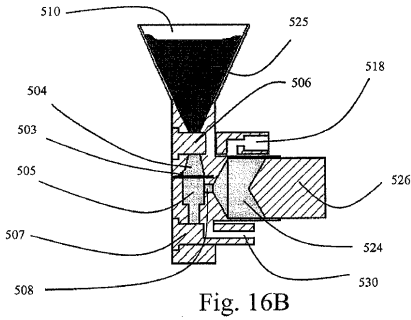


Fig. 16B

【 図 1 6 D 】

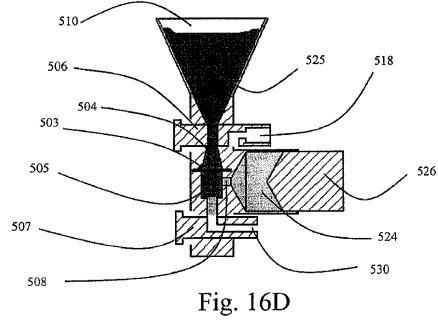


Fig. 16D

【 図 1 6 C 】

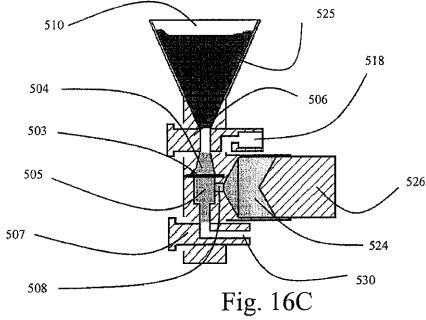


Fig. 16C

【 図 1 6 E 】

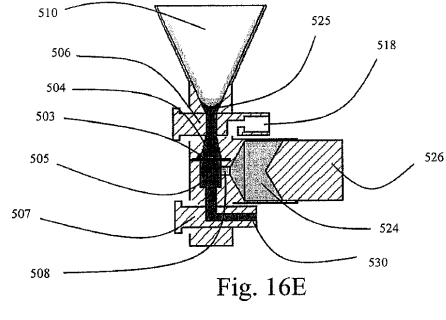


Fig. 16E

【 図 1 6 F 】

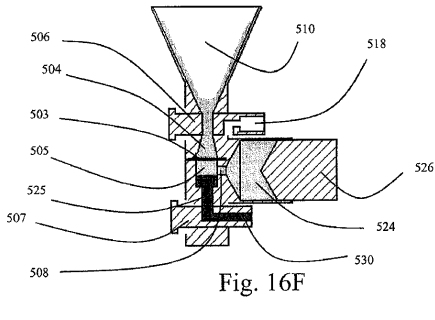


Fig. 16F

【 図 1 6 H 】

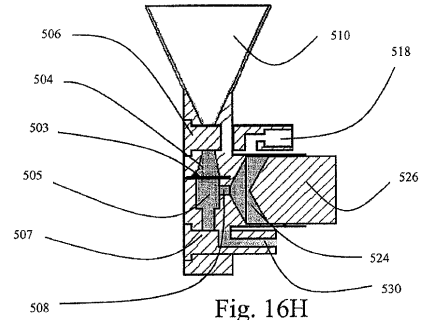


Fig. 16H

