



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103002975 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 27

(21) 申请号 201180031531. 1

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 05. 03

*B01D 71/00* (2006. 01)

(30) 优先权数据

*B01D 67/00* (2006. 01)

201003161-5 2010. 05. 04 SG

*B01D 69/02* (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 12. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SG2011/000173 2011. 05. 03

(87) PCT申请的公布数据

W02011/139233 EN 2011. 11. 10

(71) 申请人 新加坡科技研究局

地址 新加坡新加坡市

(72) 发明人 李孟皇 胡敏 张伟才 颜道亮

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理

有限责任公司 11290

代理人 梁兴龙 陈桂香

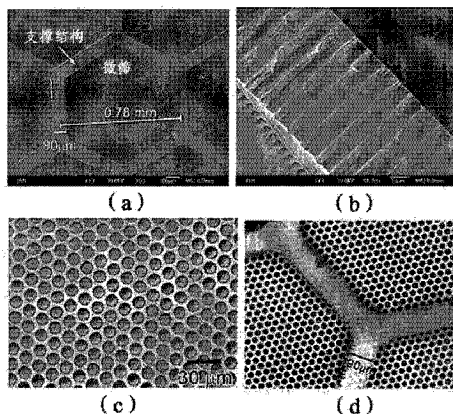
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 5 页

(54) 发明名称

细胞和颗粒过滤用的微筛

(57) 摘要

本发明公开了一种包括两层的微筛, 其中第一层是膜层, 所述膜层具有包含在其中的多个微孔并且厚度为约  $10\ \mu\text{m}$  ~ 约  $100\ \mu\text{m}$ ; 第二层是膜支撑层, 所述膜支撑层具有包含在其中的多个开口并且厚度为约  $100\ \mu\text{m}$  ~ 约  $500\ \mu\text{m}$ , 其中所述开口的直径比所述微孔的直径大, 并且其中所述膜层或膜支撑层中的至少一个由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。



1. 一种包括两层的微筛,其中:
  - 第一层是膜层,所述膜层具有包含在其中的多个微孔并且厚度为约  $10\ \mu\text{m}$ ~约  $100\ \mu\text{m}$ ;和
  - 第二层是膜支撑层,所述膜支撑层具有包含在其中的多个开口并且厚度为约  $100\ \mu\text{m}$ ~约  $500\ \mu\text{m}$ ,其中所述开口的直径比所述微孔的直径大,并且其中所述膜层或膜支撑层中的至少一个由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。
2. 如权利要求 1 所述的微筛,其中所述膜层和膜支撑层都由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的微筛,其中所述开口的直径比所述微孔的直径大至少 10 倍。
4. 如前述权利要求中任一项所述的微筛,其中所述膜层具有约  $50\ \mu\text{m}$ ~约  $100\ \mu\text{m}$  的厚度。
5. 如前述权利要求中任一项所述的微筛,其中所述膜支撑层具有约  $200\ \mu\text{m}$ ~约  $300\ \mu\text{m}$  的厚度。
6. 如前述权利要求中任一项所述的微筛,其中所述多个微孔中的每个微孔都具有约  $5\ \mu\text{m}$ ~约  $50\ \mu\text{m}$  的孔径。
7. 如权利要求 6 所述的微筛,其中所述多个微孔中的每个微孔都具有约  $10\ \mu\text{m}$  的孔径,所述膜层具有约 5,000 个微孔/ $\text{mm}^2$  的微孔密度。
8. 如前述权利要求中任一项所述的微筛,其中所述微筛已经进行过表面处理以减小流体阻力。
9. 如前述权利要求中任一项所述的微筛,其中所述微筛已经用金属层进行过表面涂布。
10. 一种制备如权利要求 1~9 中任一项所述的微筛的方法,包括:
  - 提供基材;
  - 用厚度为约  $10\ \mu\text{m}$ ~约  $100\ \mu\text{m}$  的第一层涂布所述基材;
  - 将第一层图案化以在其中形成多个微孔;
  - 用厚度为约  $100\ \mu\text{m}$ ~约  $500\ \mu\text{m}$  的第二层涂布图案化的第一层;和
  - 将第二层图案化以形成多个开口,其中所述开口的直径比所述微孔的直径大,并且其中第一层或第二层中的至少一个由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。
11. 如权利要求 10 所述的方法,其中将第一层图案化包括:
  - 施加限定有对应于将要形成的微孔的点图案的光致抗蚀剂掩模;和
  - 将具有施加的光致抗蚀剂掩模的第一层暴露于 UV 光。
12. 如权利要求 10 或 11 所述的方法,其中将第二层图案化包括:
  - 施加限定有对应于将要形成的开口的形状图案的光致抗蚀剂掩模;和
  - 将具有施加的光致抗蚀剂掩模的第二层暴露于 UV 光。
13. 如权利要求 10~12 中任一项所述的方法,还包括在图案化之后对第一层和第二层进行显影。
14. 如权利要求 10~13 中任一项所述的方法,还包括在涂布第一层之前用溶脱剥离抗蚀剂层涂布所述基材。

15. 如权利要求 13 或 14 所述的方法,还包括在显影之后除去溶脱剥离抗蚀剂层和 / 或所述基材。

16. 一种用于从流体样本中分离限定尺寸的细胞的装置,其中所述装置包括:

- 具有流体样本流入用的进口的进口模块;

- 具有流体样本流出用的出口的出口模块;

- 如权利要求 1~9 中任一项所述的微筛,所述微筛具有在所述进口模块和所述出口模块之间排列的用于保留限定尺寸的细胞的微孔,其中所述进口模块、所述出口模块和所述微筛彼此流体连接以允许所述流体样本从所述进口模块穿过到达所述出口模块。

