



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109791146 A

(43)申请公布日 2019.05.21

(21)申请号 201780055162.7

(22)申请日 2017.07.07

(30)优先权数据

62/359,322 2016.07.07 US

62/407,767 2016.10.13 US

62/454,235 2017.02.03 US

62/478,904 2017.03.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.07

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/041038 2017.07.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/009756 EN 2018.01.11

(71)申请人 范德比尔特大学

地址 美国田纳西州

(72)发明人 斯尼德·E·米勒

查尔森·S·贝尔

托德·D·希奥尔希奥

安德鲁·L·库克

(74)专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

代理人 谢攀 刘继富

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/00(2006.01)

G01N 33/48(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

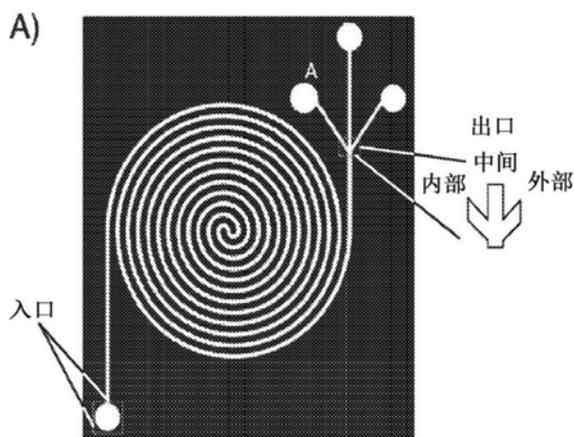
权利要求书5页 说明书20页 附图18页

(54)发明名称

用于检测、捕获或去除疾病物质的流体装置

(57)摘要

本公开涉及一种流体装置以检测、捕获和/或去除生物流体中的疾病物质。本发明还涉及使用要求保护的装置来治疗/预防脓毒症的方法。



1. 一种流体装置包括：
至少一个入口；
至少一个出口；
在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道，所述通道包括内壁；和
配体，其涂覆多向通道的内壁的至少一部分。
2. 根据权利要求1所述的装置，其中，所述配体选自：抗体、肽、蛋白质、抗生素、聚合物、适配体、配体、肿瘤坏死因子、黏附受体、E-选择蛋白、细胞因子、化疗剂、群体感应蛋白或受体以及生物制剂。
3. 根据权利要求1所述的装置，其中，所述配体是抗生素。
4. 根据权利要求3所述的装置，其中，所述抗生素是黏菌素。
5. 根据权利要求3所述的装置，其中，所述抗生素是万古霉素。
6. 根据权利要求1所述的装置，其中，所述配体是抗体。
7. 根据权利要求1至6中任一项所述的装置，其中，出口包括至少三个出口通道。
8. 根据权利要求1至6中任一项所述的装置，其中，所述装置耦合到光学读取器。
9. 一种用于从血液在体外捕获并去除血源性疾病物质的方法，将通过该方法处理过的血液返回给患者，所述方法包括以下步骤：
将血液从患者泵送到流体装置中，其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道；
使所述血液流过所述流体装置，以使所述血源性物质集中并暴露于沿着流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体；
集中并捕获疾病物质，其中由流体装置施加的力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的通道壁附近，然后靶向疾病物质的配体与所述疾病物质结合；
从所述血液中去掉所述疾病物质以产生处理过的血液；以及
将所述处理过的血液返回给所述患者。
10. 根据权利要求9所述的方法，其中，疾病物质具有不同于健康物质的大小、硬度、黏附性、分子组成、基因组成或其组合。
11. 根据权利要求9或10所述的方法，其中，所述血液是全血。
12. 根据权利要求9至11中任一项所述的方法，其中，以约0.1mL/min至约200mL/min的流速引入血液。
13. 根据权利要求9至12中任一项所述的方法，其中，疾病物质以约40%至约100%的效率分离。
14. 根据权利要求9至13中任一项所述的方法，其中，通道具有限定纵横比的长度、横截面和水力直径，所述纵横比适于基于疾病物质的大小沿着通道的横截面的至少一部分相对于健康物质来隔离疾病物质。
15. 根据权利要求9至14中任一项所述的方法，其中，所述疾病物质是包括以下各项中的一种或多种的疾病物质：癌细胞、循环肿瘤细胞、肽、β淀粉样物质、蛋白质、酶、毒素、患病细胞、感染性微生物、细胞、寄生虫、真菌、病毒、微生物、细菌、细菌毒素、群体感应蛋白或受体、脂多糖、细胞因子、IL-1β、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IL-13、IL-15、IL-16、肿瘤坏死因子、降钙素原、病原体相关分子模式、C反应蛋白或与肝衰竭相关的小的或与蛋白

质结合的生物分子。

16. 根据权利要求9至15中任一项所述的方法,所述方法还包括将所述流体装置暴露于辐射以破坏所述疾病物质的步骤。

17. 根据权利要求9至16中任一项所述的方法,所述方法还包括向所述流体装置施加热量以破坏所述疾病物质的步骤。

18. 根据权利要求17所述的方法,所述方法还包括在将所述处理过的血液返回给所述患者之前冷却所述流体装置以使所述血液冷却至正常体温的步骤。

19. 根据权利要求9至18中任一项所述的方法,所述方法还包括对由所述靶向疾病物质的配体捕获并且被标记的所述疾病物质进行分析的步骤。

20. 根据权利要求9至19中任一项所述的方法,所述方法还包括对在所述流体装置中捕获的所述疾病物质的量进行定量的步骤。

21. 根据权利要求9至20中任一项所述的方法,所述方法还包括用荧光标记在所述流体装置中捕获的疾病物质以用于疾病物质分析和鉴定的步骤。

22. 根据权利要求9至21中任一项所述的方法,其中,所述流体装置包括至少一个入口、至少一个出口和用于使所述疾病物质集中并将其去除的螺旋通道。

23. 根据权利要求9至22中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用所述靶向疾病物质的配体功能化以捕获疾病物质。

24. 根据权利要求9至23中任一项所述的方法,其中,所述流体装置用至少两种不同的靶向疾病物质的配体功能化,其中每种靶向疾病物质的配体能够附着血浆活性物质。

25. 根据权利要求9至24中任一项所述的方法,其中,所述流体装置包括多个支柱,其中每个支柱用所述靶向疾病物质的配体功能化。

26. 根据权利要求9至25中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用靶向疾病物质的纳米颗粒功能化。

27. 根据权利要求9至26中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用靶向疾病物质的微粒功能化。

28. 根据权利要求9至27中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用靶向疾病物质的纤维功能化。

29. 一种用于从血液中捕获并检测血源性疾病物质的方法,所述方法包括以下步骤:

使血液流入流体装置,以使所述血源性疾病物质集中并暴露于沿着流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;其中流体装置内的通道包括螺旋通道;

捕获疾病物质,其中由流体装置施加的力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的螺旋通道壁附近,然后该靶向疾病物质的配体与所述疾病物质结合;

使光学活性的疾病物质靶向微珠流过与所述疾病物质结合的流体装置;以及
用光学读取器读取流体装置。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中,疾病物质具有与健康物质不同的大小、硬度、黏附性、分子组成、基因组成或其组合。

31. 根据权利要求29或30所述的方法,其中,所述血液是全血。

32. 根据权利要求29至31中任一项所述的方法,其中,以约0.1mL/min至约200mL/min的流速引入血液。

33. 根据权利要求29至32中任一项所述的方法,其中,疾病物质以约40%至约100%的效率分离。

34. 根据权利要求29至33中任一项所述的方法,其中,螺旋通道具有限定纵横比的长度、横截面和水力直径,所述纵横比适于基于疾病物质的大小沿着通道的横截面的至少一部分相对于健康物质来隔离疾病物质。

35. 根据权利要求29至34中任一项所述的方法,其中,所述疾病物质是包括以下各项中的一种或多于一种的疾病物质:癌细胞、循环肿瘤细胞、肽、 β 淀粉样物质、蛋白质、酶、毒素、患病细胞、感染性微生物、细胞、寄生虫、真菌、病毒、微生物、细菌、细菌毒素、群体感应蛋白或受体、脂多糖、细胞因子、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IL-13、IL-15、IL-16、肿瘤坏死因子、降钙素原、病原体相关分子模式、C反应蛋白、或与肝衰竭相关的小的或与蛋白质结合的生物分子。

36. 根据权利要求29至35中任一项所述的方法,所述方法还包括对由所述靶向疾病物质的配体捕获并且用光学活性微珠标记的所述疾病物质进行分析的步骤。

37. 根据权利要求29至36中任一项所述的方法,所述方法还包括对在所述流体装置中捕获的所述疾病物质的量进行定量的步骤。

38. 根据权利要求29至37中任一项所述的方法,所述方法还包括用荧光标记在所述流体装置中捕获的疾病物质以用于疾病物质分析和鉴定的步骤。

39. 根据权利要求29至38中任一项所述的方法,其中,所述流体装置包括至少一个入口、至少一个出口和用于使引入所述流体装置的流体中的疾病物质集中并去除所述疾病物质的通道构造。

40. 根据权利要求29至39中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用所述靶向疾病物质的配体功能化以捕获疾病物质。

41. 根据权利要求29至40中任一项所述的方法,其中,所述流体装置用至少两种靶向疾病物质的配体功能化,其中每种靶向疾病物质的配体能够附着血浆活性物质。

42. 根据权利要求29至41中任一项所述的方法,其中,所述流体装置包括多个支柱,其中每个支柱用所述靶向疾病物质的配体功能化。

43. 根据权利要求29至42中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用靶向疾病物质的纳米颗粒功能化。

44. 根据权利要求29至43中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用靶向疾病物质的微粒功能化。

45. 根据权利要求29至44中任一项所述的方法,其中,所述流体装置的内表面用靶向疾病物质靶向的纤维功能化。

46. 一种用于治疗或预防患者的脓毒症的方法,所述方法包括以下步骤:

将血液从患者泵送到流体装置中,其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道;

使所述血液流过所述流体装置,以使所述血源性疾病物质集中并暴露于沿着多向通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;

集中并捕获疾病物质,其中由流体装置施加的力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的通道壁附近,然后靶向疾病物质的配体与所述疾病物质结合;

从所述血液中去掉所述疾病物质以产生处理过的血液;以及
将处理过的血液返回给患者。

47. 根据权利要求46所述的方法,其中,疾病物质具有与健康物质不同的大小、硬度、黏附性、分子组成、基因组成或其组合。

48. 根据权利要求46或47所述的方法,其中,所述血液是全血。

49. 根据权利要求26至48中任一项所述的方法,其中,以约0.1mL/min至约200mL/min的流速引入血液。

50. 根据权利要求26至49中任一项所述的方法,其中,疾病物质以约40%至约100%的效率分离。

51. 根据权利要求26至50中任一项所述的方法,其中,通道具有限定纵横比的长度、横截面和水力直径,所述纵横比适于基于疾病物质的大小沿着通道的横截面的至少一部分相对于健康物质来隔离疾病物质。

52. 一种用于从生物流体中捕获并去除疾病物质的方法,所述方法包括以下步骤:

将生物流体引入流体装置,其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道;

使所述生物流体流过所述流体装置,以使所述疾病物质集中并暴露于沿着所述流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;

通过疾病物质与结合到通道内壁的靶向疾病物质的配体的结合来捕获疾病物质;以及
从所述生物流体中去掉所述疾病物质。

53. 根据权利要求52所述的方法,其中,流体装置包括螺旋通道。

54. 根据权利要求52或53所述的方法,其中,所述生物流体是血液。

55. 一种物质组合物,其包括已经流过流体装置的生物流体,其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道,所述通道包括内壁,所述内壁具有涂覆所述内壁的至少一部分的配体,其中这种配体与所述生物流体中的疾病物质结合并且从所述生物流体中去掉疾病物质。

56. 根据权利要求55所述的物质组合物,其中,所述生物流体是血液。

57. 根据权利要求55或56所述的物质组合物,其中,流体装置包括螺旋通道。

58. 一种用于从生物流体中捕获并检测疾病物质的方法,所述方法包括以下步骤:

使血液流入包括通道的流体装置内,所述通道具有沿着流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;

通过疾病物质与靶向疾病物质的配体结合来捕获疾病物质;

隔离疾病物质;以及

培养疾病物质。

59. 根据权利要求58所述的方法,其中,所述生物流体是血液。

60. 根据权利要求58或59所述的方法,其中,所述通道是螺旋通道。

61. 一种用于从生物流体中捕获并检测疾病物质的方法,所述方法包括以下步骤:

使血液流入包括通道的流体装置内,所述通道具有沿着流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;

通过疾病物质与靶向疾病物质的配体结合来捕获疾病物质;

隔离疾病物质;以及
通过选自聚合酶链反应(PCR)、荧光原位杂交(FISH)和基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF)的方法来鉴定疾病物质。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中,所述生物流体是血液。

63. 根据权利要求61或62所述的方法,其中,所述通道是螺旋通道。

用于检测、捕获或去除疾病物质的流体装置

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年7月7日提交的序列号为62/359,322的美国临时专利申请、2016年10月13日提交的序列号为62/407,767的美国临时专利申请、2017年2月3日提交的序列号的62/454,235的美国临时专利申请和2017年3月30日提交的序列号62/478,904的美国临时专利申请的优先权,其中每一个都通过引用明确地并入本文。

[0003] 关于联邦政府资助研究的声明

[0004] 本发明是在美国国防部授予的授权号W81XWH-13-1-0397的政府支持下完成的。政府拥有本发明的一些权利。

技术领域

[0005] 本公开涉及一种流体装置以检测、捕获和/或去除来自生物流体的致病物质。

背景技术

[0006] 许多疾病以及与疾病相关的细胞和与疾病相关的分子都是血液传播的。例如,循环血液中存在细菌会引发能够导致脓毒症的局部和全身调节机制的级联反应。脓毒症被定义为宿主对感染的响应失调而引起的危及生命的器官功能障碍,美国每年有超过一百万例脓毒症患者,并且相关的死亡率为25%-50%。在美国脓毒症是危重症病人死亡的主要原因,美国每年在治疗脓毒症上花费超过200亿美元。虽然平均预期寿命增加以及侵入性治疗的数量扩大,脓毒症的发病率仍在上升。目前,没有可用的特定的脓毒症治疗。对脓毒症的治疗主要依赖于早期发现和快速施用适当的抗生素、液体复苏和血管活性药物。早期,有效的抗生素疗法是至关重要的并且改善了对患者的治疗效果。然而,与脓毒症相关的死亡率仍然令人不可接受且持续居高不下,这使得迫切需要新的脓毒症疗法。

[0007] 已经进行了大量的研究以评估用于脓毒症的实验性辅助治疗,例如体外细胞因子过滤、重组人活化蛋白C、皮质类固醇、人重组乳铁蛋白和免疫调节。尽管已经广泛预期了免疫调节,但患者人群的异质性和脓毒症发病机理的复杂性限制了这些实验方法的进步。单种介质的阻断,例如白细胞介素-1 (IL-1) 或肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的阻断,在改善脓毒症存活率方面几乎没有希望。在动物研究中细胞因子去除显示出令人鼓舞的结果。然而,结果被认为是调节其他下游机制的结果而不是细胞因子去除的直接影响的结果。在动物研究中内毒素清除的益处也显示出了有效性,但还未证明对脓毒症患者的治疗效果有所改善。

[0008] 已经报道了使用磁性纳米颗粒的机械去除细菌来改善脓毒症啮齿动物模型的存活率。使用细菌靶向配体对纳米颗粒进行的表面改性能够有效且可重复地捕获几种重要致病细菌。然而,这些方法在用于大型生命系统的治疗的扩大方面存在潜在限制,并且在血液与纳米颗粒接触方面存在不确定的调节障碍。在分离之前还需要将细菌细胞与纳米颗粒进行孵育。该孵育时间允许细菌复制而增加数量。此外,存在于血液中的磁性纳米颗粒可能扩散到器官中而引起生物相容性问题。解决单一分子活化剂/抑制剂的治疗或解决细菌来源的分离的治疗不太可能充分解决脓毒症的复杂性。

[0009] 目前用于治疗菌血症或脓毒症的方法还包括抗生素的使用。然而,病原体迅速获得抗菌逃避能力或多重耐药性,并且全身抗生素施用能并发大量负面的副作用。已经采用各种吸附剂和其他的常规的膜过滤方法来检测或过滤血液中的疾病物质,利用细胞大小、可变形性和密度的不同来过滤靶细胞。然而,这些技术是耗时的、劳动密集型的并且需要多步样品制备。多步样品制备是易受污染的过程,并且对于护理治疗目的而言不足够有效。膜过滤方法存在频繁堵塞的问题并需要清理。此外,过滤和离心技术会对需要返回到患者的健康细胞造成压力。因此,需要更简单和更有效的技术来处理血液样本以去除疾病物质和疾病细胞,同时保持健康细胞的原始细胞表型以便随后返回给患者。

[0010] 本文所公开的流体装置和方法解决了这些和其他的需求。

发明内容

[0011] 发明人设计了一种能够从全部的人体血液中去除病原体和内毒素的装置,从而解决了脓毒症中失调的生物反应的两个根本原因。该装置能够克服先前的脓毒症疗法的局限性,该先前的脓毒症疗法依赖于从血液中去掉单个脓毒症相关介质。去除包括耐抗生素菌株的病原体和内毒素为脓毒症的治疗提供了新的范例。