【 図 1 6 G 】

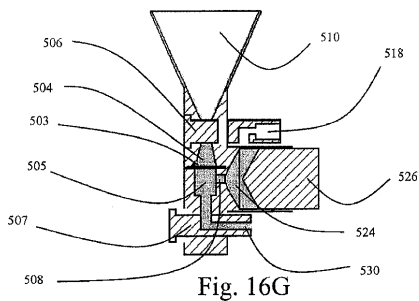


Fig. 16G

【 図 1 6 I 】

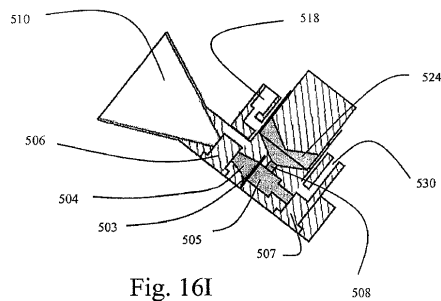


Fig. 16I

【 図 1 6 J 】

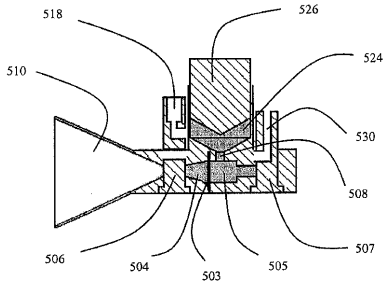


Fig 16J

【 図 1 6 L 】

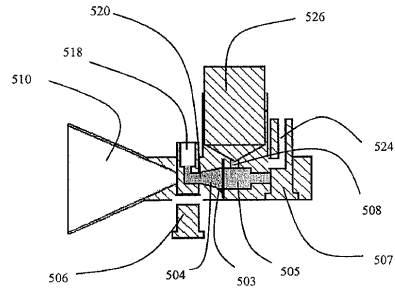


Fig. 16L

【 図 1 6 K 】

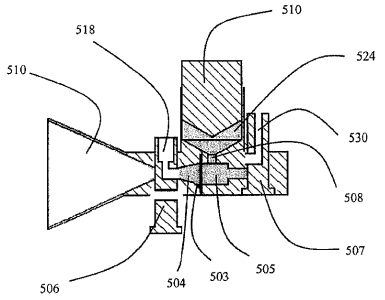


Fig. 16K

【 図 1 6 M 】

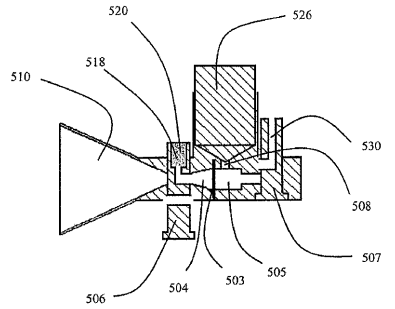


Fig. 16M