17. 一种从流体样本中分离限定尺寸的细胞的方法,所述方法包括过滤疑似包含通过如权利要求 16 所述的装置的进口模块而将要分离的细胞的流体样本。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述流体样本选自全血、尿、培养基和溶解的组织溶液。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的方法,其中将要检测的细胞选自循环肿瘤细胞、上皮细胞、来自溶解的癌组织的癌细胞或癌症干细胞、尿样本中含有的细胞以及从细胞培养基富集的细胞。

20. 如权利要求 16 所述的装置用于过滤全血的用途。

21. 如权利要求 20 所述的用途,用于从全血中分离循环肿瘤细胞。

## 细胞和颗粒过滤用的微筛

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请主张享有于 2010 年 5 月 4 日提交的新加坡专利申请 No. 201003161-5 的权益,在此将该专利申请的全部内容并入作为参考。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及一种微筛,具体而言,涉及细胞和颗粒过滤用的具有两个非对称层的微筛。

### 背景技术

[0004] 从液体样本中分离特定组分不仅对于研究目的而且对于临床实验室的诊断而言都已经变得日益重要。具体地,对于临床应用而言,需要能够以快速和可靠的方式在从患者获得的样本中确定是否存在某些组分的系统,这样可以使临床医生做出诊断并且确定患者的进一步治疗。在研究实验室中也需要这种系统。

[0005] 例如,循环肿瘤细胞 (CTC) 在癌症患者的外周血中是非常罕见的,在患有转移癌的癌症患者的血液中少至 1 个细胞 / $10^9$  个血液细胞。这些细胞的量已经显示出其与病情发展相关联,并且代表了对癌症转移分析的侵入性活组织检查的潜在选择。已经研制出了若干技术以从癌症患者的血液样本中分离 CTC,如密度梯度离心法、免疫磁力法 (MACS)、铁磁流体法 (CellSearch™) 以及利用微筛的细胞过滤。

[0006] 在各种细胞分离技术中,由于细胞过滤需要较少的精密设备并且可实现更快的响应时间或分离时间,因而似乎是最有前景和最引人注目的。当前的细胞过滤技术包括使用由硅、聚对二甲苯或聚碳酸酯制成的微筛。然而,这种微筛材料存在诸如与细胞培养试剂的不相容性、材料成本高和孔密度低等缺点,仅列出了几个。

[0007] 因此,需要研制一种细胞和颗粒的迅速过滤用的微筛来克服或至少减轻上述问题。

### 发明内容

[0008] 各实施方案提供了用于在流体中进行有效的细胞过滤的低成本和一次性的微筛。该微筛被设计成具有两个非对称层。该微筛可以利用常规的双层光刻工艺制作,这样使得能够控制将要形成的微孔的精确度和均匀性,同时提供大规模制作的能力。此外,该微筛使流动阻力最小化,从而导致高的跨膜通量,因而极大地减少了细胞分离时间。

[0009] 各实施方案提供了一种包括两层的微筛,其中:

[0010] - 第一层是膜层,所述膜层具有包含在其中的多个微孔并且厚度为约  $10\ \mu\text{m}$  ~ 约  $100\ \mu\text{m}$ ;和

[0011] - 第二层是膜支撑层,所述膜支撑层具有包含在其中的多个开口并且厚度为约  $100\ \mu\text{m}$  ~ 约  $500\ \mu\text{m}$ ,其中所述开口的直径比所述微孔的直径大,并且其中所述膜层或膜支撑层中的至少一个由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。

- [0012] 各实施方案还提供了一种制备微筛的方法,包括:
- [0013] - 提供基材;
- [0014] - 用厚度为约  $10\ \mu\text{m}$  ~ 约  $100\ \mu\text{m}$  的第一层涂布所述基材;
- [0015] - 将第一层图案化以在其中形成多个微孔;
- [0016] - 用厚度为约  $100\ \mu\text{m}$  ~ 约  $500\ \mu\text{m}$  的第二层涂布图案化的第一层;和
- [0017] - 将第二层图案化以形成多个开口,其中所述开口的直径比所述微孔的直径大,并且其中第一层或第二层中的至少一个由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。
- [0018] 各实施方案还提供了一种用于从流体样本中分离限定尺寸的细胞的装置,其中所述装置包括:
- [0019] - 具有流体样本流入用的进口的进口模块;
- [0020] - 具有流体样本流出用的出口的出口模块;
- [0021] - 如以上各实施方案所述的微筛,所述微筛具有在所述进口模块和所述出口模块之间排列的用于保留限定尺寸的细胞的微孔,其中所述进口模块、所述出口模块和所述微筛彼此流体连接以允许所述流体样本从所述进口模块穿过到达所述出口模块。
- [0022] 各实施方案还提供了一种从流体样本中分离限定尺寸的细胞的方法,所述方法包括过滤疑似包含通过如以上各实施方案所述的装置的进口而将要分离的细胞的流体样本。
- [0023] 各实施方案提供了如以上各实施方案所述的装置用于过滤血液的用途。

#### 附图说明

[0024] 在附图中,相似的参考文字在不同视图中通常是指相同部分。附图不必依照比例绘制,而是重点在于解释各实施方案的原理。在下面的说明中,参照附图来描述本发明的各实施方案。

[0025] 图 1 示出了 (a) 富集循环肿瘤细胞 (CTC) 的操作原理;(b) 从离解的组织进行细胞纯化的原理。

[0026] 图 2 示出了 SU-8 微筛的制作过程。(a) 旋转涂布溶脱剥离 (lift-off) 抗蚀剂 10B, (b) 旋转涂布和图案化过滤膜层用的 SU-8 第一层, (c) 旋转涂布和图案化膜支撑层用的 SU-8 第二层, (d) 显影, (e) 从硅基材溶脱剥离 SU-8 微筛。插图示出了 SU-8 微筛的设计图。