[0012] 本文所描述的装置和方法允许待处理的生物流体(诸如患者的全血量)在单次治疗期间多次通过该装置。通过使血液循环通过该装置若干次使得血流中致病物质的含量明显降低。从血流中去掉细菌能够减少感染因子向远端部位的传播。这减少了器官或脓肿中存在的病原体的数量,并且降低了炎症介质的水平。

[0013] 减少致病物质的总量能够直接抑制疾病发展,并且因此,这种治疗能够明显延长可用于鉴定例如引起感染的细菌物种的时间,并且开始进行最佳抗生素疗法。此外,因为功能化到通道壁的配体与死亡病原体和活病原体结合,所述抗生素疗法能够与这种细菌去除疗法并用。该装置还能够用于帮助加速病原体鉴定和抗生素敏感性测定,这是因为在单次通过时,大量的细菌在装置内被捕获。

[0014] 此外,还能够通过利用合适的蛋白质特异性配体或细胞特异性配体使通道壁功能化来进一步改进该装置以从全血中去掉蛋白质(例如细胞因子)以及其他类型的细胞(例如循环肿瘤细胞)。

[0015] 再进一步,该装置能够用于隔离和鉴定致病物质,而不是依靠该装置从患者的血流中基本上去除致病物质。这种对隔离和鉴定的聚焦能够允许迅速制定和开始治疗过程。

[0016] 本文公开了一种用于从生物流体中检测、捕获和/或去除致病物质(例如,细菌)的装置。

[0017] 本文还公开了治疗方法,其中这种装置用于从这些生物流体中分离出这种致病物质。

[0018] 再进一步,本文公开了治疗方法,其中这种装置用于鉴定来自生物流体的致病物质,使得可以制定进一步的后续治疗过程。

[0019] 更具体地,本文公开了一种流体装置,包括:

[0020] 至少一个入口;

[0021] 至少一个出口;

[0022] 在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道,所述通道包括内壁;和

- [0023] 配体,其涂覆多向通道的内壁的至少一部分。
- [0024] 还公开了一种用于从生物流体中捕获并去除疾病物质的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0025] 将生物流体引入流体装置,其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在该至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道;
- [0026] 使所述生物流体流过所述流体装置,以使所述疾病物质集中并暴露于沿着流体装置内的所述通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;
- [0027] 通过疾病物质与结合到通道内壁的靶向疾病物质的配体结合来捕获疾病物质;以及
- [0028] 从所述生物流体中去除所述疾病物质。
- [0029] 更进一步,本文公开了一种用于从血液中体外捕获并去除血源性疾病物质的方法,将通过该方法处理过的血液返回给患者,所述方法包括以下步骤:
- [0030] 将血液从患者泵送到流体装置中,其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在该至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道;
- [0031] 使所述血液流过所述流体装置,以使所述血源性物质集中并暴露于沿着流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;
- [0032] 集中并捕获疾病物质,其中由流体装置施加的力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的通道壁附近,该靶向疾病物质的配体然后与所述疾病物质结合;
- [0033] 从所述血液中去掉所述疾病物质以产生处理过的血液;并且
- [0034] 将所述处理过的血液返回给所述患者。
- [0035] 更进一步,公开了一种用于从血液中捕获并检测血源性疾病物质的方法,所述方法包括以下步骤:
- [0036] 使血液流入流体装置,以使所述血源性物质集中并暴露于沿着流体装置内的通道的内壁功能化的靶向疾病物质的配体;其中流体装置内的通道包括螺旋通道;
- [0037] 捕获疾病物质,其中由流体装置施加的力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的螺旋通道壁附近,然后该靶向疾病物质的配体与所述疾病物质结合;
- [0038] 使光学活性的疾病物质靶向微珠流过与所述疾病物质结合的流体装置;以及
- [0039] 用光学读取器读取流体装置。
- [0040] 更进一步地,公开了一种物质组合物,其包括已经流过流体装置的生物流体,其中流体装置包括至少一个入口、至少一个出口以及在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道,所述通道包括内壁,所述内壁具有涂覆所述内壁的至少一部分的配体,其中这些配体与所述生物流体中的疾病物质结合并从所述生物流体中去除疾病物质。
- [0041] 更进一步,本文公开了一种用于从血液中体外捕获并去除疾病物质的方法,将通过该方法处理过的血液返回给患者,所述方法包括以下步骤:
- [0042] 将血液从患者泵入基于螺旋的流体装置;
- [0043] 使所述血液流过所述基于螺旋的流体装置,以使所述疾病物质集中并暴露于沿着螺旋流体装置内壁功能化的靶向疾病物质的配体;
- [0044] 集中并捕获疾病物质,其中由基于螺旋的流体装置施加的基于尺寸的惯性力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的螺旋通道的壁附近,然后所述靶向疾病物质

的配体与所述疾病物质结合；

[0045] 从所述血液去除所述疾病物质；以及

[0046] 将所述血液返回给患者。

[0047] 更进一步，公开了一种用于从血液中捕获并检测疾病物质的方法，所述方法包括以下步骤：

[0048] 使血液流入流体装置，以使所述疾病物质集中并暴露于沿着流体装置内壁功能化的靶向疾病物质的配体；

[0049] 集中并捕获疾病物质，其中由流体装置施加的基于尺寸的惯性力将疾病物质集中在用靶向疾病物质的配体功能化的螺旋通道的壁附近，然后所述靶向疾病物质的配体与所述疾病物质结合；

[0050] 使光学活性的疾病物质靶向微珠流过与所述疾病物质结合的流体装置；以及

[0051] 用光学读取器读取流体装置。

附图说明

[0052] 附图并入在本说明书中并构成其一部分，附图示出了下面描述的几个方面。

[0053] 图1包含本发明范围内的各种多向流体装置的示意图。图1A是包含6环双螺旋通道的多向流体装置的示意图，6环双螺旋通道具有用于捕获颗粒/细菌的一个入口和三个出口。图1B是通过与靶向细菌的配体——黏菌素-PEG-硅烷 (Col-PEG-Si) ——相互作用来分离细菌的多向通道的示意图，该配体与微通道的内壁结合。

[0054] 图2示出了多向通道的内壁，其中配体黏菌素-PEG-硅烷与所述多向通道的内壁结合，并且用于捕获细菌。图2A是黏菌素-PEG-硅烷 (Col-PEG-Si) 覆着的内通道壁的示意图。图2B示出了分子黏菌素，其包含五个胺基团，其中一个用于与PEG缀合，产生Col-PEG-Si配体，从而留下四个剩余的胺基团与微通道内的细菌细胞相互作用并结合。图2C示出了在Col-PEG-Si捕获细菌并随后暴露于Atto 488胺染料之后使用荧光显微镜成像的微通道。

[0055] 图3示出了促进2 μ m聚苯乙烯颗粒集中的微通道纵横比 (AR)。该颗粒大小与大多数细菌细胞的大小相当。平均合成图像示出了在0.2mL/min的流速下2 μ m颗粒的平衡。微通道尺寸在通道的整个长度上是一致的，由254 μ m宽和15 μ m高组成。该示意图表示在到达三叉出口之前2 μ m聚苯乙烯颗粒在微通道横截面内的大致位置 (虚线表示通道壁的大致位置)。

[0056] 图4示出了指示使用要求保护的流体装置分离细菌细胞的图像。这里，在剪切调节的惯性力的影响下，细菌 (用荧光标记的鲍曼不动杆菌 (*Acinetobacter baumannii*) 细胞) 沿着功能化的微通道壁平衡并与配体 (Col-PEG-Si) 结合。这在所示的特定区域中很明显：(A) 入口通道后的第一个回路，(B) 回路中心，和 (C) 随着细菌保持移位到微通道中心的任一侧时恰好在到达通道的三叉出口之前的通道 (白色虚线表示通道壁)。通过使用荧光标记的细菌以0.2mL/min的流速流过通道来进行实验。然后用二次H₂O洗涤通道四次，并且然后使用荧光显微镜成像。如上图所示，细菌在洗涤步骤后仍保持与通道壁结合。

[0057] 图5A示出了可用于细菌分离的双螺旋微通道构造。该构造包括单个入口和三个等分的出口。图5B是示出了双螺旋微通道的出口部分的显微图像。

[0058] 图6是含有疾病物质 (即杆状细胞) 的血液的图示，所述疾病物质 (即杆状细胞) 从患者体内通过管被泵送到要求保护的流体装置，该流体装置被利用具有设计用于捕获疾病

物质的靶向疾病物质的配体沿着通道壁功能化。在通过要求保护的流体装置处理之后,包含健康物质的血液返回到患者。

[0059] 图7是流体装置通道内的力的示意图。这里,由于通道曲率,两个反向转动的Dean力与主流动方向正交。Dean力使所需的健康物质(即,红色、血细胞)在通道的中心再循环。疾病物质(即绿色、疾病物质)受惯性升力的作用,该惯性升力将目标疾病物质集中在配体功能化通道壁附近,而健康物质在通道中心管腔中保持自由。

[0060] 图8是根据本发明的实施方案的设计成靶向并捕获疾病物质的螺旋形流体装置的另一图示。

[0061] 图9是螺旋形流体装置的另一个图示,其描绘了惯性力如何将目标疾病物质(在这种情况下是细菌)集中在配体功能化通道壁附近,而健康物质(即血细胞)在通道中心管腔中保持自由。

[0062] 图10是使用荧光显微镜拍摄的图像,该荧光显微镜捕获集中在本发明范围内的基于螺旋的流体装置中的壁附近的疾病物质(左)。在流动条件下,健康物质(右)保持在基于螺旋的流体装置通道的中心。

[0063] 图11是根据本发明实施方案的由利用靶向疾病物质的配体功能化的颗粒(例如,纳米颗粒、微粒、纳米纤维或微纤维)组成的流体装置的壁的放大图。

[0064] 图12是根据本发明实施方案的包括支柱的基于螺旋的流体装置的放大图。

[0065] 图13示出了用于最大化细菌分离效率的双螺旋流体设计。(a)示出了制造的聚二甲硅氧烷(PDMS)流体装置,其由在S形接头处连接的两个6环螺旋微通道组成以形成具有一个入口和一个出口的双螺旋通道,(b)示出了用于制造主模具的双重螺旋流体模块的CAD图示。

[0066] 图14示出了集中在要求保护的装置的双螺旋通道构造内的微粒和细菌。图像是在 0.2 mL min^{-1} 的连续流速下获得的。(a)集中 $2\mu\text{m}$ 的颗粒;(b)集中 $10\mu\text{m}$ 的颗粒;(c)标记的鲍曼不动杆菌ATCC17978沿双螺旋微流体装置的内壁和外壁集中。

[0067] 图15示出了要求保护的装置的实施方案的一个构造的细菌捕获能力的定量的示例。当加入PBS并以 0.2 mL min^{-1} 流过黏菌素化的双螺旋微流体装置和PEG化的双螺旋微流体装置时,对革兰氏阴性细菌的病原体捕获能力单独考虑。a,鲍曼不动杆菌ATCC17978。b,肺炎克雷伯氏杆菌(*K.pneumoniae*) ATCC700603。c,抗黏菌素鲍曼不动杆菌‘患者2’。d,抗黏菌素鲍曼不动杆菌19606R。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。* $P<0.01$ 。

[0068] 图16示出了使用要求保护的流体装置的双螺旋构造的体外血液净化。a,捕获鲍曼不动杆菌ATCC17978的能力,当它加入到全部人体血液中并以 0.2 mL min^{-1} 流过黏菌素化和PEG化装置时。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。* $P<0.01$ 。b和c,在 0.2 mL min^{-1} 下通过黏菌素化装置以及随后的洗涤后从全人体血液中捕获绿色荧光标记的鲍曼不动杆菌ATCC17978。d,在 0.2 mL min^{-1} 下通过黏菌素化装置后捕获没有绿色荧光标记的金黄色葡萄球菌(*S.aureus*) ATCC29213,证实了黏菌素功能化装置中革兰氏阴性病原体的特异性。

[0069] 图17示出了本发明范围内的一种黏菌素双螺旋流体装置的总细菌捕获能力。针对所示的每种细菌菌株描述这种装置能够捕获的最大细菌量。加入PBS的鲍曼不动杆菌ATCC17978作为对照物。对鲍曼不动杆菌ATCC17978的捕获与对枯草芽孢杆菌(*B.subtilis*) 1A578的捕获明显不同。然而,对鲍曼不动杆菌ATCC17978的捕获与分别列出的任何其他细

菌的没有明显不同。对所列出的所有其他细菌(在血液中的肺炎克雷伯氏杆菌ATCC700603、鲍曼不动杆菌19606R、鲍曼不动杆菌‘患者2’和鲍曼不动杆菌ATCC17978)的最大捕获能力也与对枯草芽孢杆菌1A578的明显不同。使用单向ANOVA和随后的post hoc Tukey多重比较检验来比较数据。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。* $P<0.01$ 。

[0070] 图18显示了双螺旋流体装置的细菌捕获能力,其大于图17中所使用的双螺旋流体装置的细菌捕获能力。将加入PBS的鲍曼不动杆菌ATCC17978以 0.6 mL min^{-1} 流过黏菌素化和PEG化的双螺旋微流体装置(328mm长 \times 750 μm 宽 \times 15 μm 高)。在指示的时间内对微流体装置的鲍曼不动杆菌ATCC17978捕获能力进行量化。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。* $P<0.01$ 。

[0071] 图19示出了黏菌素固定在微通道壁上的示意图。使用NHS将硅烷-PEG-NHS通过L- α -二氨基丁酸(Dab)的胺侧链与黏菌素的五个相似的活性Dab³²残基中的一个连接。硅烷-PEG-NHS的NHS基团经由碳二亚胺化学共价与黏菌素抗生素的相当活性的胺残基中的任何单个结合,从而产生黏菌素-PEG-硅烷。黏菌素-PEG-硅烷的硅烷末端与基于PDMS的通道壁形成硅氧烷键,使黏菌素延伸到通道的管腔中。

[0072] 图20确认了微通道内黏菌素修饰。a,用ATTO 488NHS酯染料对黏菌素胺基团进行荧光标记。将ATTO 488NHS酯染料加入到黏菌素化装置,并且然后用PBS洗涤。着色表明微通道内存在黏菌素。b,使用DMSO中的ATTO 488NHS酯的标准稀释液产生标准荧光曲线。c,将由ATTO 488NHS酯染色的黏菌素化装置和ATTO 488NHS酯染色的PEG化装置产生的荧光与标准曲线进行比较。确定在黏菌素化双螺旋装置内存在 $1.76\mu\text{g}$ 黏菌素。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。

[0073] 图21示出了要求保护的发明的具有双螺旋微通道构型的装置内的黏菌素配体保留。使用黏菌素ELISA(Bioo Scientific)分析黏菌素化装置中黏菌素的释放。PBS缓冲液以 0.2 mL min^{-1} 连续流过黏菌素化微流体装置。在指示的时间点从出口捕获流体以分析可能从通道壁分离的黏菌素。在连续的流动下,在2小时的过程中从通道释放300ng黏菌素。这些水平的黏菌素是无毒的。重要的是,在大约40分钟后在出口流中没有检测到黏菌素,在使用前可以进行洗涤以从装置去除未连接的黏菌素。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。

[0074] 图22描绘了对革兰氏阳性细菌捕获的评估。当加入PBS并以 0.2 mL min^{-1} 流过黏菌素化和PEG化的双螺旋微流体装置时,对革兰氏阴性枯草芽孢杆菌1A578的病原体捕获能力。缺乏捕获表明黏菌素对于革兰氏阴性病原体的特异性。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。

[0075] 图23提供了对内毒素捕获能力的定量。将内毒素加入无内毒素的水(1 EU mL^{-1})中,并以 0.2 mL min^{-1} 流过黏菌素化和PEG化的双螺旋流体装置。评估随时间捕获的内毒素的量。结果绘制为平均值 \pm SD, $n=3$ 。

[0076] 图24是含有疾病物质(即杆状细胞)的血液的图示,将所述血液通过管泵送到基于螺旋的流体装置,流体装置被具有设计用于捕获疾病物质的靶向疾病物质的配体沿着通道壁功能化。

[0077] 图25是基于螺旋的流体装置通道内的力的示意图。由于通道曲率,两个反向转动的Dean力与主流动方向正交。Dean力使所需的健康物质(即红色、血细胞)在通道的中心再循环。疾病物质(即绿色、疾病物质)受惯性升力作用,该惯性升力将目标疾病物质集中在配体功能化通道壁附近,而健康物质在通道中心管腔中保持自由。

[0078] 图26是根据本发明实施方案的设计成靶向并捕获疾病物质的聚甲基丙烯酸甲酯

(PMMA)制造的流体装置的示意图。

[0079] 图27是形成由靶向疾病物质的配体组成的流体设备壁的图示。根据本发明的实施方案,形成靶向(A)黏菌素和(B)万古霉素疾病物质的配体。

[0080] 图28是由聚碳酸酯制成的本发明的扩大版本的图示。

[0081] 图29示出了本发明的流体装置的可替代实施方案。将样本或生物流体泵送/使其流过螺旋缠绕的通道,该通道例如可以是管道。该通道涂覆有靶向疾病物质的配体,从而允许捕获疾病物质,例如病原体。