【 図 1 7 A 】

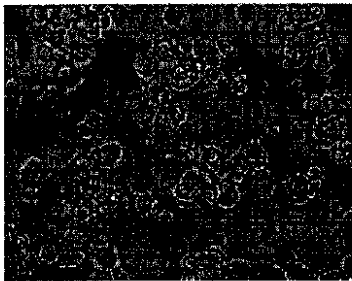


Fig. 17A

【 図 1 7 B 】



Fig. 17B

【 図 18 A 】

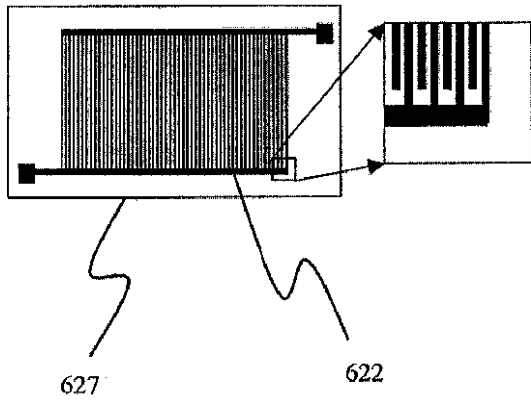


Fig. 18A

【 図 18 B 】

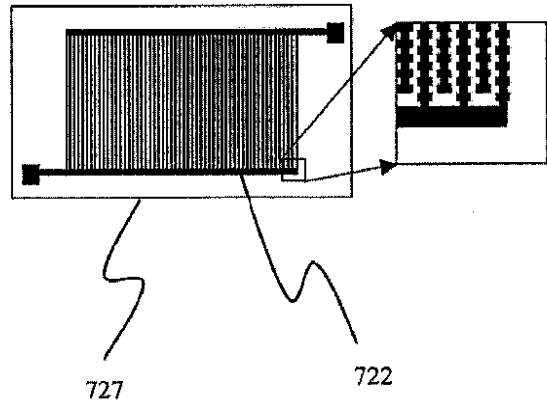


Fig. 18B

【 図 19 A 】

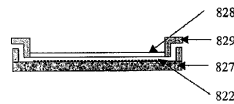


Fig. 19A

【 図 19 B 】

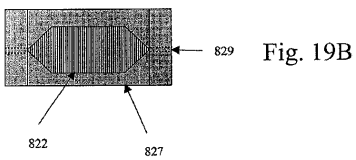


Fig. 19B

【 図 21 A 】

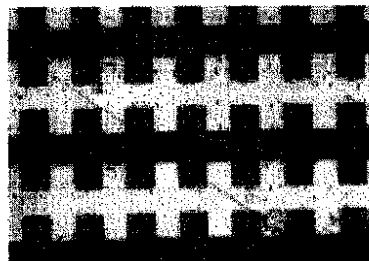