[0027] 图 3 示出了 (a) 微筛结构的 SEM 图, (b) 穿过通道的  $10\text{-}\mu\text{m}$  直径的截面图, (c, d) 高度均匀的  $10\text{-}\mu\text{m}$  和  $25\text{-}\mu\text{m}$  直径的 SU-8 微筛的光学图像。

[0028] 图 4 示出了过滤的 HepG2/GFP 肿瘤细胞的荧光图。将 HepG2/GFP 细胞掺入 1-ml 未稀释的家兔全血内并用  $10\text{-}\mu\text{m}$  直径的 SU-8 微筛膜过滤。(a) 用 DAPI 染色的细胞核 (蓝色), (b) HepG2/GFP 的形态 (绿色)。

[0029] 图 5 示出了在不同过滤条件下  $25\text{-}\mu\text{m}$  直径的 SU-8 微筛的流量与过滤时间的关系。(a) 在  $1.5\text{kPa}$  压力下的  $4.5\text{ml}$  PBS 缓冲液。(b, c) 对于等离子体处理的 (b) 或未处理的 (c) SU-8 微筛在  $5\text{kPa}$  压力下的  $4.5\text{ml}$  家兔全血。插图示出了实验设备。

[0030] 图 6 示出了用于药物响应研究的 SU-8 微筛装置的示意图。(a) 利用 SU-8 微筛过滤循环肿瘤细胞 (CTC)。(b) 在细胞培养基上培养捕获的 CTC。(c) 用药物处理单独孔中的细胞。用显微镜监控细胞的响应。在设计 (A) 中,微筛支撑环的结构用作微孔的物理壁。

[0031] 图 7 示出了与塑料支架一体化的 SU-8 微筛的示意图。(a, b) 塑料支架由一个出口构成。(c, d) 塑料支架由具有鸭嘴形止回阀的出口构成。(e, f) 塑料支架由具有小孔的出口构成。微筛的支撑环或者朝上或者朝下。(g) 夹在两个模块之间的组装有微筛的装置。

### 具体实施方式

[0032] 以下的详细描述参照附图,通过图解示出可以实践本发明的具体细节和实施方案。这些实施方案被充分详细地描述以使本领域技术人员能够实践本发明。可以使用其他实施方案,并且可以在不背离本发明范围的情况下进行结构、逻辑和电学方面的改变。各实施方案不必互相排斥,一些实施方案可以与一个或多个其他实施方案组合而形成新的实施方案。

[0033] 各实施方案提供了针对应用的具有受控的微孔直径的低成本、一次性的微筛,例如,从离解的组织溶液纯化的全血和上皮细胞分离循环肿瘤细胞 (CTC)。可以在与现有的 CTC 分离法相比更简单的即用型过滤单元上利用简单的真空抽吸和实验室荧光显微镜来实现流体调节和细胞计数。该微筛对于从低至 5ml 体积的临床样本进行迅速的罕见细胞过滤提供了新的解决方案。

[0034] 在各实施方案中,微筛可以包括两层。

[0035] 第一层可以是膜层,所述膜层具有包含在其中的多个微孔。膜层用来过滤流体样本中包含的细胞(或其他颗粒),使得细胞可以被收集并归类用于进一步分析。

[0036] 取决于具体应用和将要分析的细胞的类型,微孔的直径可以进行相应地调整和控制。在各实施方案中,多个微孔中的每个微孔都具有约  $5\ \mu\text{m}$  ~ 约  $50\ \mu\text{m}$  的孔径。在如图 1(a) 所示的一个实施方案中,对于 CTC 过滤而言,可以将每个微孔的孔径制成约  $10\ \mu\text{m}$  并且具有  $15\ \mu\text{m}$  的间距(即,两个邻近微孔的中心之间的距离)。在如图 1(b) 所示的另一个实施方案中,对于离解的上皮细胞纯化而言,可以将每个微孔的孔径制成约  $25\ \mu\text{m}$  并且具有  $30\ \mu\text{m}$  的间距。应该理解并领会的是,膜层中微孔的尺寸被设计成比将要被微孔保留的细胞的尺寸更小,从而允许包含其他颗粒或实体的流体样本穿过。

[0037] 在各实施方案中,微孔可以形成为圆形、正方形、矩形、三角形、多边形或任何其他规则或不规则结构的形状。在一个实施方案中,微孔是圆形的。在本说明书中使用的术语“直径”被理解成是指在形状或结构中任一对点之间的最大距离。例如,正方形的直径在这种情况下是指对角线长度。

[0038] 在各实施方案中,膜层的厚度可以为约  $10\ \mu\text{m}$  ~ 约  $100\ \mu\text{m}$ 。一方面,如果膜层的厚度太薄,则有孔的膜层可能在物理上太弱或太脆,并且例如在全血的 CTC 过滤期间容易破裂。含有白细胞、红细胞和血小板的全血样本比水更粘,因此需要更大的力以将全血样本泵送穿过膜层。因此,当流体样本穿过膜层的微孔时,膜层的厚度有利地被选择成能够承受由流体样本施加的压力。

[0039] 膜层厚度太薄的另一个缺点在于实现暴露于流体样本涌入的光滑且平整的膜层表面变得越来越困难。在各实施方案中,为了减少处理时间,在微筛的微孔中保留的分离细胞可以直接用不同的荧光染料染色,并且可以使用其上放置微筛的荧光显微镜计数。在这种应用中,对光滑且平整的膜层表面的需求变得更加明显。此外,微筛可以用金属层进行表面涂布。SU-8 光致抗蚀剂材料具有荧光性,由此可以干预细胞的荧光计数。通过在微筛表