具体实施方式

[0082] 本文公开了用于检测和捕获致病物质的流体装置和方法。在一些方面,本文公开了通过在基于螺旋的流体设备内使特定疾病物质集中并将其与所需的血液物质分离来从血液中去掉不需要的疾病物质的系统和方法,以避免与当前滤膜方法相关的堵塞问题。

[0083] 现在将详细参考本发明的实施方案,其实例在附图和实例中示出。然而,本发明可以以许多不同的形式实施,并且不应该被解释为限于这里所阐述的实施方案。

[0084] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。提供以下定义是为了完全理解本说明书中使用的术语。

[0085] 如本文中关于所要求保护的装置内的通道构件所使用的,“多向”指的是通道的方向改变至少一次。这种方向上的变化对于增加致病物质与衬在通道的内壁上的配体的接触是必要的。优选地,所要求保护的装置的多向通道包含方向上的多次变化。这能够通过使用多种构造来实现,本说明书中具体公开了其中的一些构造。多向通道的非限制性示例包括使用双螺旋(例如图1、图8)或曲线(图4B、图16B)。然而,应当理解,所要求保护的发明不限于所示出的构造,其他实例,包括部分圆形或螺旋形,也在本发明的范围内。

[0086] 如本文所使用的,“配体”是指与致病物质形成复合物的任何物质。

[0087] 如前所述,流体装置包括:

[0088] 到流体装置的至少一个入口;

[0089] 至少一个出口;

[0090] 在所述至少一个入口和至少一个出口之间的多向通道,所述通道包括内壁;和

[0091] 配体,其涂覆多向通道的内壁的至少一部分。

[0092] 装置的大小对其功能并不重要。然而,该装置的大小应使得多向通道的涂覆内壁的可用面积(以及因此通道的长度)足以满足其预期用途。这可以通过调整装置的大小或利用串联和/或并联配置的多个装置来实现。在通道仅存在于一个平面中的一些构造,装置的高度可以是非常小的,例如仅约15 μm 。

[0093] 尽管不旨在限于以下建议的大小范围,但多向通道的长度通常可以为0.0005cm至1000cm。优选地,装置的大小为0.1cm到500cm。最优选地,装置的大小为0.1cm到100cm。装置的整体大小并不重要,并且在很大程度上由多向通道的特定构造决定。

[0094] 所要求保护的装置内的多向通道的尺寸还应该根据其预期用途来确定。例如,如果打算其中所用的流体包含全细胞或细胞碎片,则通道的直径大小必须设定为适于它们通过并允许与通道中的配体涂层的预期的相互作用,同时避免堵塞问题。例如,如果预期的流

体包含较小的致病物质,则可以减小通道的直径大小。尽管不旨在限于以下建议的大小范围,但装置内通道的直径通常可以为0.001cm至1000cm。优选地,装置的大小为0.001cm到100cm。最优选地,装置的大小范围为0.01cm到30cm。附图中所示和/或实例中所讨论的一些装置使用直径大约为0.5cm的通道。

[0095] 所要求保护的装置具有到多向通道的至少一个入口和至少一个出口。同样,入口和出口的数量选择并不重要,而是可以根据预期用途变化以优化装置的性能。虽然不旨在受到以下入口范围的限制,但入口的数量通常可以为一个到三个不等。优选地,该装置包含一个至两个入口。最优选地,该装置仅具有一个入口。对于出口,该装置通常具有一个至五个出口。优选地,它具有一个至三个出口。最优选地,该装置具有一个出口。

[0096] 所要求保护的装置可以由任何生物相容性材料构成。优选的生物相容性材料是聚丙烯、聚四氟乙烯 (PTFE)、聚甲基丙烯酸甲酯 (PMMA)、聚二甲基硅氧烷、丙烯腈丁二烯苯乙烯、PEEK聚合物、聚乙烯、全氟烷氧基、玻璃、聚(醚酮酮)、聚苯乙烯、聚烯烃共聚物、石墨烯、金属、聚氯乙烯、聚缩醛、聚氨酯、聚芳醚砜、聚乙烯吡咯烷酮、聚酯、聚氯乙烯、环烯烃共聚物、聚酰胺、聚砜、含氟聚合物、乙烯-乙酸乙烯酯膨胀型PTFE (ePTFE)、聚乙醇酸 (PGA)、聚乙交酯-三亚甲基碳酸酯 (PGA-TMC)、PGA-己内酯、聚(乳酸-co-乙醇酸) (PLGA)、其他塑料、聚二甲基硅氧烷 (PDMS)、SU-8、聚酰亚胺、聚对二甲苯或其组合。最优选的生物相容性材料是硅酮和聚碳酸酯。

[0097] 所要求保护的装置能够通过采用任何数量的技术来制造。例如,它可以通过3D打印、光刻、注塑、模塑、铸造、超声波焊接、高频焊接、加热工具或板焊、溶剂黏合、激光焊接、转动焊接、红外焊接、振动焊接、黏接和机械加工制成。在一些实施方案中,优选的加工方法是车削、钻削、钻孔、铰孔、放电机械加工和/或铣削。可以对材料进行加工以形成所需尺寸的外壳,例如机械加工出整体通道或机械加工出可以附接的半部。对于通道,可以安装硅酮,并且入口和出口可以通过盖子封闭。可以在包括各种等级的聚碳酸酯的各种生物相容性材料上进行机械加工。然后可以用配体涂覆该装置,该配体通过常规手段涂覆多向通道的内壁的至少一部分。

[0098] 所要求保护的装置可以用于去除和/或检测许多类型的致病物质,例如癌细胞、循环肿瘤细胞、肽、 β 淀粉样物质、蛋白质、酶、毒素、患病细胞、癌细胞、感染性微生物、细胞、寄生虫、真菌、病毒、微生物、细菌、细菌毒素、脂多糖、细胞因子、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-11、IL-13、IL-15、IL-16、肿瘤坏死因子、降钙素原、病原体相关分子模式、C反应蛋白、群体感应蛋白或受体、与肝衰竭相关的小的或与蛋白质结合的生物分子或其组合。

[0099] 使用配体沿着多向通道的内壁的至少一部分将流体装置功能化,以捕获需要从诸如血液的生物流体中去除的致病物质和其他物质。可用于本发明实践的配体包括结合材料,结合材料包括抗体、肽、蛋白质、抗生素、聚合物、适配体、配体、肿瘤坏死因子、黏附受体、E-选择蛋白、细胞因子、化疗剂、群体感应蛋白或受体和生物制剂。

[0100] 可以通过常规方法将配体涂覆在多向通道的内壁上。根据装置的预期用途,通道的内壁可以涂覆有单一类型的配体或配体的混合物。内壁上的涂层范围也能够变化。例如,可以涂覆微通道内壁的整个长度或仅涂覆微通道内壁的一部分。

[0101] 在该技术的实践中,使用多向通道是重要的,因为它似乎使得致病物质与衬在微通道内壁的配体之间的接触增加。虽然不旨在限于以下内容,但理论上,如下所描述的Dean

涡旋力在所要求保护的装置的多向通道内起作用。

[0102] 在分层的泊肃叶流中,双曲线速度分布在通道的形心处具有最大速度,而在通道壁处速度为零。作用在颗粒上的升力(F_L)由壁引起的升力(F_1)和剪切引起的升力(F_2)所决定。这些升力共同作用以在通道壁和中心线之间产生颗粒平衡位置,其中相反方向的升力相等并且产生窄的颗粒带。引起颗粒脱离通道中心和壁的净升力(F_L)估计为 $F_L = f_L(Re, x_L) \rho U_m^2 a^4 / D_h^2$,其中升力系数(f_L)是通道雷诺数 Re ($Re = \rho U_m D_h / \mu$)和通道的横截面内的粒子位置(x_L)的函数。 D_h 是微通道水力直径, ρ 和 μ 是流体的密度和黏度, U_m 是最大流体速度, a 是颗粒直径。

[0103] 然而,在弯曲的微流体通道中,流体的不均匀惯性导致在通道(图1)的顶部和底部半部中形成二次横向流动或Dean涡流。用于表征弯曲微通道中的Dean涡流的无量纲Dean数(De)能够定义为 $De = (\rho U_f D_h / \mu) \sqrt{D_h / 2R}$,其中 R 是曲率半径,和 U_f 是平均流体速度³¹。假设斯托克斯曳力,由于这些流动而施加在颗粒上的Dean曳力(F_D)的大小能够通过 $F_D \sim 5.4 * 10^{-4} \mu \pi De a$ 来估计。

[0104] 颗粒在流动中的平衡位置主要由升力和Dean曳力之间的相互作用决定。在本发明的一些实施方案中使用的双螺旋几何形状被配制成当暴露于 0.2 mL min^{-1} 的流速时使致病物质占据内部微通道壁附近的平衡位置。这允许物质紧密接近被配体功能化的微通道壁,这使致病物质被捕获。为实现这个,将双螺旋微通道设计成具有例如406mm长(L)、300 μm 宽(W)和15 μm 高(H)的尺寸,其每个方向具有六个螺旋环(图13)。这旨在在弯曲的几何形状中实现流体动力学分离以及捕获细菌和内毒素。所描述的双螺旋微通道具有低的纵横比($H/W = 0.05$)。微通道的低纵横比迅速迫使致病物质迁移至最终平衡位置。

[0105] 在双螺旋微通道内连续流动条件下,两 μm 大小的颗粒($a/H \sim 0.13; F_L > F_D$)和10.2 μm 颗粒($a/H \sim 0.67; F_L > F_D$)表明2 μm 颗粒受惯性升力而不是Dean力的影响更大,从而在微通道内平衡。(图14a和图14b)满足 $a/H \geq 0.07$ 的颗粒能够集中并且占据微通道内的单个平衡位置。通道设计的低纵横比被认为促进了较小颗粒集中在内通道壁附近。与2 μm 颗粒相比,由于受更大的壁引起的升力,10 μm 大小的较大颗粒在通道的中心附近平衡。

[0106] 非球形颗粒的集中位置取决于颗粒的最大横截面尺寸。鲍曼不动杆菌ATCC17978是杆状(球杆菌)细菌,其长度通常为2 μm ,宽度为0.5 μm 。因此,评估了2 μm 的颗粒的集中(图14a)。然而,非球形细菌细胞能够自由转动并且受强烈的转动引起的升力的作用,同时被惯性集中并分类。在雷诺数大于10时,球形和杆状颗粒通常遵循相同的集中趋势。然而,在具有低纵横比的微通道中,例如具有这种设计的情况,杆状颗粒集中到两个平衡区域(图14c)。由于施加在杆状颗粒上的转动力,细菌在靠近通道壁时振荡。与转动诱导升力结合的近壁集中允许细菌与内部黏菌素功能化通道壁和外部黏菌素功能化通道壁直接接触。

[0107] 如在本发明的一些实施方案中所做的那样,使用基于螺旋的设计(螺旋通道)还施加依赖尺寸的惯性力以帮助从穿过所要求保护的装置的生物流体中捕获疾病物质。

[0108] 能够根据多向通道的长度和直径、穿过该多向通道的生物流体以及装置的预期功能,通过常规技术优化通过装置的流速。在使用本文示例的一些装置时,采用约0.2mL/min至约200mL/min的流速。

[0109] 将所要求保护的装置的多个版本布置成串联或并联配置也在本发明的范围内。这些装置在大小、配体涂层等上可以是相同的也可以是不同的。

[0110] 如前所述,所要求保护的装置包括至少一个入口和至少一个出口。向装置的入口提供生物流体以及从装置的出口将流体除去都可以用常规方法来实现。合适的泵可以用于将流体引入装置中,并且合适的收集装置,例如导管、容器、试管,可以用于收集从出口排出的流体。

[0111] 在本发明的一些实施方案中,如图6所示,生物流体(这里是患者的血液)由血泵驱动,流过要求保护的装置。患者的血液在从装置排出后并未被收集,而是被重新引入患者体内。在该示例情况下,通道的壁用靶向细菌的配体功能化(图6),从而允许捕获并去除细菌。在该实施方案中,靶向细菌的配体是基于聚合物的并且由硅烷(Si)-聚乙二醇(PEG)-多黏菌素E(黏菌素)组成,如图2a所示。然后,来自基于螺旋的流体装置的出口的所得血液不含疾病物质并且返回到患者。

[0112] 在一些实施方案中,流体装置包括用靶向疾病物质的配体功能化的支柱(图12)。在一个实施方案中,支柱被定位成增加所需颗粒碰撞并且结合到支柱的可能性,同时还为非致病物质例如健康血细胞和其他物质提供足够的空间以允许其通过来防止堵塞。存在能够将支柱在其中定位的许多种有用的形式和布置,并且本发明的实施方案可以考虑用于任何这样的布置。

[0113] 在一些实施方案中,基于螺旋的流体装置的表面或配体(或支柱)的表面是捕获细胞(比如细菌)的纳米颗粒或微粒(图11)。纳米颗粒功能化表面具有用疾病物质靶向配体功能化的纳米级颗粒。微粒表面具有用疾病物质靶向配体功能化的微米级颗粒。

[0114] 在一些实施方案中,在治疗之后,所要求保护的流体装置能够用于经由荧光标记或成像或诸如细胞计数的其他技术来分析捕获的疾病物质。类似地,可以使用如下物质来分析样品:ELISA、荧光、产生可见颜色变化以确定抗原的存在性的底物或显色报告、分析物。在一些实施方案中,还可以施加热量到血液以破坏不需要的疾病物质。在一些实施方案中,药物、麻醉剂、化学品或其任何组合可用作所要求保护的装置的使用的佐剂。

[0115] 在本发明的另一个实施方案中,能够通过常规方法(例如用缓冲盐冲洗装置的通道)使这种疾病物质和配体之间的结合分开,从要求保护的装置中去除捕获的疾病物质。然后可以培养和/或以其他方式测试回收的疾病物质。例如,该过程可以帮助识别疾病物质和制定用于患者的治疗方案。这些物质的分离、回收和随后的培养也可以用于许多其他非患者相关的目的。

[0116] 在本发明的另一个实施方案中,可以通过常规方法(例如用缓冲盐或裂解缓冲液冲洗装置的通道)使这种疾病物质和配体之间的结合分开,从要求保护的装置中去除捕获的疾病物质。如果回收的疾病物质是细菌、真菌或分枝杆菌,则可以通过已知方法使这些物质裂解,然后在裂解样品上使用聚合酶链式反应(PCR)或基质辅助激光解吸/电离飞行时间(MALDI-TOF),来确定疾病物质的特性。该过程还可以帮助快速识别疾病物质,从而允许迅速制定患者的治疗方案或者许多其他非患者相关的用途。

[0117] 在一些实施方案中,如图7所示,使用基于惯性的分离的流体装置将血液中的健康物质与疾病物质分离。作为说明性实例,细菌比血细胞小。在一些实施例中,细菌靶向配体(诸如硅烷-聚乙二醇-多黏菌素E)在基于螺旋的流体装置通道的壁上或在支柱上功能化,从而使疾病物质(即细菌)被捕获。作为说明性实例,细菌比血液中的其他细胞(比如白细胞和红细胞)小。例如,细菌可以具有0.5至2微米的直径,因此可以设计螺旋以促使较小的细

菌大小的细胞靠近配体功能化通道壁,而允许大90%的血细胞保留在通道的中心。在一些实施方案中,基于螺旋的流体装置由微制造材料制成,包括但不限于PDMS或如聚酰亚胺的其他材料。在一些实施方案中,基于螺旋的流体装置由PMMA制成。使用通过基于电荷的相互作用对细菌具有高亲和性的特异性配体捕获细菌。

[0118] 在本发明的一些实施方案中,要求保护的流体装置的球体、支柱或壁(或其任何组合)用携带有诸如硅烷-聚乙二醇-多黏菌素E的抗生素类的阳离子的、基于聚合物的配体进行功能化,用于捕获阴离子细菌如鲍曼不动杆菌。在捕获之后,能够通过用特异性荧光抗体缀合物染色来拍摄图像以进一步诊断疾病进展。用于细菌捕获的抗体靶标包括但不限于LPS、OmpA、脂磷壁酸、GrfA和聚集因子A。

[0119] 在一些实施方案中,流体装置由用诸如基于聚合物的配体的靶向疾病物质的配体(图2a)功能化的螺旋通道(图8)组成。螺旋通道由包括但不限于塑料、聚二甲基硅氧烷(PDMS)(图5a)、SU-8、聚酰亚胺、对二甲苯、金属或其他材料组成。在一些实施方案中,螺旋的内表面被改性为可以接受配体,例如可接受基于硅烷的聚合配体。在一些实施方案中,将基于螺旋的流体装置用肽功能化。在一些实施方案中,患者的血液流过基于螺旋的流体装置,使得相关的生物微生物、细胞、蛋白质、抗体或肽被允许黏附到装置的表面上的配体。在一些实施方案中,血液可以以约0.2mL/min至约200mL/min的流速连续地从基于螺旋的流体装置流回。在可替代实施方案中,取决于收集疾病物质所需的时间,血液可以在更长或更短的时间之后流回基于螺旋的流体装置。