Fig. 21A

【 図 20 】

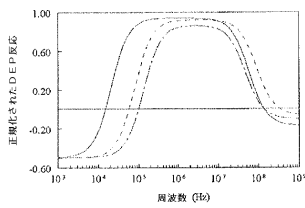


Fig. 20

【 図 2 5 】

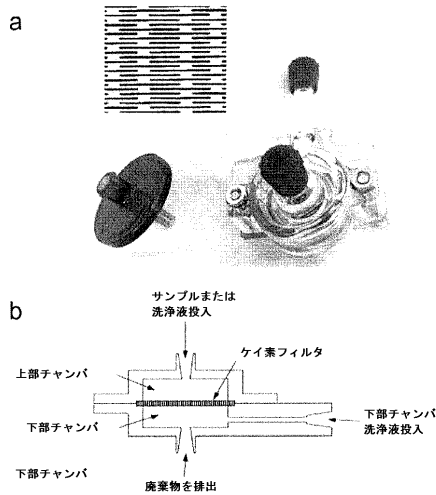


Figure 25

【 図 2 6 】

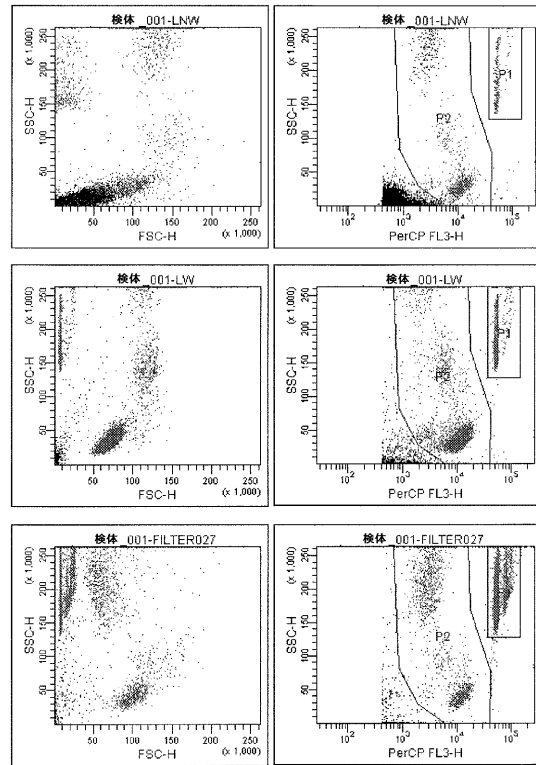


Figure 26

【 図 2 7 - 1 】

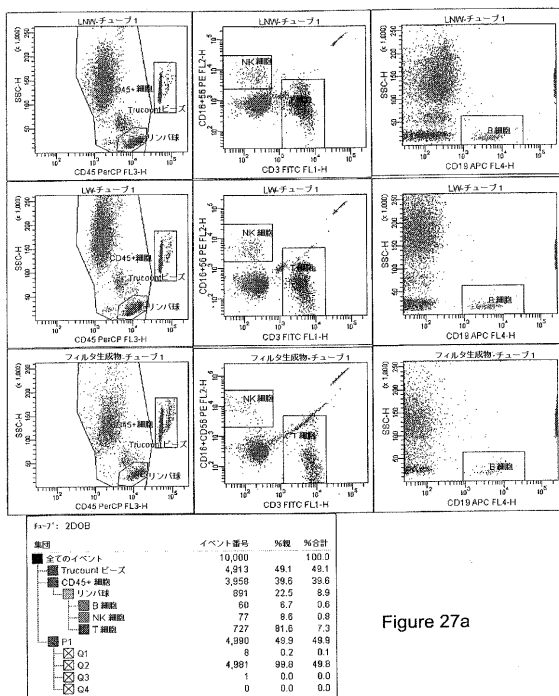


Figure 27a

【 図 2 7 - 2 】

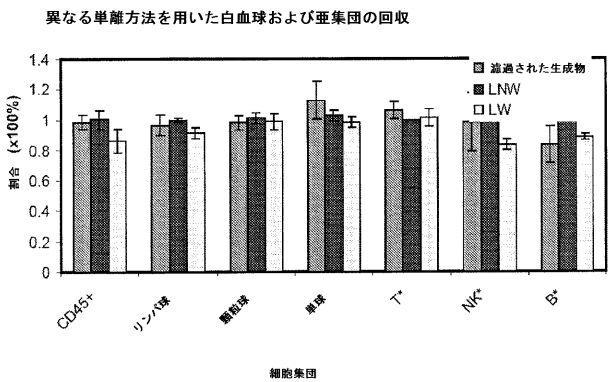
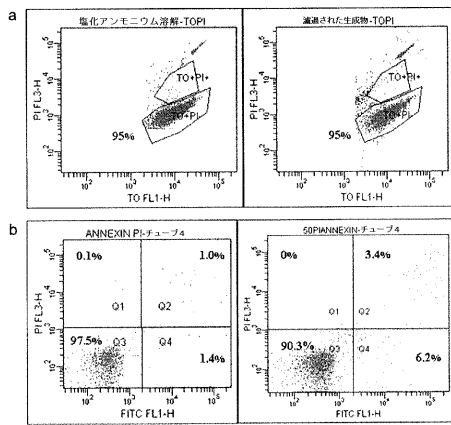