面上涂布金属层,可以最小化来自 SU-8 光致抗蚀剂材料的荧光噪声。

[0040] 另一方面,如果膜层的厚度太厚,则流体阻力可能对流体样本中细胞的分离速率造成严重的问题,由于流体样本必须穿过微孔中的较长距离,因此过滤将需要较长时间。被微孔保留的细胞对流体样本穿过微孔产生阻碍。随着更多的细胞被保留,用于流体样本通道的微孔的可用性变得更小,并且流体阻力变得越来越严重。为了进一步解决流体阻力问题,可以对微筛进行表面处理以减小流体阻力。在一个实施方案中,可以通过在低温下的气体电磁放电利用低压等离子体技术来处理微筛表面。

[0041] 此外,厚的膜层可能转变为不必要的材料成本和资源浪费,因而在商用和环境方面是不希望的。

[0042] 在各实施方案中,膜层可以被选择成具有约  $50\ \mu\text{m}$ ~ $100\ \mu\text{m}$  的厚度。

[0043] 微筛的第二层可以是膜支撑层,其具有包含在其中的多个开口。膜支撑层的开口的直径大于膜层的微孔的直径。膜支撑层充当膜层的物理支撑,同时在流体样本穿过膜层的微孔和膜支撑层的开口时最小化流体阻力。

[0044] 在各实施方案中,开口可以形成为圆形、正方形、矩形、三角形、多边形、六边形或任何其他规则或不规则结构的形状。在一个实施方案中,开口是六边形的。在本说明书中使用的术语“直径”是指形状或结构中任一对点之间的最大距离。例如,正方形的直径在这种情况下是指对角线长度。

[0045] 如上所述,必须仔细选择膜层的厚度,不能太薄或太厚。相应地选择膜支撑层的厚度,从而为膜层提供机械强度,使得当流体样本穿过膜层的微孔和膜支撑层的开口时微筛能够承受由流体样本施加的压力。

[0046] 在各实施方案中,膜支撑层可以具有约  $100\ \mu\text{m}$ ~ $500\ \mu\text{m}$  的厚度。例如,膜支撑层可以具有约  $200\ \mu\text{m}$ ~ $300\ \mu\text{m}$  的厚度。如果膜支撑层的厚度太厚,则可能转变为不必要的材料成本和资源浪费,因而在商用和环境方面是不希望的。

[0047] 膜支撑层中的开口被设计成比膜层中的微孔尺寸更大,使得流体阻力可以减小。穿过较小微孔的流体样本比穿过较大开口的流体样本经受更高的压力。因此,膜支撑层中的开口通过为穿过的流体样本提供较大体积的空间来减轻高流体阻力的问题。

[0048] 在各实施方案中,膜支撑层中的开口的直径比膜层中的微孔的直径大至少 10 倍。

[0049] 在各实施方案中,膜层或膜支撑层中的至少一个或两者由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。对于膜层和 / 或膜支撑层采用 SU-8 光致抗蚀剂材料的优点包括它的高机械强度、与细胞培养试剂的生物相容性、利用常规光刻技术制作的相容性、低材料成本、疏水性、高的化学和热稳定性,仅列出了几个。

[0050] 在一个实施方案中,膜层和膜支撑层都由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。

[0051] 图 2(a)~(e) 示出了在各实施方案中制作本发明的微筛的方法。

[0052] 该方法可以包括提供基材。在一个实施方案中,基材可以是硅。可以在食人鱼 (Piranha) 洗液中清洗基材以除去基材表面上的有机污染物。

[0053] 然后,用厚度为约  $10\ \mu\text{m}$ ~ $100\ \mu\text{m}$  的第一层涂布基材。在一个实施方案中,第一层可以由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。在一个实施方案中,第一层可以旋转涂布至基材上。

[0054] 接下来,将第一层图案化以在其中形成多个微孔。将第一层图案化可以包括施加限定有对应于将要形成的微孔的点图案的光致抗蚀剂掩模、将第一层曝光和除去光致抗蚀

剂掩模。可以采用常规的光刻设备和方法。例如,光致抗蚀剂掩模可以是具有圆形特征图案的涂铬的石英掩模,UV-光刻可以在约 365nm 的波长处进行以将掩模特征转移至第一层,从而形成有孔的膜层。尽管图 2 中示出了圆形微孔,但是应该理解并领会的是,如前面段落中所提到的,微孔的形状并不限于这种结构。

[0055] 第二层可以涂布至图案化的第一层上。第二层可以具有约  $100\ \mu\text{m}$ ~ $500\ \mu\text{m}$  的厚度。在一个实施方案中,第二层可以由 SU-8 光致抗蚀剂材料形成。在一个实施方案中,第二层可以旋转涂布至第一层上。

[0056] 接下来,将第二层图案化以在其中形成多个开口。开口的直径大于膜层中微孔的直径。将第二层图案化可以包括施加限定有对应于将要形成的开口的形状图案的光致抗蚀剂掩模、将第二层曝光和除去光致抗蚀剂掩模。可以采用常规的光刻设备和方法。例如,光致抗蚀剂掩模可以是具有六边形特征图案的塑料掩模,UV-光刻可以在约 365nm 的波长处进行以将掩模特征转移至第二层,从而形成有孔的膜支撑层。尽管图 2 中示出了六边形或蜂巢环形开口,但是应该理解并领会的是,如前面段落中所提到的,开口的形状并不限于这种结构。

[0057] 在各实施方案中,可以在涂布第一层之前先用溶脱剥离抗蚀剂层涂布基材。在一个实施方案中,可以将溶脱剥离抗蚀剂层旋转涂布至基材上。随后将第一层涂布至溶脱剥离抗蚀剂层上。