[0120] 在一些实施方案中,将具有捕获物质(例如细菌)的基于螺旋的流体装置(图4)预先用荧光染料做荧光标记。例如,SYTO 9染料用于标记在基于螺旋的流体装置中捕获的细菌(图4)。接下来,对荧光细菌进行定量。在一些实施方案中,使用自动化系统来定量细菌。可以将软件和/或CCD相机结合到定量系统中以对细菌进行计数。在一些实施方案中,对整个装置内的细菌进行定量。在一些实施方案中,对单个横截面区域内的细菌进行定量,并从单个细菌计数推断捕获的细菌细胞的总数。在一些实施方案中,去除流体后,就在捕获后执行定量。存在用于标记和对被捕获的细胞进行定量的各种方法,这些方法都与本发明有关。而且,能够捕获并定量各种物质,这些物质都与本发明有关。

[0121] 在一些实施方案中,存在连续流过基于螺旋的流体装置。在可替代实施方案中,在特定时间段内将血液泵送通过基于螺旋的流体装置,然后在特定时刻停止流动,然后重新开始流动并重复此步骤。

[0122] 在一些实施方案中,将用于捕获的基于螺旋的流体装置暴露于辐射以杀死细菌或破坏其他疾病物质。在一些实施方案中,靶向细菌的聚合物配体沿着基于螺旋的流体装置通道的内部表面被功能化。当细菌流过基于螺旋的流体装置时,它们集中在用靶向疾病物质的配体功能化的通道表面附近。然后如果配体捕获还与抗生素试剂组合使用,则细菌附着或/和死亡。在一些实施方案中,使用抗癌药或其他化学品或药物。在一些实施方案中,使药物在装置的表面上功能化,该药物不必须具有细胞毒性。这些药物靶向快速附着到细胞壁上的特异性蛋白质以将其去除,诸如细菌表面蛋白质或癌细胞。

[0123] 在一些实施方案中,可以使用过热疗法来帮助从血液中去掉疾病物质。在一些实施方案中,将血液泵送通过基于螺旋的流体装置,然后加热至指定的温度以破坏或灭活被靶向的疾病物质。可以在活跃的流动或没有血液流动的条件下加热装置。在一些实施方案

中,然后将基于螺旋的装置冷却到医学上可接受的温度。能够指定多个腔室、通道或隔室用于加热和冷却。

[0124] 在一些实施方案中,内部螺旋通道用靶向疾病物质的配体功能化,其中配体选自蛋白质、抗体、肽、聚合物、促使细胞凋亡的物质、与死亡受体结合的物质、肿瘤坏死因子、黏附分子、E-选择素和细胞因子、群体感应蛋白受体。可以使用上面没有提到的各种配体。

[0125] 在一些实施方案中,本发明还可以用于去除病毒、微生物、细菌、转移细胞、物质、癌症干细胞、肽、蛋白质、酶、毒素、患病细胞、癌细胞和群体感应蛋白。在一些实施方案中,本发明能够帮助减少感染,该感染包括脓毒症、心内膜炎和高乳酸水平。本发明可以利用诸如抗体或肽的生物配体来捕获微生物、细菌、病毒、内毒素、感染性微生物、癌细胞、循环肿瘤细胞、肽和需要从血液中去掉的其他疾病物质。

[0126] 本公开还涉及从血液中检测和捕获疾病物质。具体地,本公开涉及使用在本文所述的流体装置内功能化的靶向疾病物质的配体来捕获需要从全血中去掉的疾病物质。

[0127] 在一些实施方案中,在血液流过流体装置之后,将光学活性微珠添加到流体装置以标记在通道内捕获的疾病物质。

[0128] 在一些实施方案中,然后使用光学读取器来光学读取微珠标记的流体装置。结果用于确定疾病物质是否存在于血液中,还用于识别疾病物质,以及定量疾病物质量。

[0129] 在一些实施方案中,血液通过试管流入流体装置。在一些实施方案中,基于螺旋的流体装置包括靶向疾病物质的配体。在一些实施方案中,配体是特定于被靶向以去除的疾病物质(例如细菌)的表面标志物的抗体或抗生素。当诸如细菌的疾病物质流过基于螺旋的流体装置时,它们通过沿着通道壁的惯性力而集中。在该示例性的情况下,通道壁用靶向细菌的配体功能化(图2),从而允许捕获并去除细菌(图4)。在一些实施方案中,靶向细菌的配体是基于聚合物的并且由硅烷(Si)-聚乙二醇(PEG)-多黏菌素E(黏菌素)组成,如图2所示。在一个实施方案中,设计配体黏菌素-PEG1000-硅烷(Co1-PEG-Si)以捕获细菌。黏菌素是一种天然存在的阳离子十肽,是一种有效的广谱抗菌物质,可用于临床环境。阳离子黏菌素分子与所有革兰氏阴性病原体的带负电荷的脂质A组分以静电和疏水的方式相互作用,使Co1-PEG-Si捕获细菌。通道表面缀合的黏菌素的量被仔细设计以改善细菌结合动力。使用黏菌素作为靶向配体比在此背景下使用合成的、基因设计的或生物大分子配体具有许多优点。一个优点是黏菌素是一种已经在临床环境中使用了几十年的容易获得的、经批准的抗生素。相对于使用基因设计的或新的生物大分子配体,这种设计简化了开发并并有助于监管考虑。然后将光学活性的靶向疾病物质的微珠添加到流体通道中。光学活性微珠与被靶向的疾病物质结合。然后使用光学读取器来读取该装置。

[0130] 在一些实施方案中,流体装置包括用靶向疾病物质的配体功能化的支柱。在一些实施方案中,支柱被定位成增加所需的颗粒碰撞并且结合到支柱的可能性,同时还通过为例如健康的血细胞和物质提供足够的空间供其穿过来防止堵塞。存在许多有用的可以将支柱定位在其中的图案和布置,并且本发明的实施方案可以考虑使用任何这样的布置。

[0131] 在一些实施方案中,治疗之后,流体装置还能够用于经由ELISA、荧光、产生可见颜色变化以确定抗原存在性的底物或显色报告、分析物能够用于分析样品。

[0132] 作为说明性实例,细菌比血细胞小。在一些实施方案中,靶向细菌的配体诸如硅烷-聚乙二醇-多黏菌素E在流体装置通道的壁上或在支柱上功能化,从而允许捕获疾病物

质(即细菌)。作为说明性实例,细菌比血液中诸如白细胞和红细胞的其他细胞小。例如,细菌能够具有0.5微米至2微米的直径,因此能够设计螺旋以促使较小的细菌大小的细胞靠近配体功能化的通道壁,同时允许大90%的血细胞保留在通道的中心。在一些实施方案中,基于螺旋的流体装置由微制造材料制成,包括但不限于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)或如聚酰亚胺的其他材料。

[0133] 使用通过基于电荷的相互作用对细菌具有高亲和性的特异性配体捕获细菌。在本发明的一些实施方案中,流体装置的球体、支柱或壁(或其任何组合)用携带有抗生素类(诸如,硅烷-聚乙二醇-多黏菌素E)的基于聚合物的配体进行功能化,以捕获细菌如鲍曼不动杆菌。在捕获之后,能够通过用特异性荧光抗体缀合物染色来拍摄图像以进一步诊断疾病进展。用于捕获细菌的抗体靶标包括但不限于LPS、OmpA、脂磷壁酸、GrfA和聚集因子A。

[0134] 在一些实施方案中,基于螺旋的流体装置由用诸如基于聚合物的靶向疾病物质的配体(图2)功能化的螺旋通道(图8)组成。螺旋通道由包括但不限于聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、聚二甲基硅氧烷(PDMS)(图5)、SU-8、聚酰亚胺、对二甲苯、金属或其他物质组成。在一些实施方案中,螺旋的内表面被改性为可接受配体,例如可接受基于硅烷的聚合配体。在一些实施方案中,流体装置用肽功能化。在一些实施方案中,血液流过流体装置,使得允许相关的生物微生物、细胞、蛋白质、抗体或肽黏附到装置的表面上的配体。

[0135] 在一些实施方案中,将具有被捕获的物质(例如细菌)的基于螺旋的流体装置(图4)用光学活性微珠荧光标记。例如,能够将黏菌素功能化的荧光微珠添加到通道以标记已经在流体通道中被捕获的细菌。接下来,对荧光标记的细菌进行定量。在一些实施方案中,使用自动化系统来定量细菌。能够将软件和/或CCD相机结合到定量系统中以对细菌进行计数。在一些实施方案中,对整个装置内的细菌进行定量。在一些实施方案中,对单个横截面区域内的细菌进行定量,并从单个细菌计数推断被捕获的细菌细胞的总数。在一些实施方案中,去除流体后,在捕获后执行定量。存在用于标记和定量被捕获的细胞的各种方法,所述各种方法与本发明有关。而且,能够捕获并定量各种物质,所述各种物质与本发明有关。

[0136] 用作脓毒症的治疗方式需要增加的流动能力以适应更大的生命系统的血量以及隔离革兰氏阳性细菌的方法。本文公开了一种使用应用于原始装置(图8;图26)的相同定量方法和设计原理进行扩大的方法。在保持体积与表面积之比恒定的同时增加流体装置的横截面积之后,对鲍曼不动杆菌的捕获以相同的效果发生。重要的是,这也包括具有用于革兰氏阳性细菌的捕获剂的装置。无论细菌呈现为革兰氏阳性、革兰氏阴性还是抗生素抗性,组合装置都提供去除细菌的能力,因此能够在没有阳性细菌培养或来自血液样品的菌株鉴定的情况下进行早期治疗。此外,同时去除细菌和内毒素提供了一种用于治疗脓毒症的强大的且以前未试验的方法。这个工作突出了如下变革性影响:将生物医学工程原理扩展应用于治疗生物流体和血液感染,而脓毒症只是其中一个实例。其他类似的具有挑战性的疾病,例如心内膜炎,也能够从类似的方法中受益。

[0137] 实施例

[0138] 下面阐述以下实施例以说明根据所公开的主题的装置、方法和结果。这些实施例不旨在包括本文公开的主题的所有方面,而是旨在说明代表性的方法和结果。这些实施例不旨在排除对本领域技术人员显而易见的本发明的等同物和变型。

[0139] 实施例1、用于捕获和去除细菌的抗生素功能化的微流体装置

[0140] 在本实施例中,已经开发了用于从流动的流体中隔离出细菌的装置和方法。将被细菌污染的样品引入由一个或多个通道(图1A和图1B)组成的微流体装置的至少一个入口中。用生物相容性配体、黏菌素-PEG1000-硅烷(Co1-PEG-Si)(图2A、图2B和图2C)连续地功能化通道壁,该配体以高亲和力与来自流动流体的细菌结合并将其捕获。每个通道具有设计来利用惯性力的纵横比和曲率,惯性力沿着微通道的壁施力给细菌细胞和细菌大小的颗粒(图3)。这使得沿着功能化通道壁捕获细菌(图4A、图4B和图4C)。包括血细胞的所有其他细胞类型都未被靶向细菌的配体捕获,而是沿着通道的第二部分自由流动。这使得未污染的流体通过通道出口而离开。对微通道内的黏菌素表面呈现进行了表征,结果证明了细菌快速结合到Co1-PEG-Si。

[0141] 在该实施例中,新颖的黏菌素功能化的微流体装置由被证明具有体内安全性和有效性的材料组成。这使得血液传播的病原体的子集被从感染系统中移除并根除,从而可能减少细菌向远端部位的传播。从血流中选择性去除循环细菌有助于重新平衡先天免疫系统,从而降低炎症介质水平、改善血管功能并增强血流动力。该装置还消除了对于复杂外力场如磁铁的集成的需要,使装置易于操作。该装置不需要纳米颗粒,完全由FDA批准的生物相容的材料组成,避免了负面的副作用,如纳米颗粒在器官中的积累。该系统的处理吞吐量高并且能够具有高流速,使系统适合于在有效的时间范围内处理受感染患者的血液。结果表明,本实施例的螺旋微流体装置克服了与堵塞和所导致的细胞变形相关的问题。此外,该装置能够帮助抵抗抗生素无效和过度使用,从而减少多重耐药细菌的威胁。

[0142] 实施例2、用于快速检测和捕获血源性病原体的基于惯性的流体平台

[0143] 利用基于惯性的流体学的病原体和内毒素的体外提取能够用作下一代技术,以减少脓毒症相关的发病率和死亡率。

[0144] 黏菌素-PEG-硅烷配体的合成

[0145] 将NHS-PEG-硅烷(N-羟基琥珀酰亚胺-聚乙二醇₁₀₀₀-硅烷,Nanocs有限公司,批号#160429)(30mg mL⁻¹)溶解在乙醇/水中,pH 5(50/50v/v%,用乙酸调节的pH)。将35mg mL⁻¹硫酸黏菌素(Sigma-Aldrich,批号#SLBN5158V)加入到NHS-PEG-硅烷溶液中。将溶液涡旋30秒,然后使其在21℃下反应2小时。使用NHS将异双功能NHS-PEG-硅烷接头与黏菌素的五个类似活性的L-α-二氨基丁酸(Dab)残基之一连接,得到黏菌素-PEG-硅烷。

[0146] PEG-硅烷配体溶液制备

[0147] 将PEG-硅烷(聚乙二醇₁₀₀₀-硅烷,Nanocs有限公司,批号#1607060H)(30mg mL⁻¹)溶解在乙醇/水中,pH 5(50/50v/v%,用乙酸调节的pH)。将溶液涡旋30秒,然后使其在21℃下温育2小时。

[0148] 装置的设计和制造

[0149] 微流体装置图案在AutoCAD软件(AutoCAD 2014,AutoDesk有限公司)中设计和绘制。该设计包括带有一个入口和一个出口的6环双螺旋微通道。微通道顺时针旋转6个环,通过S形接头改变方向,然后逆时针旋转以形成双螺旋。双螺旋微通道具有长为406mm、宽为300μm和高为15μm的尺寸。两个相邻环之间的间距为500μm。最外面的曲率半径是9.8mm。使用标准光刻技术从硅母版生成模具,该硅母版被在4英寸硅晶片(新星电子材料)上旋涂有SU8-2010(MicroChem公司)层(WS-400Lite系列转动处理器,Laurell Technologies公司)。在95℃下软烘烤5分钟后,使用具有UV光(Novacure 2100,Exfo有限公司)和负光掩模

(Infinite Graphics有限公司)的光刻机(MJB 3Mask Aligner,Suss MicroTech)对SU-8层进行图案化。在随后的95℃下曝光后烘烤步骤5分钟后,使用SU-8显影剂(MicroChem公司)使所得晶片显影。在150℃下执行最后的硬烘烤5分钟。将晶片用作主模具以浇铸微流体通道。将脱气的PDMS(聚二甲基硅氧烷,以10:1比例的PDMS碱与固化剂(Sylgard 184,Dow Corning有限公司)混合)浇铸在模具上并在65℃下烘烤4小时。随后通过保险刀片切割具有嵌入通道的PDMS并从母模移除。使用1.5mm活检冲头(Integra Miltex)将一个入口和一个出口通过PDMS穿孔。然后在氧气血浆处理(PDC-001血浆清洗机、Harrick Plasma)之后将PDMS板结合到玻璃基板(43mm×50mm,Ted Pella有限公司)。在血浆处理并结合到玻璃盖玻片之后立即插入1/16"O.D.tygon微内径管道(Cole Parmer公司)通过入口和出口。使用黏菌素-PEG-硅烷接头和硅烷化学将黏菌素连接到双螺旋微流体装置通道壁(图19)。使用1mL鲁尔锁一次性注射器(Becton Dickinson)使黏菌素-PEG-硅烷溶液流过氧化的PDMS微通道。根据完善的硅烷化原理,使黏菌素-PEG-硅烷溶液在65℃下与微通道表面接触30分钟。设计使用异双功能的黏菌素-PEG-硅烷接头以使得能够用PEG分子间隔物对微通道壁进行黏菌素装饰,该PEG分子间隔物旨在减少黏菌素与细菌和内毒素相互作用的位阻。在生理pH值范围内,黏菌素的伯胺组被质子化,因此带正电。黏菌素的正电荷允许与带负电荷的革兰氏阴性病原体的外膜和内毒素结合。使用非常类似的方法还合成PEG-硅烷功能化装置,并用作无黏菌素修饰的PEG化对照组。得到非功能化的双螺旋微流体装置时没有添加配体。

[0150] 确认黏菌素与微通道壁的结合

[0151] 使用ATTO 488NHS酯(Sigma-Aldrich,批号#BCBQ4012V)对黏菌素化双螺旋微流体装置内的黏菌素进行荧光标记。在使用前将ATTO 488NHS酯(2mg mL^{-1})立即溶解在二甲基亚砜(DMSO,Sigma-Aldrich)中。通过将氟添加到黏菌素化微通道中进行标记,然后在室温下培养30分钟。然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS,Gibco,批号#1806048),pH 7.4洗涤染色的微通道。在作为对照的PEG化微通道上使用相同的方法。然后使用荧光显微镜(EVOS FL,Invitrogen)对荧光染色的微通道成像。使用Image-J软件定量捕获图像的通道宽度上的荧光强度。非功能化微流体装置中的ATTO 488NHS酯的稀释液用作参考,以产生ATTO 488NHS酯标准荧光校准曲线。将黏菌素微通道和PEG化的微通道的荧光强度与ATTO 488NHS酯标准曲线的荧光强度进行比较,这使得可以定量每个双螺旋微通道的黏菌素分子的数量。