Figure 27b

【 図 2 8 】

Fig. 28



【 図 2 9 】

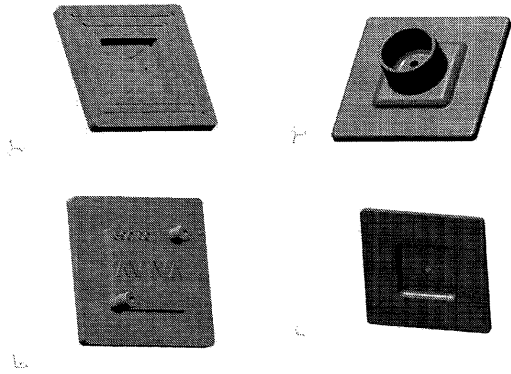


Figure 29

【 図 3 0 】

塩化アンモニウム溶解後の細胞生存性

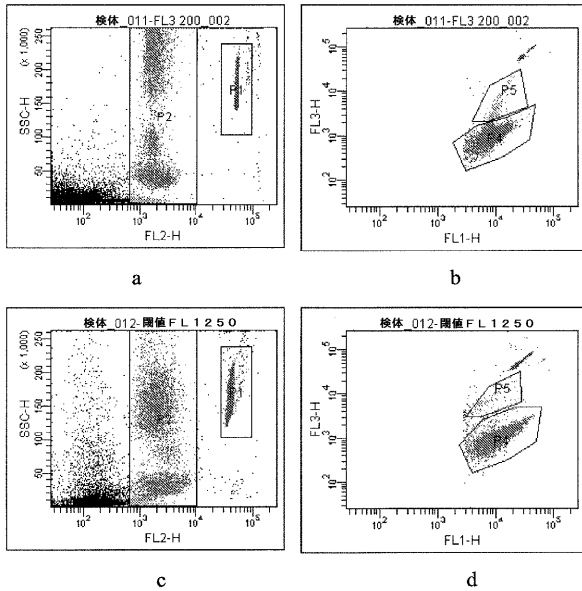


Figure 30

【 図 3 1 】

濾過後の細胞生存性

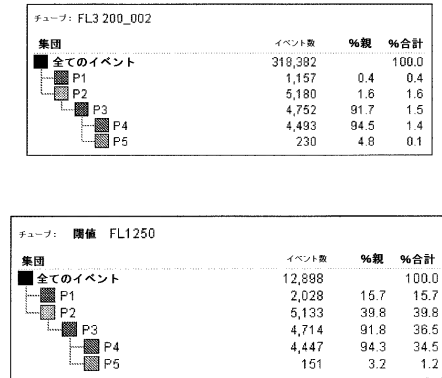


Figure 31

【 図 3 2 】

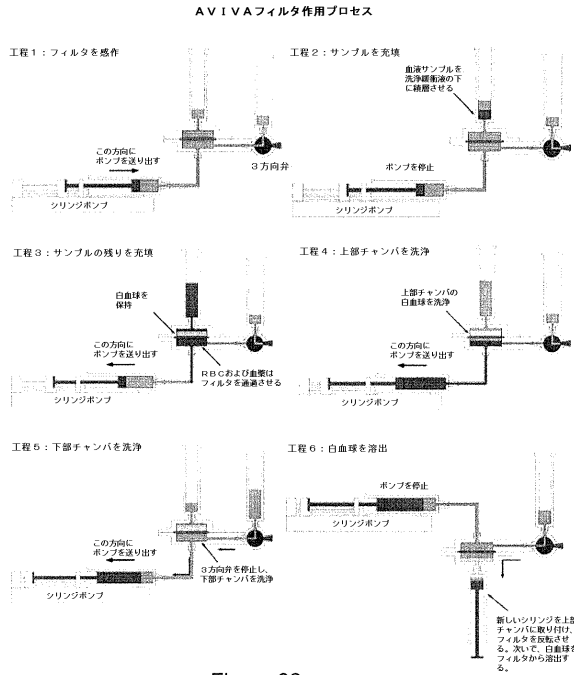


Figure 32

【 図 3 3 】

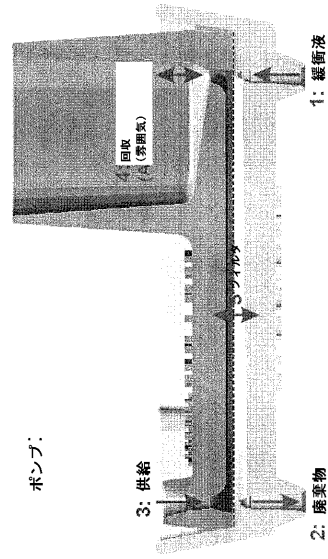


FIGURE 33

【 図 3 4 】

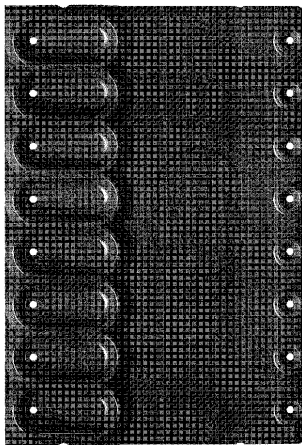


FIGURE 34

【 図 3 5 】

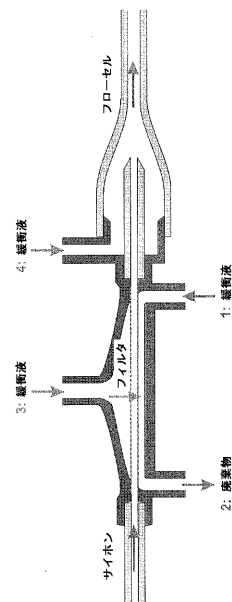
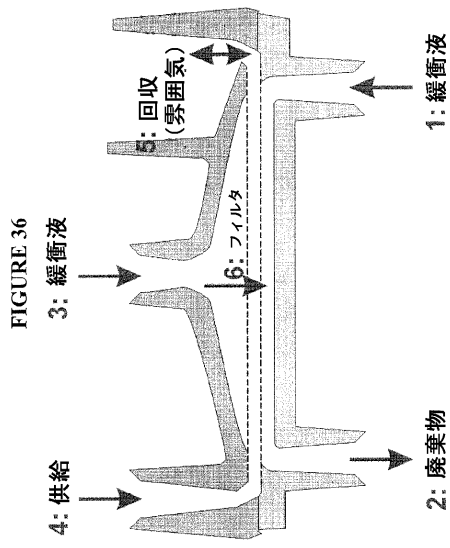
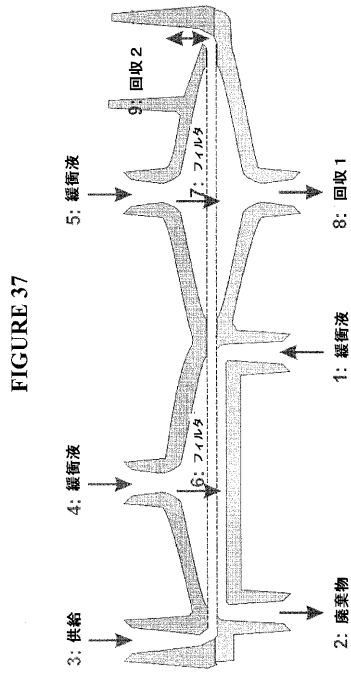


FIGURE 35

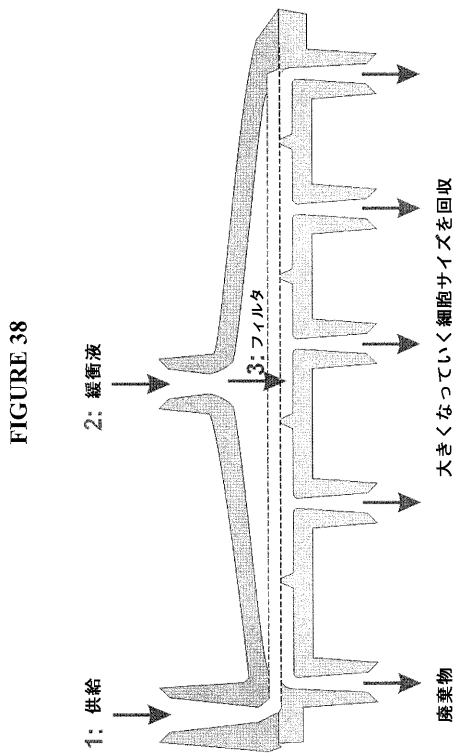
【 図 3 6 】



【 図 3 7 】



【 図 3 8 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2013/049476
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV.	B01L3/00 A61M1/36 B01D57/02 B01D61/18 B01D67/00 B01D71/02 B01D71/04 G01N1/40 G01N15/02 G01N15/05	
ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) B01L G01N A61M B01D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2004/142463 A1 (WALKER GEORGE [US] ET AL) 22 July 2004 (2004-07-22) column 654 - column 661; figure 23 -----	1-56, 66-154
A	WO 2008/008515 A2 (AVIVA BIOSCIENCES CORP [US]; LIN PING [US]; GHETTI ANDREA [US]; SHI WE) 17 January 2008 (2008-01-17) the whole document -----	1-56, 66-154
A	WO 03/031938 A2 (AVIVA BIOSCIENCES CORP [US]) 17 April 2003 (2003-04-17) the whole document -----	1-56, 66-154
A	DE 196 48 881 A1 (GEESTHACHT GKSS FORSCHUNG [DE]; MAX PLANCK GESELLSCHAFT [DE] GEESTHACH) 4 June 1998 (1998-06-04) the whole document -----	1-56, 66-154
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 September 2013		Date of mailing of the international search report 07/01/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040 Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Skowronski, Maik

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2013/049476**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-56, 66-80(completely); 81-154(partially)