[0058] 在将第一层和第二层图案化之后,微筛可以在显影液中显影。可以使用任何合适的 SU-8 显影液。

[0059] 在显影之后,可以除去溶脱剥离抗蚀剂层和 / 或基材以获得具有两个非对称层的微筛。

[0060] 各实施方案提供了一种用于从流体样本中分离限定尺寸的细胞的装置 100,图 7(g) 中示出了这种装置。装置 100 可以包括具有流体样本流入用的进口的进口模块 10 和具有流体样本流出用的出口的出口模块 20。装置 100 还包括前述各实施方案所述的微筛 30,所述微筛具有在进口模块 10 和出口模块 20 之间排列的用于保留限定尺寸的细胞的微孔,其中进口模块 10、出口模块 20 和微筛 30 彼此流体连接以允许所述流体样本从进口模块 10 穿过到达出口模块 20。

[0061] 装置 100 还可以包括显微镜观察板 40,如荧光显微镜,其上可以放置微筛 30。在一个实施方案中,进口模块 10 和出口模块 20 可拆卸地连接,因而它们是可分离的,使得由显微镜观察板 40 支撑的微筛可以用荧光染料染色而进行细胞计数。

[0062] 装置 100 还可以包括放置在进口模块 10 和微筛 30 之间的垫圈。也可以将真空施加至出口模块 20 以帮助抽吸流体样本通过微筛。

[0063] 该装置可以用于过滤全血。在一个实施方案中,该装置可以用于从全血中分离循环肿瘤细胞。

[0064] 各实施方案提供了一种从流体样本中分离限定尺寸的细胞的方法。所述方法可以包括过滤疑似包含通过如上所述的装置的进口模块而将要分离的细胞的流体样本。

[0065] 在各实施方案中,所述流体样本选自全血、尿、培养基和溶解的组织溶液。

[0066] 在各实施方案中,将要检测的细胞选自循环肿瘤细胞、上皮细胞、来自溶解的癌组织的癌细胞或癌症干细胞、尿样本中含有的细胞以及从细胞培养基富集细胞。



[0067] 具有独特的两个非对称层的低成本微筛使流体阻力平衡,并且已经证实了装置的机械强度。特别地,使流动阻力最小化,从而导致高的跨膜通量,因而极大地减少了细胞分离时间。从具有掺入癌细胞的未稀释全血样本已经证实了成功的 CTC 分离。将 SU-8 用作两层的结构材料允许以每个装置数十美分的可行性成本来大规模制作具有精确孔径的微筛,因为在成本方面 SU-8 材料比玻璃毛细管阵列、硅基微筛和微制造的聚对二甲苯膜更低。针对基于靶细胞尺寸的各种细胞和颗粒的分离可以优化 SU-8 微筛的孔径。这种方法可以适于从患者的全血中分离肿瘤细胞和癌症诊断,并且可以延伸至用于各种疾病诊断的从全血中分离和检测其他细胞(如 HIV 试验用的 CD4+T 细胞)、从母血分离胎儿细胞、非侵入性的产前诊断以及在器官打印和细胞接种时除去细胞团块和大颗粒。

[0068] 为了可以容易地理解本发明并投入实践,将通过下面的非限制性实施例来描述具体的实施方案。

[0069] 实施例

[0070] 实施例 1

[0071] 通过在上述方法中描述的 4" 直径的硅基材上使用双层 SU-8 微制作法,每次运行可以制作多于 60 个微筛(每个具有 1cm 直径)。图 3 示出了密集的微孔阵列的高度均匀的微孔结构和光滑通孔表面。与常规的通常具有有限的孔密度(大约 200 个孔/mm<sup>2</sup>)的面内微筛不同,本发明的纵向微筛具有大约 5,000 个孔/mm<sup>2</sup>的孔密度,微筛面积的多于 40% 具有孔口,从而允许更快的 CTC 过滤。

[0072] 实施例 2

[0073] 图 4 示出了通过将 HepG2/GFP 癌细胞(肝癌)掺入 1-ml 未稀释的家兔全血内以模拟临床样本而证实的利用 10- $\mu$ m 直径的 SU-8 微筛过滤 CTC。捕获的 HepG2/GFP 细胞用 DAPI 染色(细胞核)并用荧光显微镜检查。这些图像清楚地表明,捕获的 CTC 被固定在光滑且平整的微筛表面上,从而简化了用于肿瘤细胞分类和列举的成像过程。

[0074] 实施例 3

[0075] 利用 EuroPlasma CD3000 处理 SU-8 微筛,以改变其表面性能。该系统通过在低温下的气体电磁放电利用低压等离子体技术。等离子体与 SU-8 表面相互作用并且改变了其表面性能。使用 100W 的电磁功率,使用氧气(O<sub>2</sub>)和甲烷(CH<sub>4</sub>)激发的等离子体 5min 和 10min,在 10mTorr 的基准压力下进行这种等离子体处理。一些实验使用 O<sub>2</sub> 等离子体预处理 10min 来进行。在表面处理之后观察到表面接触角大大减小(大约 60°)(参见表 1)。这种表面处理减小了 SU-8 微筛的流体阻力,从而获得了如图 5 所示的迅速的全血过滤。也可以应用其他表面处理,如用生物相容性的聚对二甲苯薄膜(小于 5 $\mu$ m)、抗污垢的聚(乙二醇)-硅烷、细胞外基质材料和基质胶涂布已制作的微筛。

[0076] SU-8 微筛具有极低的流体阻力。使用受到 5kPa 真空压力的微筛在 4min 内有效地过滤未稀释的全血(4.5ml)(图 5(c))。当装置用氧气/甲烷等离子体处理时,过滤时间进一步降低至小于 2min(图 5(b))。表 2 比较了已知的硅、聚对二甲苯、聚碳酸酯和本发明的 SU-8CTC 微筛的计算出的压降( $\Delta P_{n-ch}$ )和最大负载压力( $P_{max}$ )。具有两层结构的 SU-8 微筛提供了分别比聚碳酸酯和聚对二甲苯高 52 倍和 89 倍的机械强度。