[0152] 黏菌素保留

[0153] 使用MaxSignal®黏菌素酶联免疫吸附试验(ELISA)测试试剂盒(BIO Scientific,批号#109501081415\$626311708249)评估在流动条件下从双螺旋微流体装置的表面拆分黏菌素-PEG-硅烷配体的可能性。使pH 7.4的PBS以 0.2mL min^{-1} 流过该黏菌素化双螺旋微流体装置2小时。在不同时间点(1分钟、2分钟、4分钟、5分钟、10分钟、20分钟、30分钟、45分钟、60分钟、120分钟)从装置出口收集样品用于分析。根据制造商的说明,通过黏菌素ELISA定量每个样品中的总黏菌素含量。使用微量滴定板读取器在450nm下测量吸光度,并根据校准曲线(测定检测范围,0.5ng/mL至50ng/mL)使用这些值来计算样品中的黏菌素浓度。黏菌素配体保留表征的结果促使在实验使用前用70%乙醇连续洗涤每个双螺旋微流体装置30分钟,使得在捕获研究期间的黏菌素释放可忽略不计。

[0154] 微生物培养

[0155] 将细菌培养物(即鲍曼不动杆菌ATCC17978、抗黏菌素鲍曼不动杆菌19606R⁴¹、抗黏

菌素鲍曼不动杆菌‘患者2’、肺炎克雷伯氏杆菌ATCC700603、枯草芽孢杆菌1A578(芽孢杆菌遗传库中心)、金黄色葡萄球菌ATCC29213)接种在LB琼脂(Sigma-Aldrich,批号#SLBR1403V)上并在37℃下生长过夜。然后将每个菌株的单菌落接种在LB发酵液(1X)(Gibco,批号#1803272)中,并在37℃下以150rpm振荡生长18小时。用OD595光谱测定法(Infinite F500,Tecan)测量细胞浓度。

[0156] 惯性集中可视化

[0157] 使用平均直径为 $10.2\mu\text{m}\pm 4\mu\text{m}$ 和 $2\mu\text{m}\pm 0.3\mu\text{m}$ 的聚苯乙烯微球(Spherotech有限公司)来分析在微通道内集中的颗粒。提供1%w/v的含有1vol%的吐温-20表面活性剂(Sigma-Aldrich)的悬浮液以防止颗粒聚集。使用去离子(DI)水将等体积的两种悬浮液稀释至0.1%w/v。通过1mL的鲁尔锁针尖注射器和1/16"O.D.tygon入口管道使用连接到微通道入口端口的输液注射泵(Nexus 3000,Chemyx有限公司),将荧光颗粒以 0.2mL min^{-1} 单独引入非功能化双螺旋微通道中。使用荧光显微镜(EVOS FL,Invitrogen)对双螺旋通道内的颗粒轨迹和集中进行实时的可视化。使用SYTO®9绿色荧光核酸标记(5mM的DMSO溶液,Molecular Probes,批号#1687876A)鲍曼不动杆菌ATCC17978来重复该过程。与SYTO®9温育5分钟后,利用不含RNA酶的超纯水(USB公司,批号#4235512)洗涤细菌三次,并重悬至浓度为 $\sim 10^7$ 菌落形成单位(CFU) mL^{-1} 。使用输液注射泵使荧光标记的细菌悬浮液以 0.2mL min^{-1} 流过PEG化的双螺旋微流体装置。使用荧光显微镜(EVOS FL,Invitrogen)对双螺旋通道内的细菌轨迹和集中进行实时的可视化。

[0158] 易感性测试

[0159] 通过标准琼脂稀释方法确认细菌菌株的黏菌素最小抑制浓度(MIC)。根据临床研究和实验室标准研究所易感性断点解释结果。

[0160] 细菌捕获可视化

[0161] 如先前在“惯性集中可视化”方法部分中所描述的,用SYTO®9标记鲍曼不动杆菌ATCC17978。使用输液注射泵以 0.2mL min^{-1} 使荧光标记的细菌悬浮液流过黏菌素化和PEG化的双螺旋微流体装置。然后用pH 7.4的PBS洗涤装置四次,以清除任何弱结合的细菌。使用荧光显微镜(EVOS FL,Invitrogen)获得微通道的荧光图像。使用荧光标记的鲍曼不动杆菌ATCC17978和加入EDTA-抗凝的全人血液中的金黄色葡萄球菌ATCC29213重复该过程。根据范德比尔特大学人类受试者机构审查委员会(IRB)(方案号111251),在知情同意的情况下从健康供体获得人血。

[0162] 细菌捕获定量

[0163] 通过首先将鲍曼不动杆菌ATCC17978细菌悬浮液在pH 7.4的PBS中调节至 $\sim 8 \times 10^7$ CFU mL^{-1} 来测试黏菌素化和PEG化双螺旋微流体装置的病原体捕获能力。通过连续稀释初始悬浮液获得 $\sim 10^2$ CFU mL^{-1} 的浓度,用作对照。以 0.2mL min^{-1} 将细菌样品输注通过黏菌素化双螺旋微流体装置,并在5个不同时间点(1分钟、2分钟、3分钟、4分钟和5分钟)从装置出口收集样品。对于PEG化的双螺旋微流体装置也重复该过程。以与对照组相同的方式稀释来自双螺旋微流体装置的出口的回收溶液。将收集的样品和对照一式三份(100 μL)接种在LB-琼脂培养皿上,用于对病原体捕获能力进行定量。将板在37℃下培养24小时,并对在培养皿上形成的菌落进行计数。将重复计数是菌落的平均数乘以它们各自的稀释因子来计算

初始细菌和回收细菌的数量。从初始细菌(即未处理的对照组)数量中减去回收细菌的数量来确定所捕获的细菌的数量。将所捕获的细胞的数量除以初始细胞的数量来计算捕获能力。对在pH 7.4的PBS中的以下细菌菌株的捕获能力进行定量:鲍曼不动杆菌ATCC17978、抗黏菌素鲍曼不动杆菌19606R、抗黏菌素鲍曼不动杆菌‘患者2’、肺炎克雷伯氏杆菌ATCC700603和枯草芽孢杆菌1A578。对于鲍曼不动杆菌ATCC17978加入EDTA-抗凝的全人血液,也重复该过程。

[0164] 内毒素结合试验

[0165] 根据制造商的方案使用Pierce LAL显色内毒素定量试剂盒(Thermo Scientific, 批号#RG236327)来分别对黏菌素化和PEG化双螺旋微流体装置的内毒素捕获能力进行定量。简而言之,将大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)内毒素标准品(O11:B4)以浓度 1EU mL^{-1} (内毒素单位)在无内毒素的水中重建,并且使用输液注射泵使溶液以 0.2ml min^{-1} 流过黏菌素化双螺旋微流体装置。在5个不同的时间点(1分钟、2分钟、3分钟、4分钟和5分钟),从装置出口收集样品。对于PEG化的双螺旋微流体装置也重复该过程。然后根据制造商的方案分析所收集的样品的内毒素浓度,并且在450nm处读取结果。

[0166] 血液学研究

[0167] 为了确定用双螺旋微流体装置的治疗是否明显改变血液的血液学参数,在以 0.2mL min^{-1} 流过血液清洁装置后,从黏菌素化装置出口收集1mL的EDTA-抗凝的全人血液。对于PEG化装置重复该过程。然后分析红细胞溶菌以确定血浆中自由血红蛋白的释放。根据完善的方案来测量血浆血红蛋白。在通过该装置后,将血液样品离心($500\times g$),并针对血红蛋白释放,使用板读取器(Tecan, Infinite M1000Pro)在451nm下采用分光光度法分析上清液,以便确定相对于Triton-X的阳性对照的溶血率。将Triton X-100(Sigma-Aldrich)在二次 H_2O 中稀释,得到20v/v% Triton-X洗涤剂浓度,用作阳性对照。使用的阴性对照是EDTA-抗凝的全人血,其未流过双螺旋微流体装置(即未处理的)。根据以下公式计算血红蛋白释放百分比:血红蛋白释放(%) = $[(\text{样品}_{451\text{nm}} - \text{阴性对照}_{451\text{nm}}) / (\text{阳性对照}_{451\text{nm}} - \text{阴性对照}_{451\text{nm}})] \times 100\%$ 。由范德比尔大学转化病理学共享资源核心对每个样品(即未处理的、黏菌素化装置、PEG化装置)的全血细胞进行计数。

[0168] 装置扩大

[0169] 使用先前描述的方法来制造和功能化较大版本的初始双螺旋微流体装置。该装置的扩大版本由具有一个入口和一个出口的4环双螺旋微通道组成。扩大版本的尺寸为长323mm、宽 $750\mu\text{m}$ 和高 $15\mu\text{m}$ 。两个相邻环之间的间距为 $500\mu\text{m}$ 并且最外侧曲率的半径为11.2mm。调整按比例扩大的装置的尺寸,使得体积与表面积之比与初始装置设计相当。将扩大的装置的细菌捕获能力表征为将捕获能力与更小装置的捕获能力进行比较。使用扩大装置的‘细菌捕获定量’测定用鲍曼不动杆菌ATCC17978进行。

[0170] 统计分析

[0171] 所有测量值报告为至少一式三份样品的平均值 \pm 标准偏差(SD),如误差条所示。使用单向ANOVA确定明显的差异,然后进行post hoc Tukey多重比较测试,如P值 <0.01 所定义。

[0172] 结果

[0173] 黏菌素与微通道壁的结合

[0174] 使用荧光标记和化学计量分析来估计1.76 μg 黏菌素沿着黏菌素双螺旋装置的壁功能化(图20)。与该装置表面相关的黏菌素的量对人体无毒。执行ELISA以估计从双螺旋微流体装置释放的含黏菌素的分子的量。连续流动2小时使得从通道释放大约300ng的黏菌素(图21)。

[0175] 集中在双螺旋微流体装置中的惯性颗粒

[0176] 对连续流动条件下的荧光聚苯乙烯微粒在非功能化双螺旋微流体通道内进行成像。在0.2 mL min^{-1} 的体积流速下,相应的 $\text{Re}=14.9$,2 μm 大小的颗粒集中在微通道的内壁附近(图14a),同时10.2 μm 大小的颗粒集中在微通道的宽度的中心附近(图14b)。复合荧光图像示出了10.2 μm (红色流)和2 μm 颗粒(绿色流)的轨迹,较大颗粒接近较大血细胞(即红细胞和白细胞)的轨迹。微粒惯性集中在平衡位置,平衡位置随直径变化。血细胞大小的颗粒与细菌大小的颗粒的明确的分离是明显的。与2 μm 直径的球形颗粒相比,鲍曼不动杆菌ATCC17978惯性集中甚至更靠近通道壁。另外,细菌出现在双螺旋装置的两个侧表面附近。这些行为与惯性设计一致,如来源于净惯性升力(F_L)和Dean曳力(F_D)。

[0177] 使用表面改性的双螺旋微流体装置的细菌细胞捕获

[0178] 选择鲍曼不动杆菌ATCC17978细菌细胞作为标准样品,用于定性和定量地评估黏菌素化和PEG化双螺旋微流体装置的细菌捕获能力。绿色荧光标记的鲍曼不动杆菌ATCC17978在以0.2 mL min^{-1} 通过微流体装置后与黏菌素化微通道壁结合,随后进行洗涤(图4)。在PEG化双螺旋微流体装置内没有发生明显的细菌捕获,可能是由于没有黏菌素表面功能化(图4)。

[0179] 通过使1 mL 的pH 7.4的PBS中的鲍曼不动杆菌ATCC17978悬浮液以0.2 mL min^{-1} 的流速流过微流体装置,来定量细菌捕获能力。如通过可以从离开装置的流体中培养的菌落的减少所证实的,利用通过黏菌素化双螺旋微流体装置的单一通道实现了超过 10^7 CFU的细菌细胞捕获能力(图15a)。另一种革兰氏阴性人病原体肺炎克雷伯氏杆菌ATCC700603也被成功地从流动的流体中清除(图15b)。黏菌素化双螺旋微流体装置还从流动的流体中捕获并清除抗生素抗性生物,包括抗黏菌素鲍曼不动杆菌‘患者2’和抗黏菌素鲍曼不动杆菌19606R(图15c和图15d)。这些抗黏菌素菌株在文献中得到了很好的表征,并且通过MIC评估再次确认了黏菌素抗性(表1)。

[0180] 表1黏菌素抗性

[0181]

样品	黏菌素MIC ($\mu\text{g/mL}$)
鲍曼不动杆菌19606R ⁴³	>256
鲍曼不动杆菌‘患者2’ ⁴¹	>256

[0182] 抗黏菌素鲍曼不动杆菌隔离物的最低抑菌浓度(MIC; $\mu\text{g/mL}$)单独考虑。结果列为平均值 \pm SD, $n=3$ 。

[0183] PEG功能化强烈支持绿色荧光鲍曼不动杆菌ATCC 17978与黏菌素化双螺旋微通道装置的结合(图15a至图15d)。黏菌素化和PEG化装置没有捕获革兰氏阳性枯草芽孢杆菌1A578,证实了在黏菌素功能化装置中革兰氏阴性病原体的特异性(图22)。

[0184] 体外血液清洁

[0185] 使用新鲜的全人血液评估双螺旋微流体装置的血液清洁能力,该全人血液是

EDTA-抗凝的并且实验上受鲍曼不动杆菌ATCC17978的污染。单一的黏菌素化双螺旋微流体装置从全血中清除大约 10^7 个菌落形成单位的细菌,其中一个菌落形成单位的细菌以 0.2 mL min^{-1} 的流速通过该装置(图16a)。还使用荧光显微镜确认了来自流动血液的细菌细胞捕获。ATCC17978在受感染的血液以 0.2 mL min^{-1} 通过微流体装置后,绿色荧光标记的鲍曼不动杆菌与黏菌素微通道壁结合,并随后进行洗涤(图16b和图16c)。然而,加入全人血液中的革兰氏阳性金黄色葡萄球菌ATCC29213不与黏菌素化微通道壁结合,证实了在黏菌素功能化装置中革兰氏阴性病原体的特异性(图16d)。使全人血液流过黏菌素化和PEG化的双螺旋微流体装置对血液成分没有可检测的影响(表2),也不诱导红细胞溶血(表3)。

[0186] 表2在通过功能化微流体装置之前和之后的全人血液的血细胞计数。

样品	红细胞 (万亿细胞/L)	白细胞 (十亿细胞/L)	血小板 (十亿细胞/L)
[0187] 对照	4.60 ± 0.70	6.80 ± 0.30	239 ± 26.6
黏菌素化装置	5.00 ± 0.10	7.30 ± 0.30	236 ± 0.90
PEG化装置	5.10 ± 0.10	6.50 ± 0.90	273 ± 84.3

[0188] 通过黏菌素化和PEG化双螺旋流体装置以 0.2 mL min^{-1} 流动的红细胞计数、白细胞计数和血小板计数与对照组没有明显差异。未通过微流体装置的未改变的血液被用作对照。使用单向ANOVA和随后的post hoc Tukey多重比较检验来比较数据。结果列为平均值 \pm SD, $n=3$ 。* $P<0.01$, ** $P<0.001$, *** $P<0.0001$ 。

[0189] 表3流过功能化微流体装置的全人血液的溶血水平的总结。

样品	溶血 (%)	统计显著性
[0190] 阳性对照 (20 v/v % Triton-X)	$100\% \pm 3.08\%$	***
阴性对照	$0.01\% \pm 0.70\%$	对照
黏菌素化装置	$1.09\% \pm 1.09\%$	n.d.
PEG化装置	$1.86\% \pm 0.66\%$	n.d.