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ US2013/ 049476

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-56, 66-80(completely); 81-154(partially)

A filtration chamber comprising a microfabricated filter with opposite fluid flow path

2. claims: 57-65(completely); 81-154(partially)

A filtration chamber comprising a microfabricated filter, the filter or housing having modified surface

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2013/049476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2004142463	A1	22-07-2004	CA 2544564 A1 26-05-2005
			EP 1694856 A1 30-08-2006
			US 2004142463 A1 22-07-2004
			WO 2005047529 A1 26-05-2005

WO 2008008515	A2	17-01-2008	CA 2657621 A1 17-01-2008
			CN 101583722 A 18-11-2009
			EP 2041299 A2 01-04-2009
			US 2008206757 A1 28-08-2008
			WO 2008008515 A2 17-01-2008

WO 03031938	A2	17-04-2003	AT 479490 T 15-09-2010
			AU 2002334989 A1 22-04-2003
			CA 2462914 A1 17-04-2003
			DK 1439897 T3 03-01-2011
			EP 1439897 A2 28-07-2004
			EP 2156879 A2 24-02-2010
			US 2003134416 A1 17-07-2003
			WO 03031938 A2 17-04-2003

DE 19648881	A1	04-06-1998	DE 19648881 A1 04-06-1998
			EP 0942966 A1 22-09-1999
			WO 9823734 A1 04-06-1998

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ギア, アントニオ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 ヤマニシ, ダグラス ティー.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 ゲッティ, アンドレア

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 タオ, グオリャン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 タオ, ファイミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 トロン, キー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 ウー, レイ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

(72)発明者 ワン, シャオボ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 1, サンディエゴ, ナンシー リッジ ドライブ
6 3 3 0, スイート 1 0 3

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2015522166A5	公开(公告)日	2016-08-25
申请号	JP2015520711	申请日	2013-07-05
申请(专利权)人(译)	英杰华生物科学公司		
[标]发明人	ギアアントニオ ヤマニシダグラスティー ゲッティアンドレア タオグオリャン タオフィミン トロンキー ウーレイ ワンシャオボ		
发明人	ギア, アントニオ ヤマニシ, ダグラス ティー. ゲッティー, アンドレア タオ, グオリャン タオ, フィミン トロン, キー ウー, レイ ワン, シャオボ		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	A61M1/34 A61M1/3616 A61M1/3618 A61M1/362 A61M1/3679 A61M2205/3375 B01D57/02 B01D61/147 B01D61/18 B01D63/087 B01D63/088 B01D67/0034 B01D67/0062 B01D67/0072 B01D67/0088 B01D67/009 B01D69/144 B01D71/02 B01D71/027 B01D71/04 B01D71/28 B01D71/38 B01D71/44 B01D71/52 B01D71/72 B01D2313/20 B01D2313/345 B01D2325/021 B01D2325/028 B01L3/502 B01L3/502753 B01L3/502761 B01L2300/0681 B01L2300/0816 B01L2300/0861 B01L2400/0409 B01L2400/0457 B01L2400/0478 B01L2400/0644 B01L2400/065 B03C1/01 B03C1/288 B03C5/005 B03C5/028 B03C2201/26 G01N33/491 B01D29/0093 B05D1/62 C23C8/06 C23C14/3414 C23C16/06 C23C16/08 C23C16/50 G01N1/34 G01N27/44791		
FI分类号	G01N33/53.T G01N33/53.D G01N33/53.K		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	61/668990 2012-07-06 US 13/844085 2013-03-15 US		
其他公开文献	JP2015522166A		

摘要(译)

本发明提供一种过滤室，其包括封装在壳体中的微制造过滤器，其中所述过滤器的表面和/或所述壳体的内表面通过气相沉积，升华，气相表面反应或颗粒溅射来改变以产生均匀的涂层；和分离流体样品细胞的方法，包括：a) 将流体样品分配到本文公开的过滤室中；b) 提供流体样品的流体流动通过过滤室，其中流体样品的组分基于组分的尺寸，形状或可变形性流过过滤器或由过滤器保留。