[0077] 表 1. 使用各种等离子体处理条件的 SU-8 微筛的表面接触角

[0078]

|        | 未处理   | 使用 10 min O <sub>2</sub> 预处理<br>5 min 处理 | 使用 10 min O <sub>2</sub> 预处理<br>10 min 处理 | 没有 O <sub>2</sub> 预处理<br>5 min 处理 | 没有 O <sub>2</sub> 预处理<br>10 min 处理 |
|--------|-------|--|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| SU-8 1 | 82.1° | 23.0°                                    | 22.4°                                     | 23.7°                             | 19.5°                              |
| SU-8 2 | 88.1° | 21.9°                                    | 22.1°                                     | 24.3°                             | 25.8°                              |
| SU-8 3 | 81.1° | 22.1°                                    | 22.5°                                     | 23.3°                             | 17.1                               |

[0079] 表 2. CTC 过滤用的膜材料的比较

| 材料      | $E$<br>(Gpa) | $\sigma_{yield}$<br>(MPa) | $h$<br>( $\mu\text{m}$ ) | $l$<br>(mm) | $p$  | $P_{max}$<br>(10 <sup>4</sup> Pa) | $\Delta P_{n-ch}$<br>(Pa) |
|---------|--------------|---------------------------|--------------------------|-------------|------|-----------------------------------|---------------------------|
| 聚对二甲苯 C | 4.5          | 59                        | 6                        | 5           | 0.3  | 0.33                              | 50                        |
| SU-8    | 5            | 100                       | 60                       | 1           | 0.4  | 29.4                              | 172                       |
| 聚碳酸酯    | 2.6          | 70                        | 10                       | 5           | 0.15 | 0.56                              | 125                       |
| 硅       | 190          | 7000                      | 100                      | 5           | 0.4  | 936                               | 277                       |

[0080]  $n$  个相同的平行通道的压降( $\Delta P_{n-ch}$ )和有孔的膜的最大负载压力( $P_{max}$ ) [10] 由下式给出:

$$\Delta P_{n-ch} = \frac{\mu Q}{n(d/2)^3} \left[ \frac{16}{\pi} \left( \frac{h}{d} \right) + 3 \right] \quad \text{和} \quad P_{max} \approx 0.58 \frac{h \sigma_{yield}^{3/2}}{l E^{1/2}} (1-p)$$

$h$ : 通道长度;  $Q$ : 流量(1 ml/min);  $\mu$ : 载体的粘度(3.8 cps);  $d$ : 通道直径(10  $\mu\text{m}$ );  
 $E$ : 杨氏模量;  $\sigma_{yield}$ : 屈服应力;  $l$ : 支撑杆之间的距离;  $p$ : 膜的多孔率。

[0081] 实施例 4

[0082] 除了循环肿瘤细胞过滤之外, SU-8 微筛还可以用于微筛上的细胞培养和癌症药物研究, 如图 6 所示。将在微筛表面上的捕获的 CTC 运送至细胞培养基, 并且在培养箱中培养整夜。使用诸如二甲苯磺酸拉帕替尼、吉非替尼、曲妥单抗、西妥昔单抗和贝伐单抗等癌症-特异性药物化合物选择性地处理经培养的细胞, 以进行细胞响应研究和药物筛选。在该应用中, 微筛支撑环的结构可以用作微孔的物理壁。这个特征可以用于多种药物研究, 如同在微量滴定板中一样。

[0083] 实施例 5

[0084] 对于一些应用而言, 制作的 SU-8 微筛与塑料支架一体化, 如图 7 所示。三种不同设计被研制出来: 具有简单的出口、具有一体化的鸭嘴形阀 (DU 027. 001S, MiniValve, USA) 的出口或具有嵌入式小孔的出口。当施加的压力低于其阈值压力时鸭嘴形阀关闭, 而嵌入式小孔将在出口上施加表面张力。这些结构被设计用于流体阻力的控制。当施加的压力低于鸭嘴形阀或嵌入式小孔的设计阈值力时, 流体将被限制在微筛和轮廓之间的底腔中。这个特征使得微筛上的细胞能够用还原剂染色。其还可以用于微筛上的细胞培养和药物响应研究。

[0085] 尽管已经参照特定实施方案具体显示并描述了本发明, 但是本领域技术人员应该理解的是, 在不背离所附权利要求书限定的本发明精神和范围的情况下, 可以作出形式和细节上的各种改变。因此, 本发明的范围由所附权利要求书指示, 因而在权利要求书的等同物的含义和范围内的所有变化都意图被涵盖。

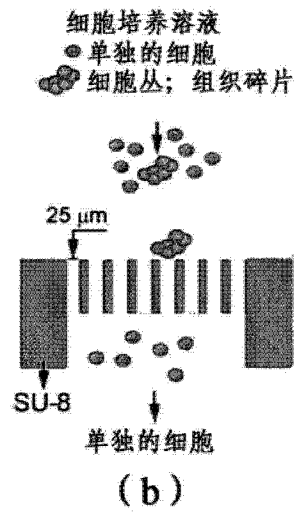
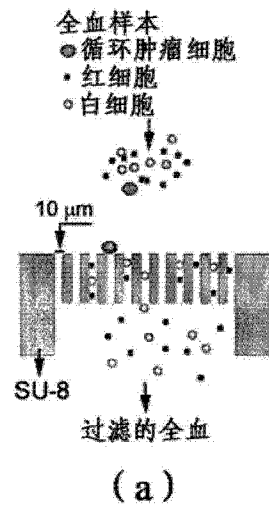