[0191] 使全人血液流过黏菌素化和PEG化的双螺旋微流体装置。血液通过装置不会引起溶血。含有Triton-X (20v/v%)的血液用作阳性对照。阴性对照是未通过双螺旋流体装置的血液。使用单向ANOVA和随后的post hoc Tukey多重比较检验来比较数据。结果列为平均值 \pm SD, $n=5$ 。* $P<0.01$, ** $P<0.001$, *** $P<0.0001$ 。

[0192] 总细菌捕获能力

[0193] 黏菌素化双螺旋微流体装置在装置操作的5分钟内从PBS中清除 $\sim 10^7$ CFU的活鲍曼不动杆菌ATCC17978(图15a)和相似量的肺炎克雷伯氏杆菌ATCC700603(图15b)。此外,鲍曼不动杆菌的抗黏菌素菌株(即鲍曼不动杆菌19606R和鲍曼不动杆菌‘患者2’)(图17)被以与野生型的对黏菌素敏感的鲍曼不动杆菌菌株相同的效能捕获。统计分析证实,黏菌素化双螺旋微流体装置从全人血液捕获革兰氏阴性细菌的能力与从PBS中没有明显差异(图17)。

[0194] 内毒素捕获的定量

[0195] 作为革兰氏阴性细菌的外膜的主要成分之一的内毒素也导致全身炎症反应,这是脓毒症的特征。因此,评估了使用双螺旋微流体装置从流动的流体中清除内毒素。将内毒素加入无内毒素的水中,并且以 0.2mL min^{-1} 连续流过该装置5分钟,总共1mL。从通过黏菌素化双螺旋微流体装置的流体中快速捕获内毒素,其单程操作中内毒素捕获效率接近100% (图23)。相反,使用PEG化装置不能有效地捕获内毒素,这证明了双螺旋中内毒素保留中非常需要黏菌素。

[0196] 用于临床转化的装置扩大

[0197] 所描述的黏菌素化双螺旋微流体装置的捕获能力大约为 10^7CFU (图17),这超过了治疗脓毒症患者多于三个数量级的要求。然而,对于潜在的临床转化,必须增加与当前装置设计相关的流速以使得能够治疗更大的动物样本和人类。因此,开发了更大版本的双螺旋流体设计,以证明扩大当前设计的可行性。黏菌素化双螺旋微流体装置的扩大版本的操作流速是初始设计的三倍,在单程操作中捕获了超过 10^7CFU 的鲍曼不动杆菌ATTC17978 (图8)。选择扩大的装置的尺寸以提供与原始装置类似的体积与表面积比,同时保持适当的流体动力学颗粒集中特性。封闭管道中的流体输送的控制原理可用于设计更大的双螺旋装置,其具有适用于增加的处理量的性能特性。

[0198] 黏菌素功能化的要求表明野生型鲍曼不动杆菌捕获是由黏菌素介导的 (图4、图15a和图15b)。对两种独立隔离的具有强烈黏菌素抗性的鲍曼不动杆菌菌株的黏菌素依赖性捕获,意味着用于捕获和清除抗抗生素细菌的先前未认识到的方法 (图15c和图5d)。该结果与黏菌素抗性一致,与黏菌素与细菌外膜的结合无关。这些抗黏菌素菌株增加了参与细胞包膜和膜生物发生的许多基因的表达。黏菌素功能化双螺旋装置不能捕获革兰氏阳性细菌 (例如枯草芽孢杆菌1A578) 进一步地支持了作为黏菌素识别的捕获机制,即革兰氏阳性细菌对黏菌素不敏感并且不能结合到黏菌素。内毒素是一种可引起脓毒症相关并发症的革兰氏阴性细菌毒素,在流过黏菌素功能化装置后,被以几乎100%的捕获效率从流体中清除 (图23)。

[0199] 从血液中稳健地捕获细菌与体外无血细胞悬浮液的细菌捕获基本相同 (图16和图17)。双螺旋的设计在空间上将所形成的血液成分与发生细菌结合的区域隔离开,并且假设双螺旋的设计负责在血细胞存在的情况下不降低细菌的捕获效率。在感染期间的任何特定时间,脓毒症人被估计为在血液中含有最多 10^3CFU 的细菌。这种设计所展示的能力超过了脓毒症人血液中的平均细菌数量三个数量级。因此,该装置中存在相当大的捕获能力,以容纳从感染源例如肺进入血液隔室的额外的细菌。所述设计的简化性和稳健性支持了该方法的转化潜力。

[0200] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与所公开的发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。本文引用的出版物和它们引用的材料通过引用明确地并入本文。

[0201] 本领域技术人员将理解,可以对本发明的优选实施方案进行许多改变和修改,并且能够在不脱离本发明的精神的情况下进行这些改变和修改。因此,所附权利要求旨在覆盖落入本发明的真实精神和范围内的所有这些等同变化。

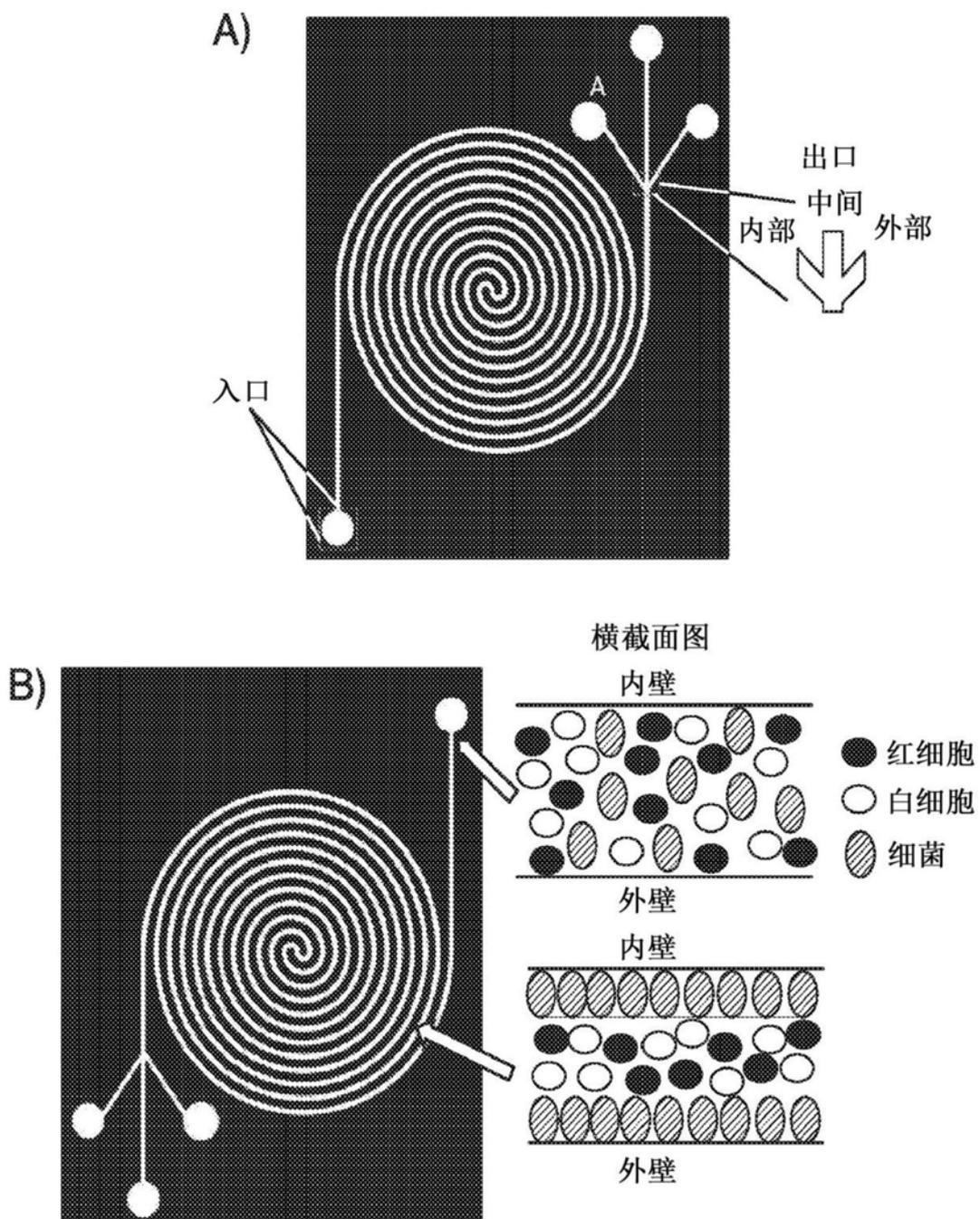


图1

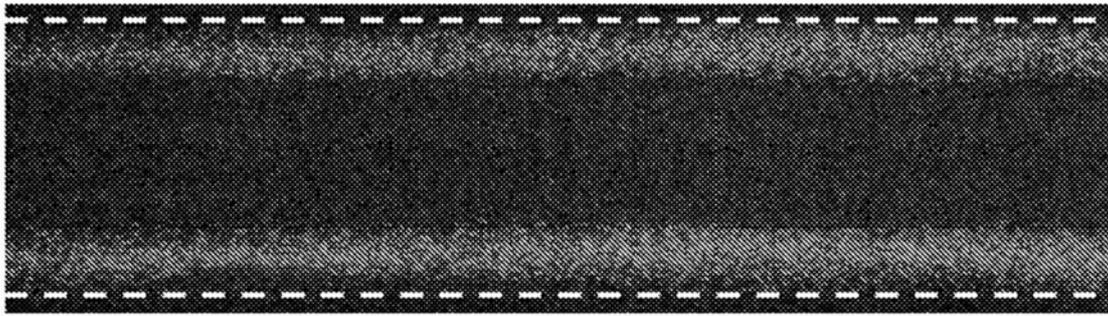


图3

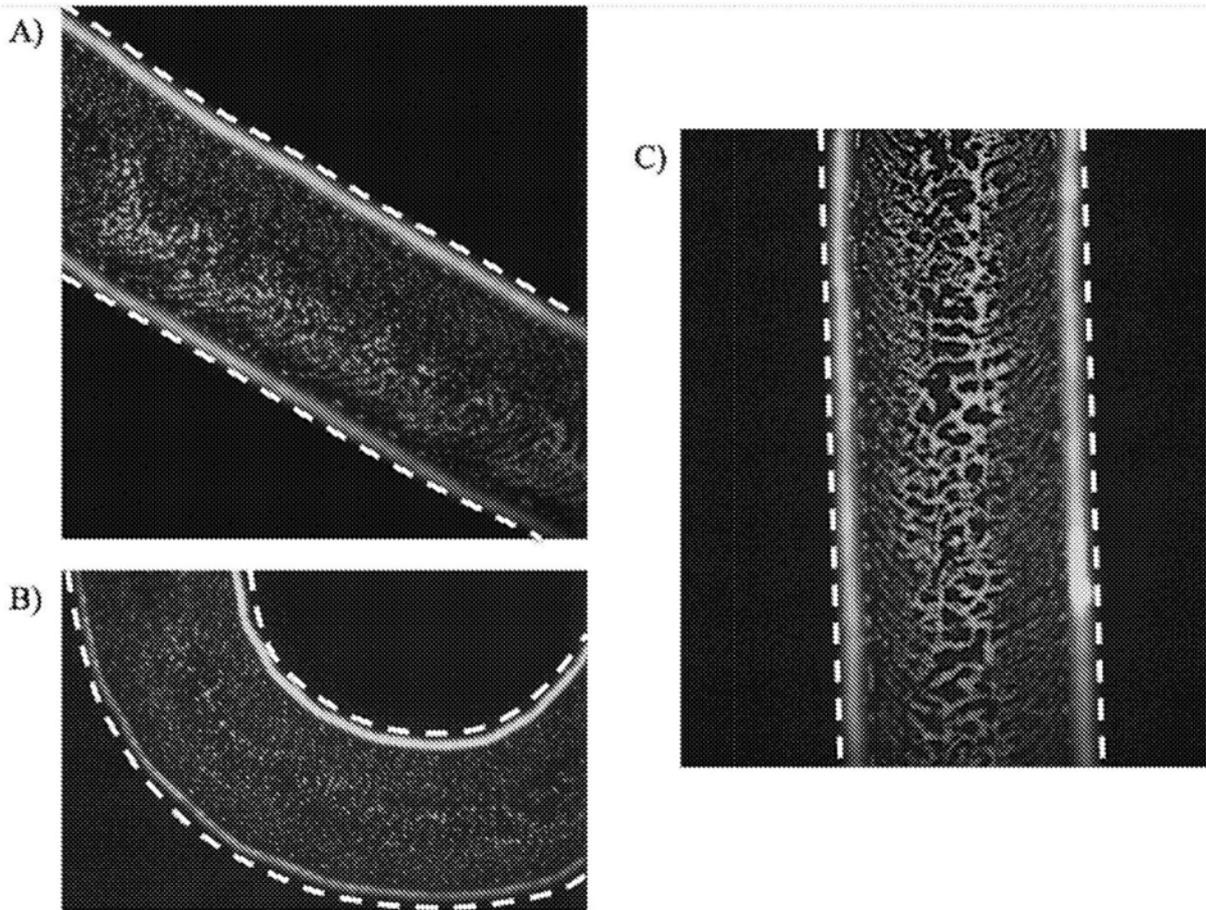


图4

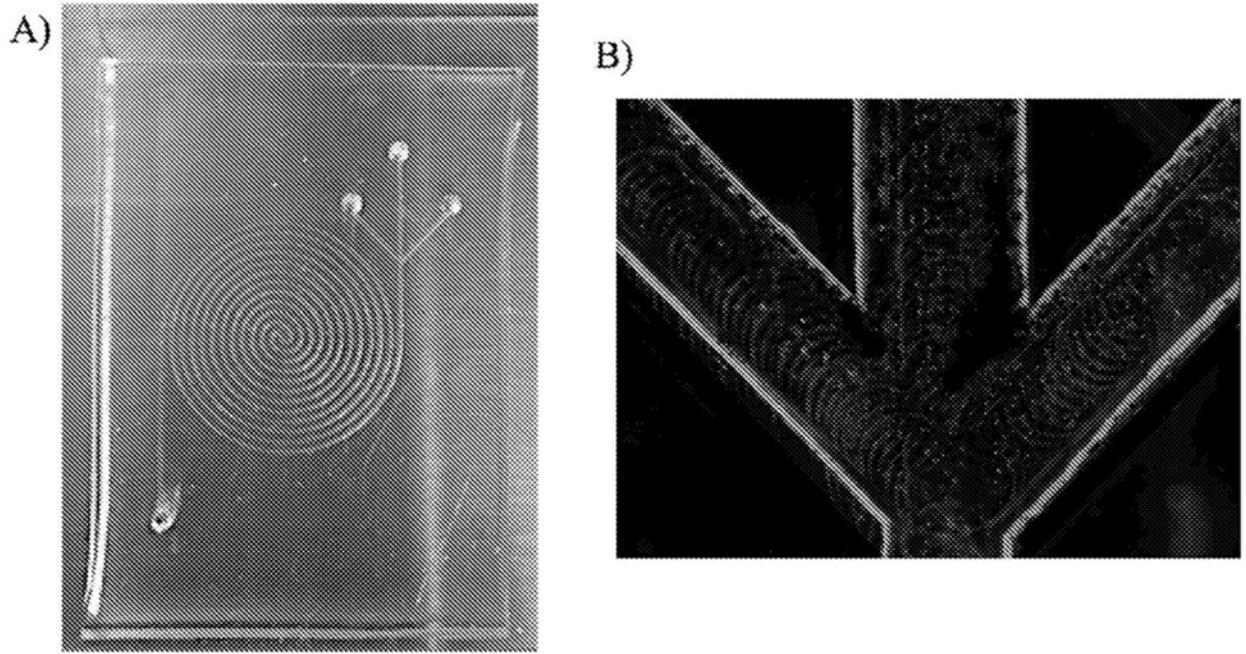


图5

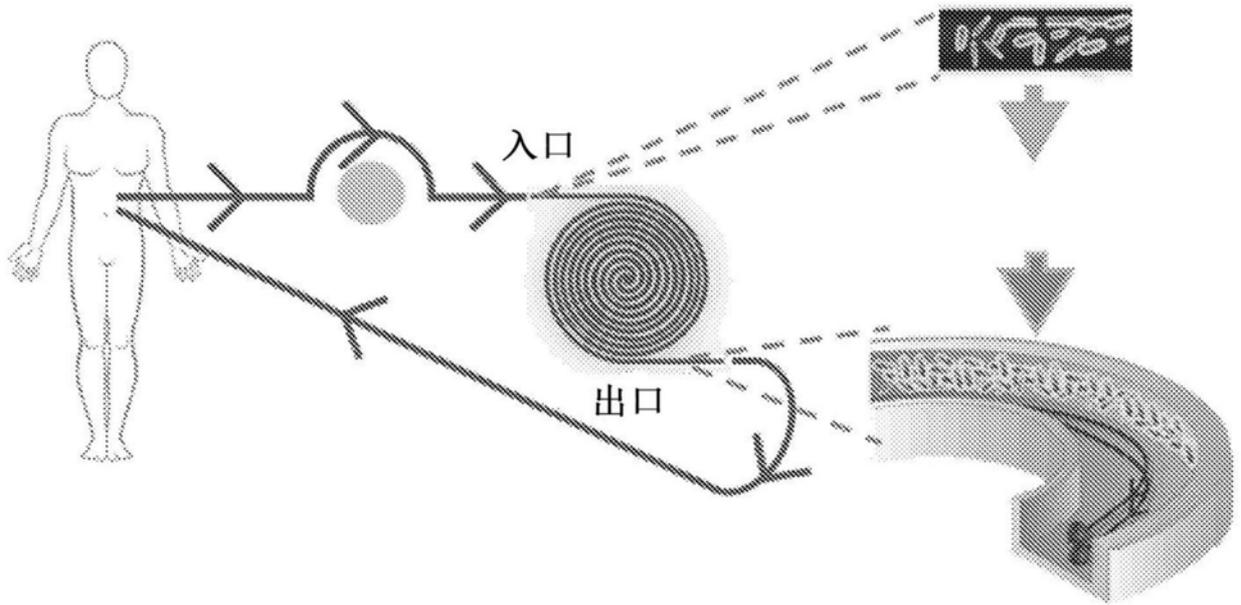


图6

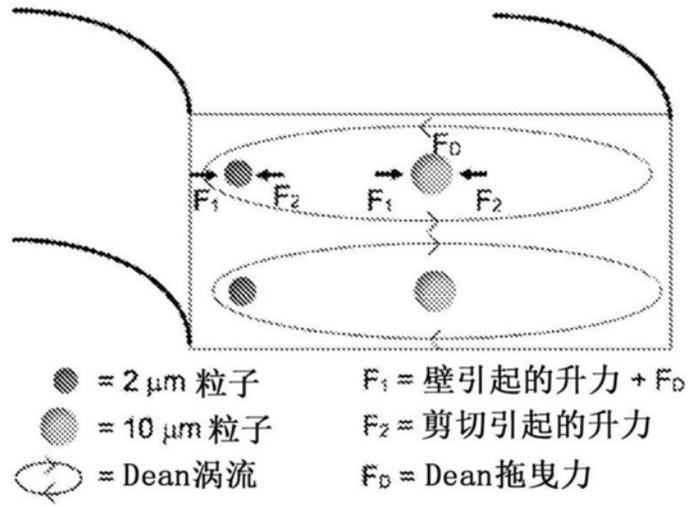


图7

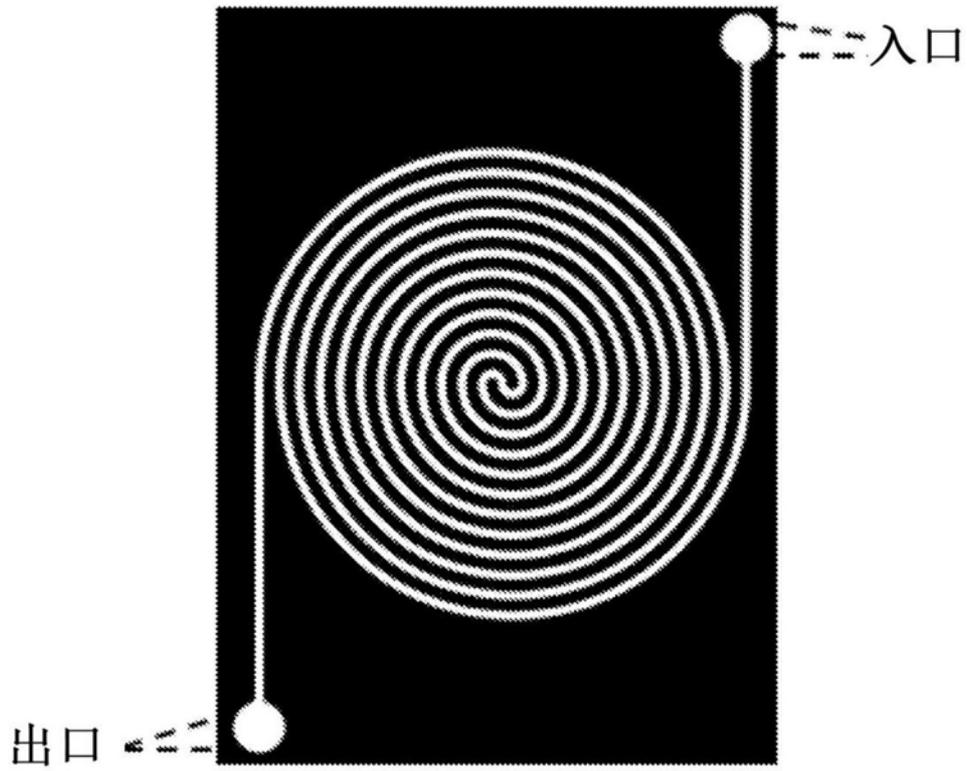


图8

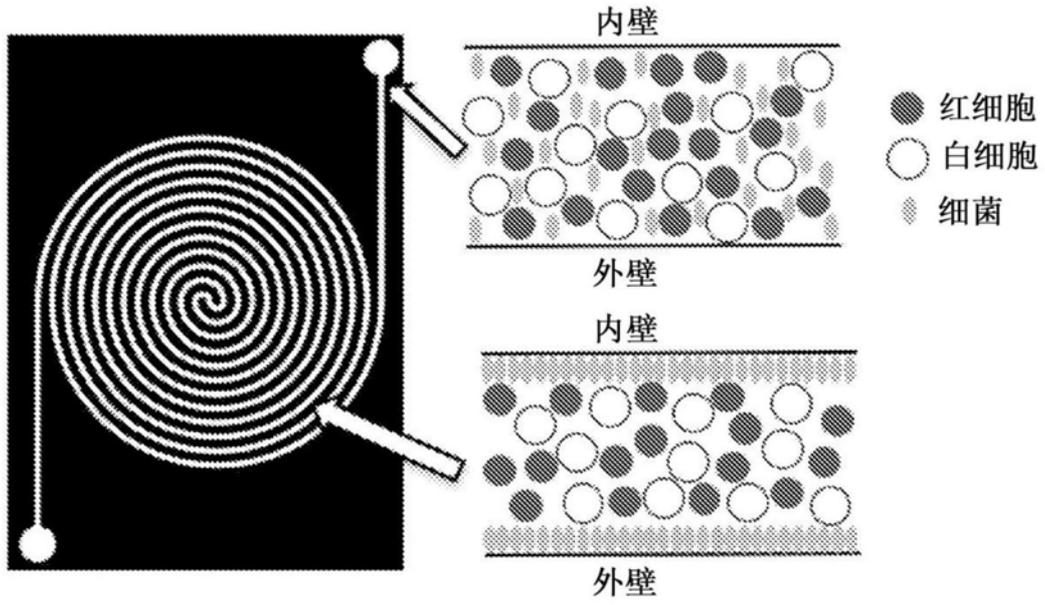


图9

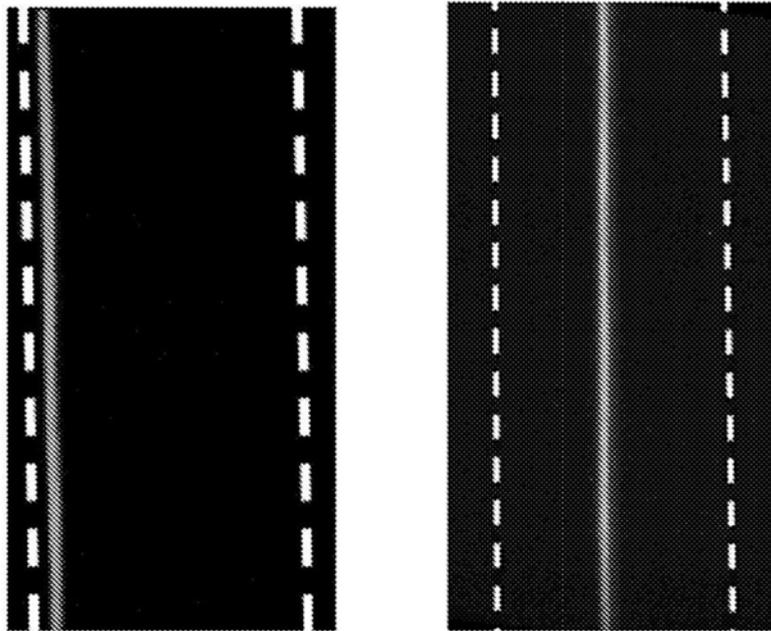


图10

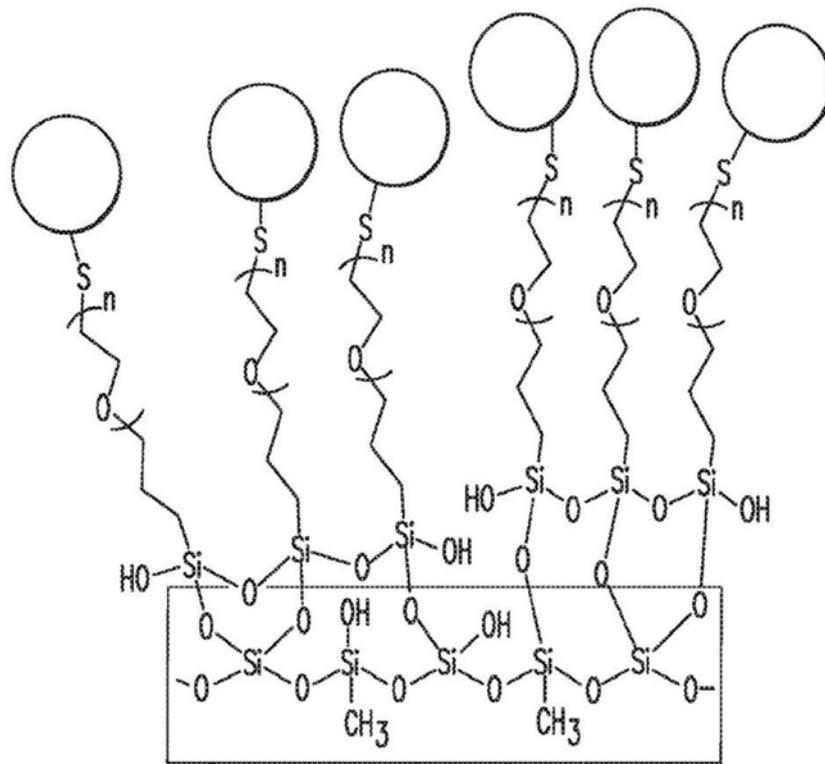


图11