图 1

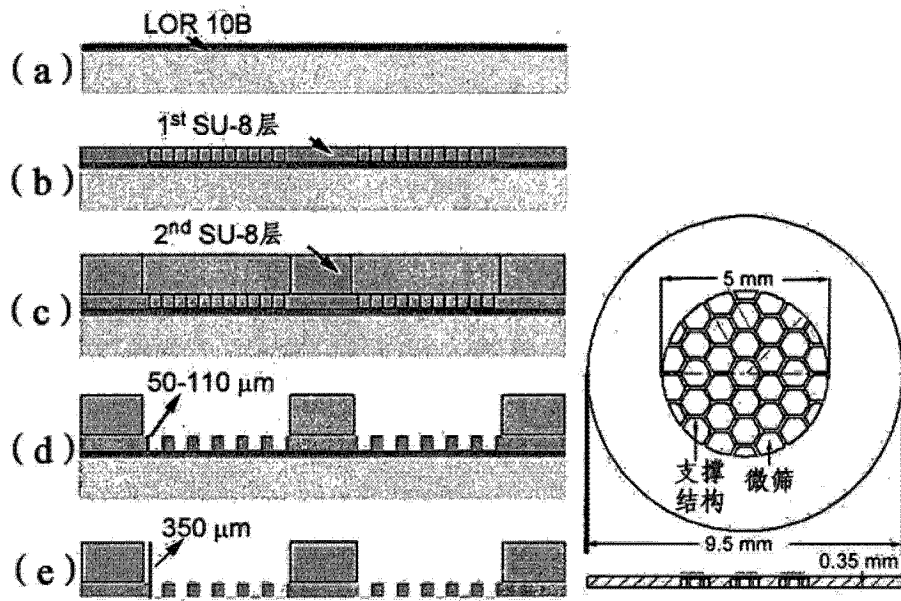


图 2

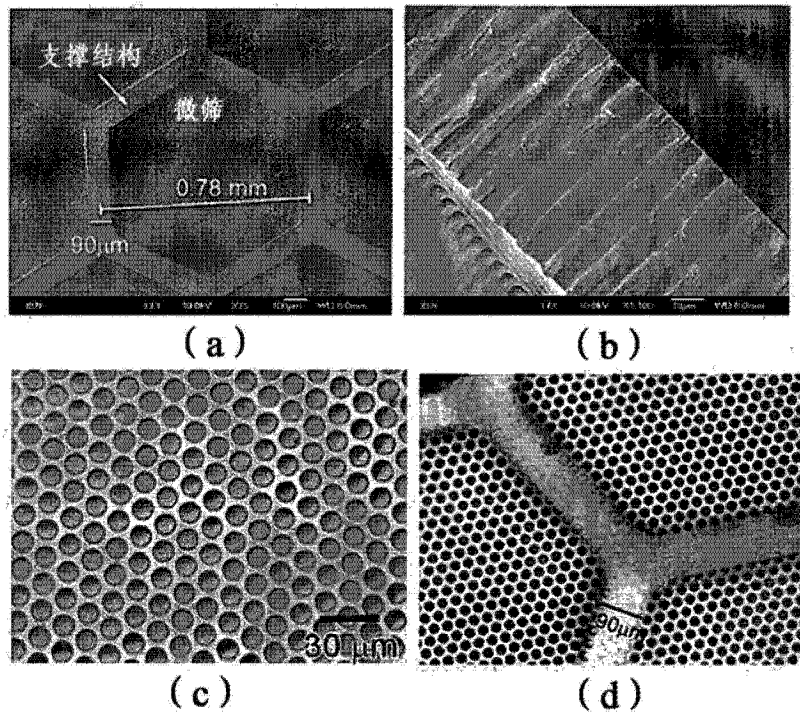


图 3

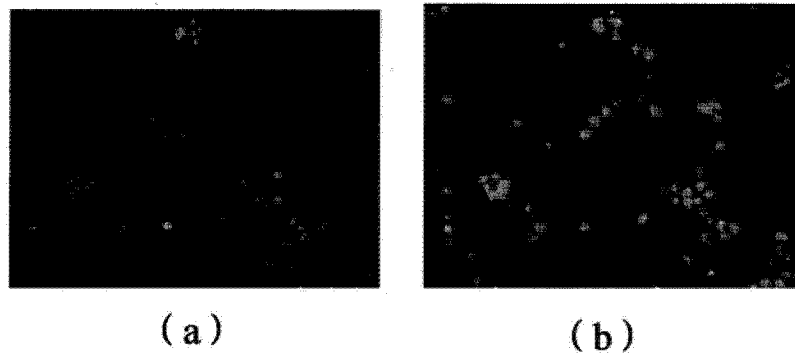


图 4

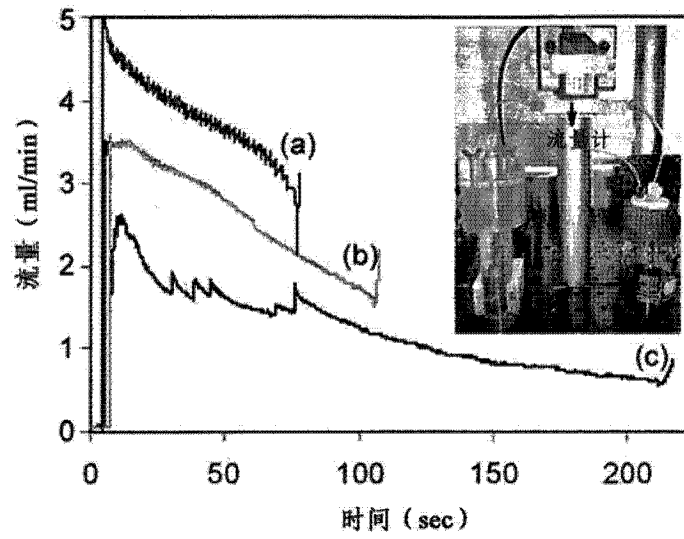


图 5

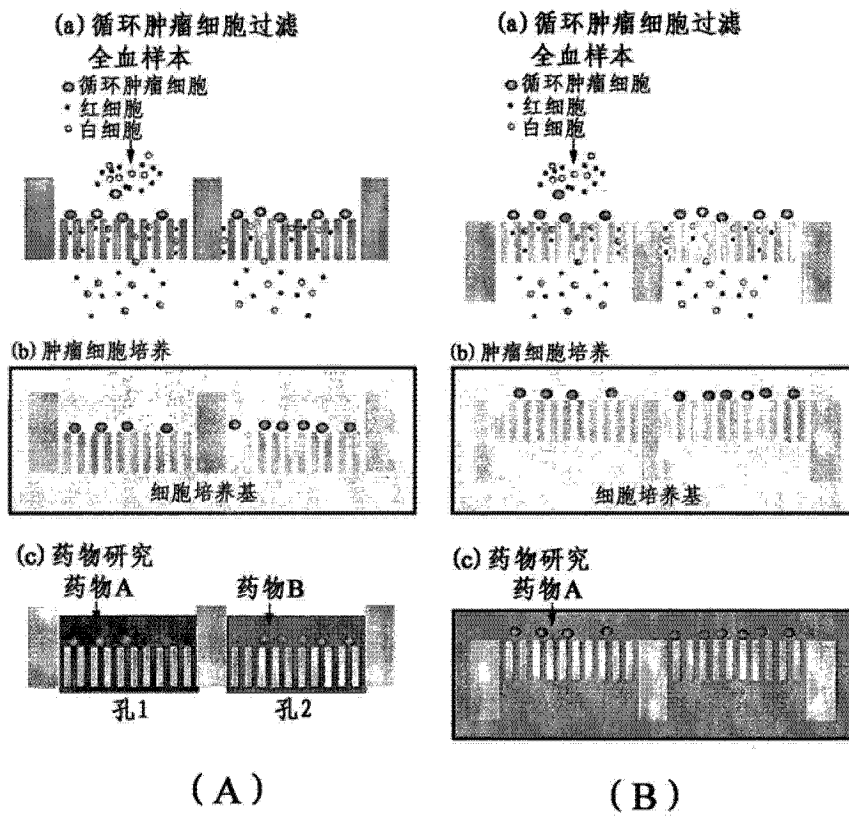


图 6

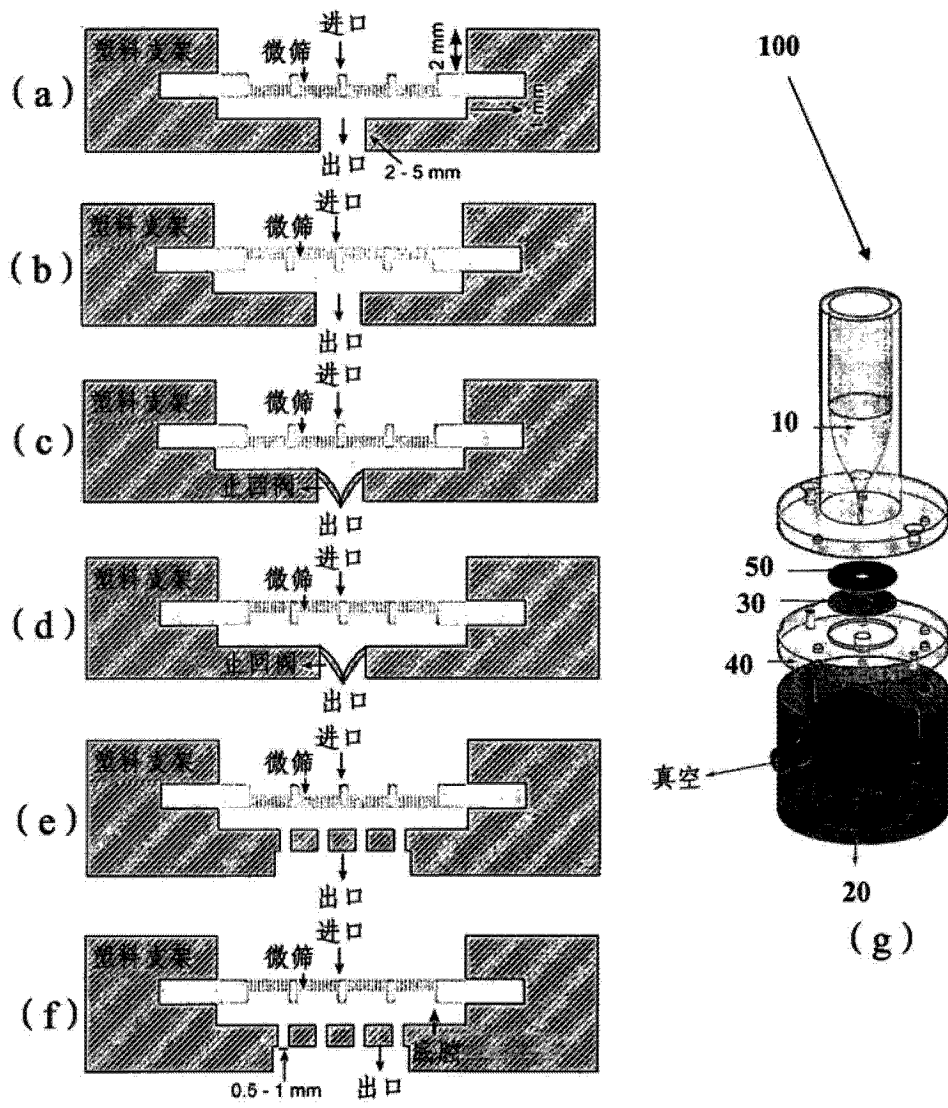


图 7