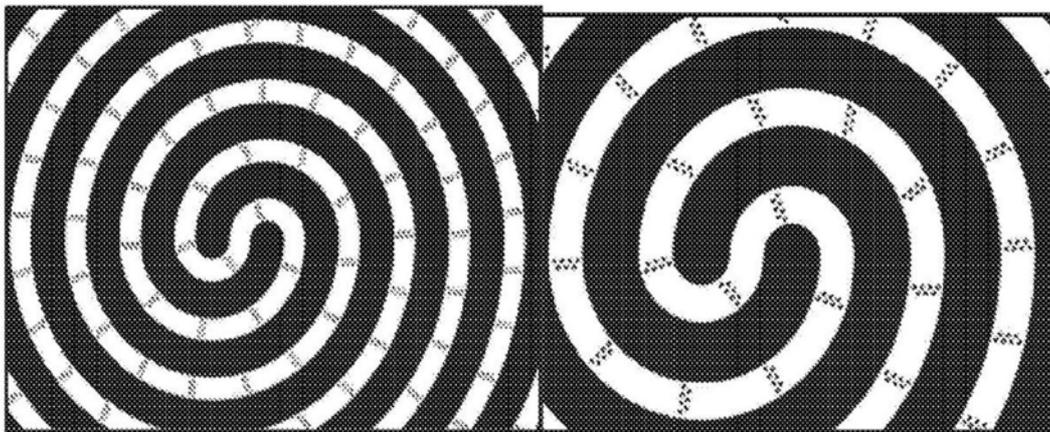


图12

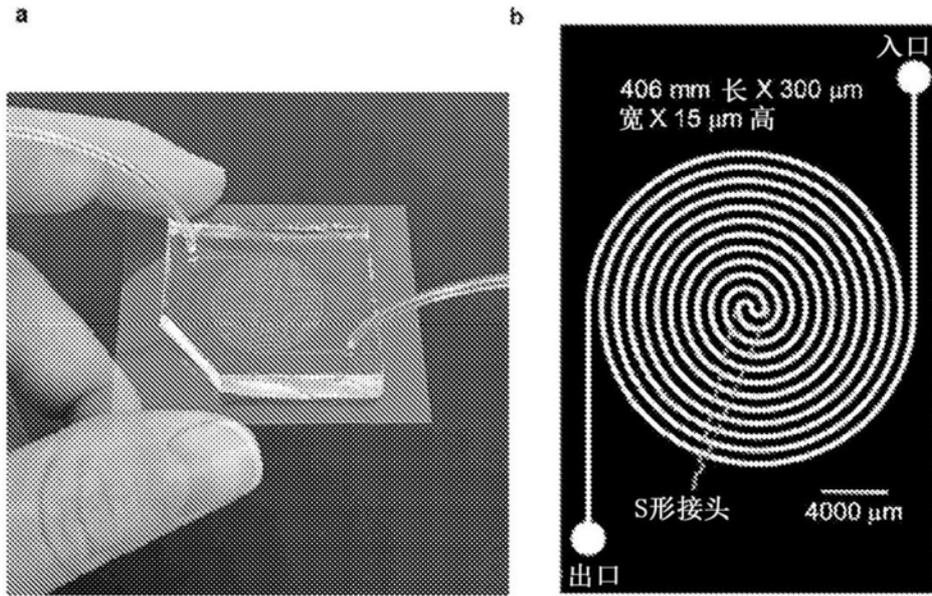


图13

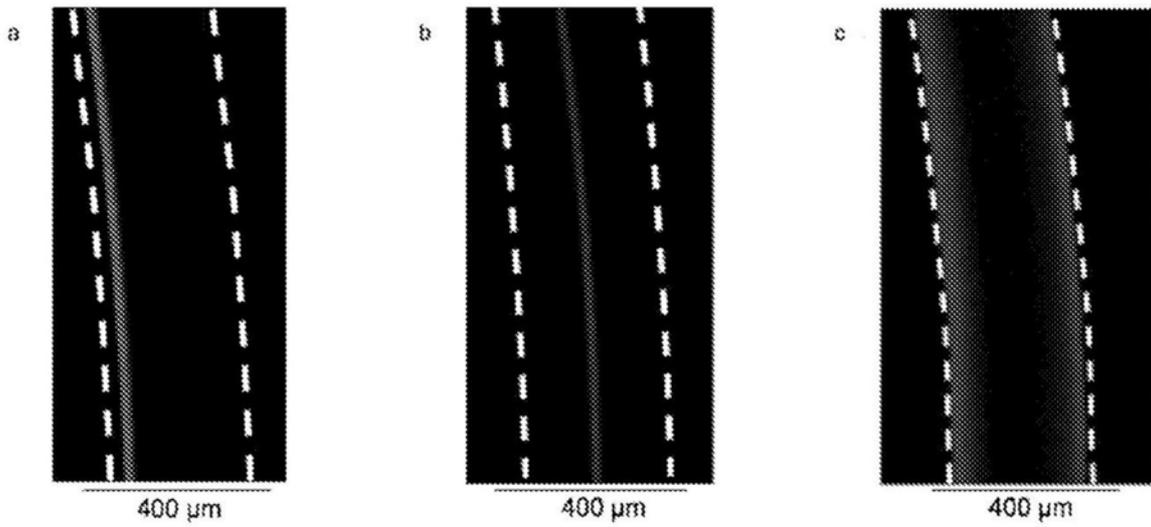


图14

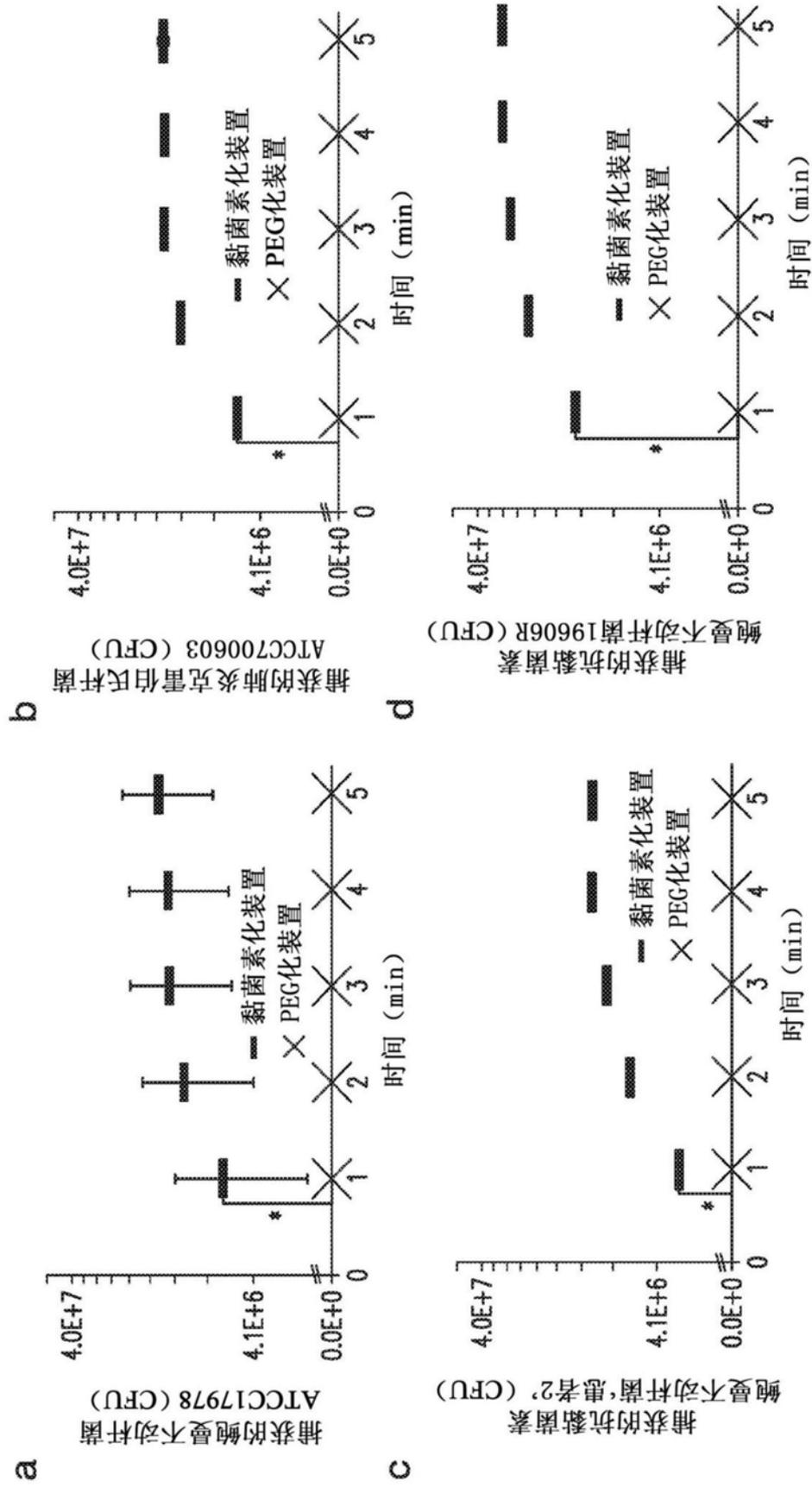


图15

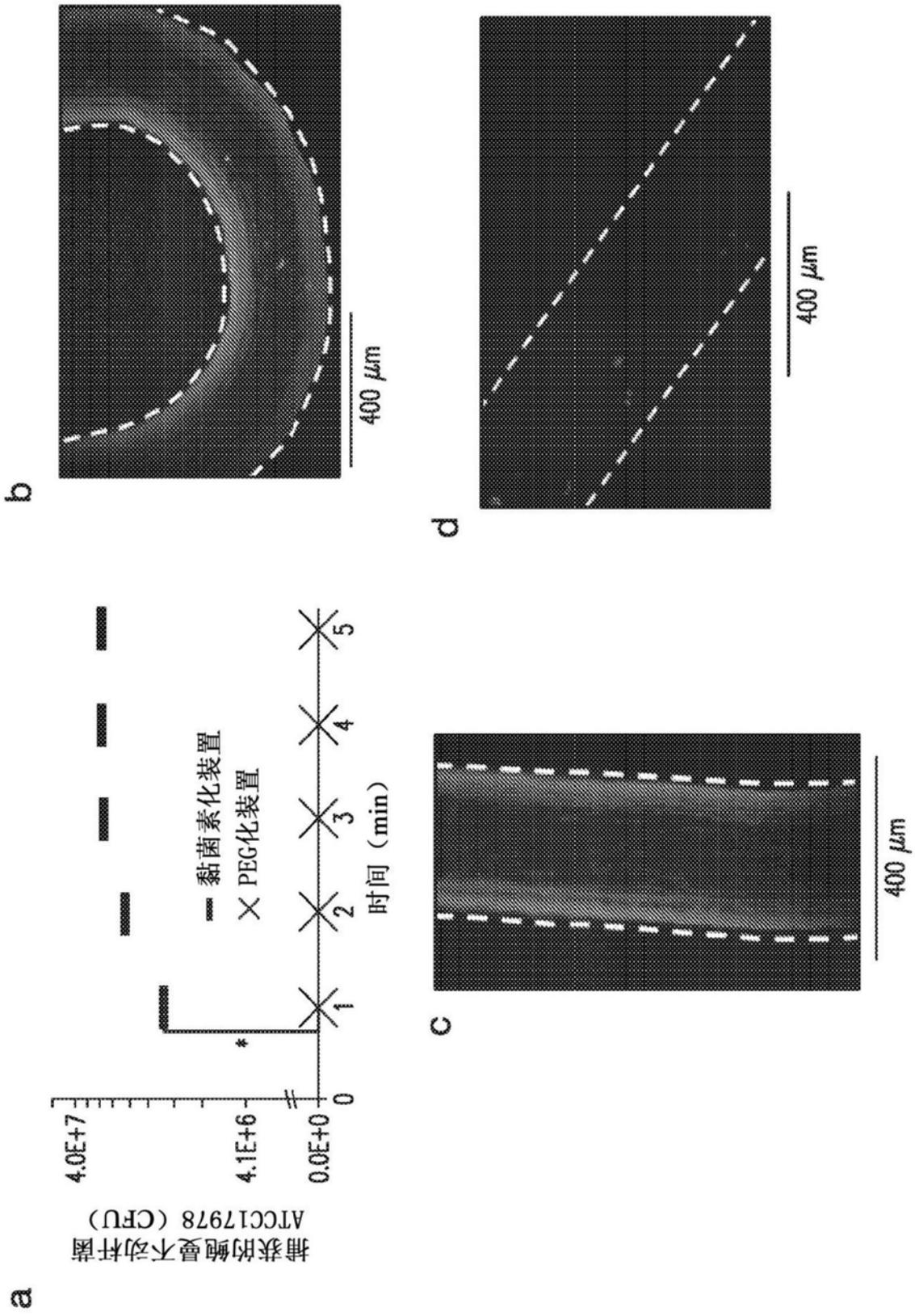


图16

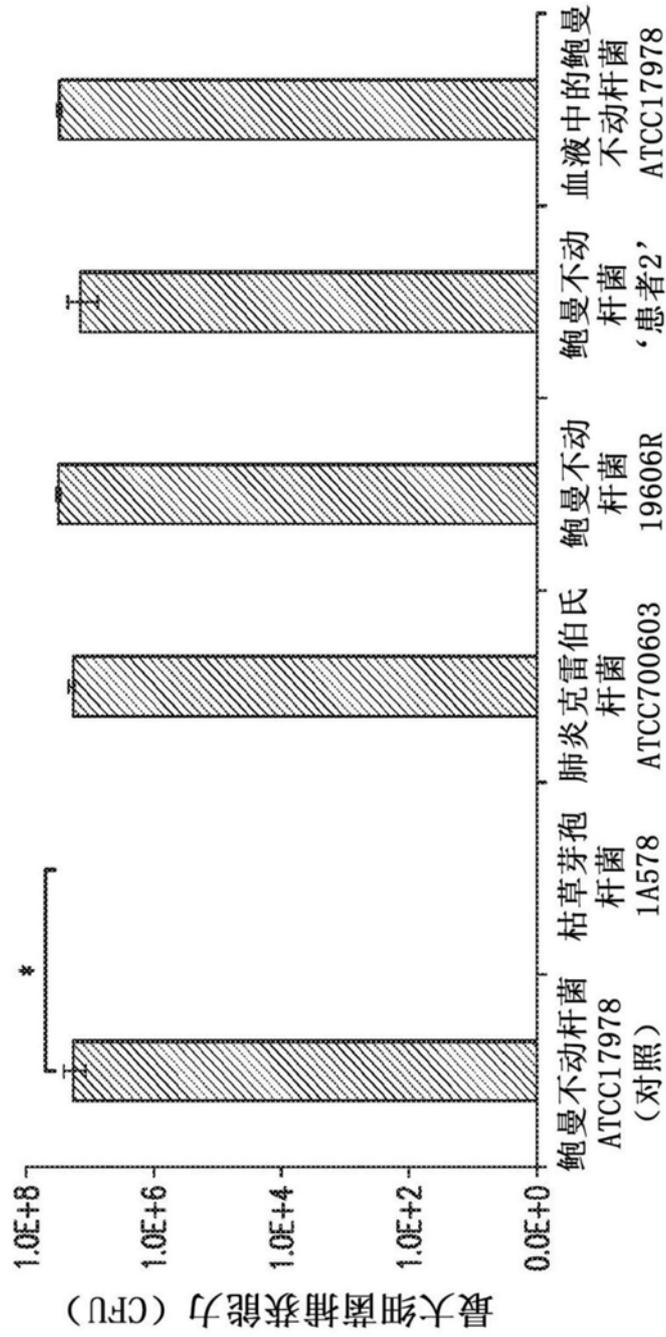


图17

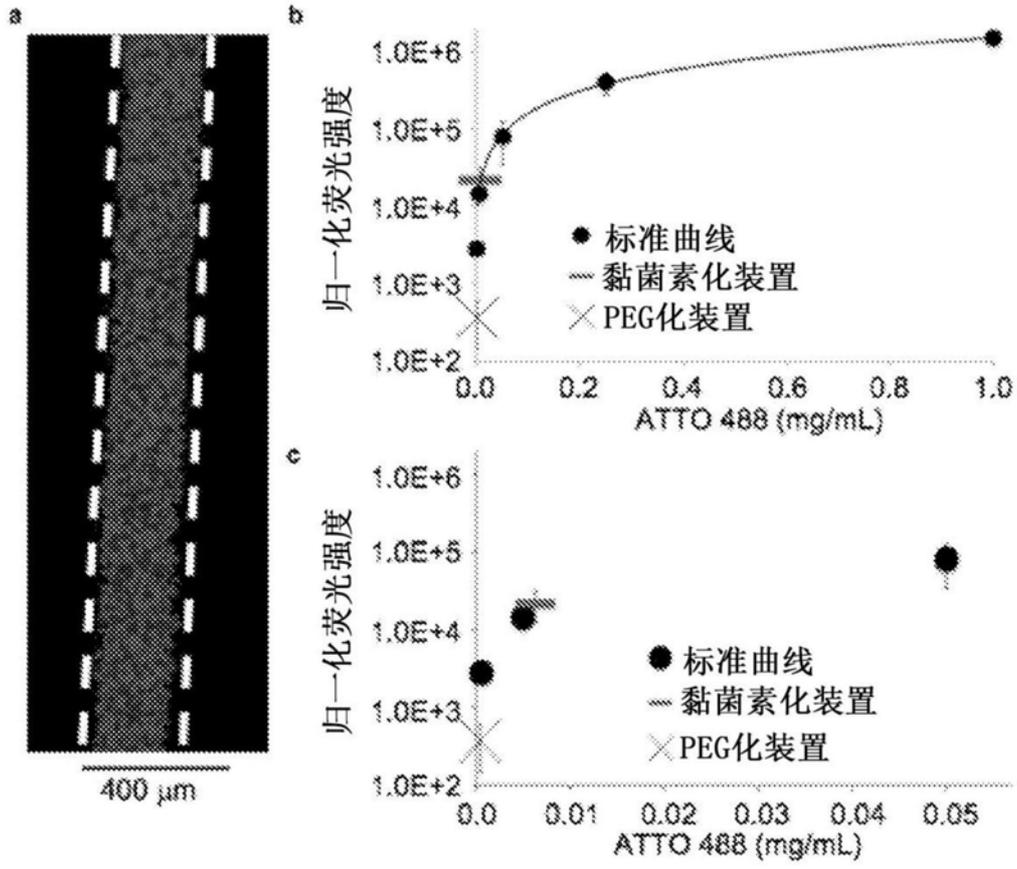


图20

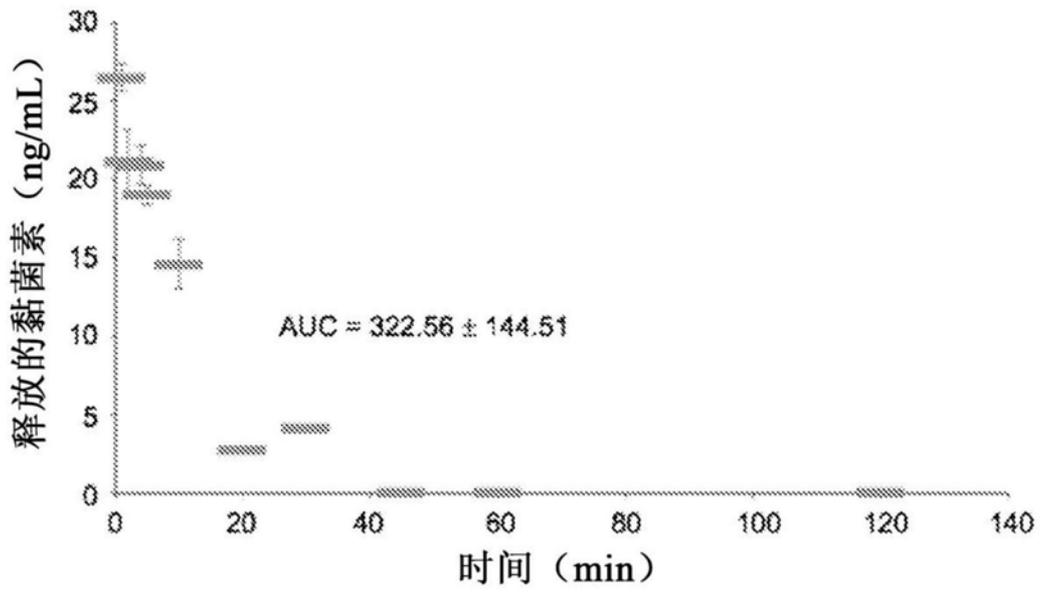


图21

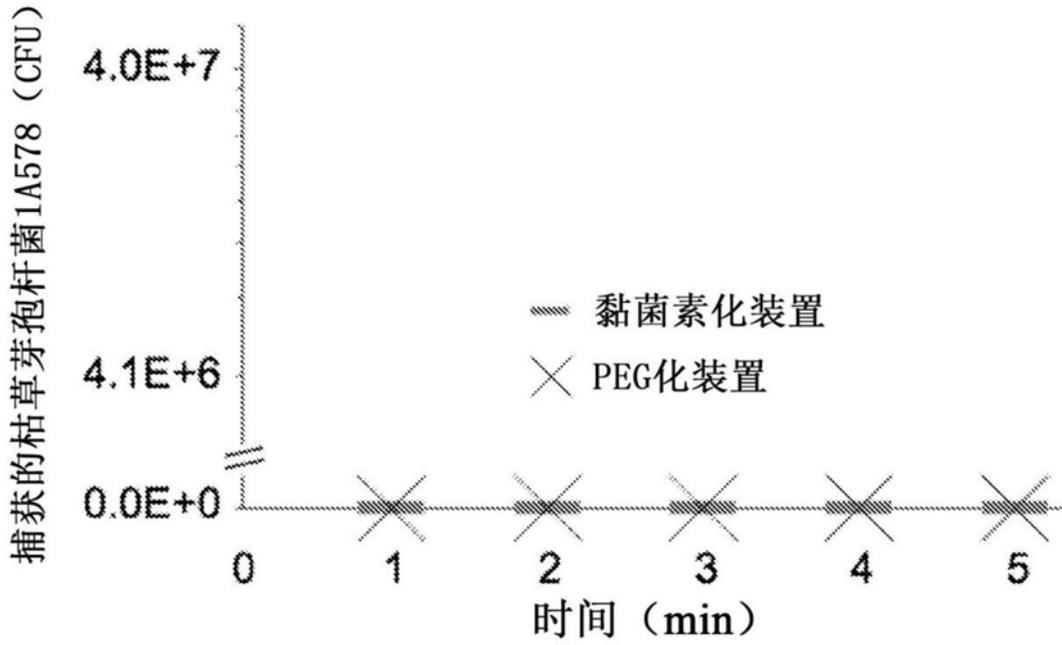


图22

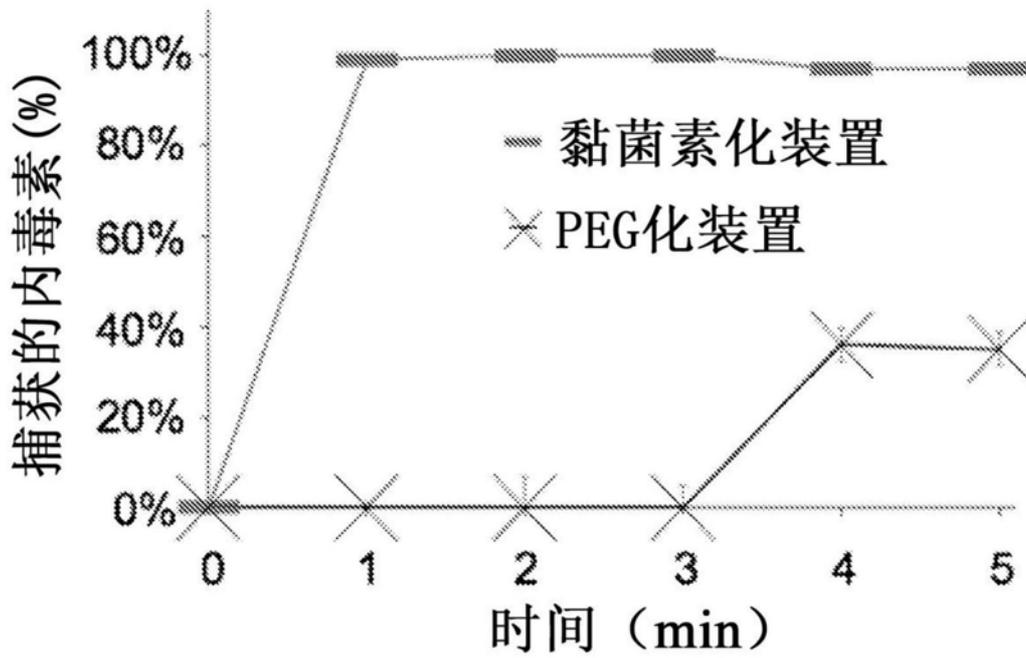


图23

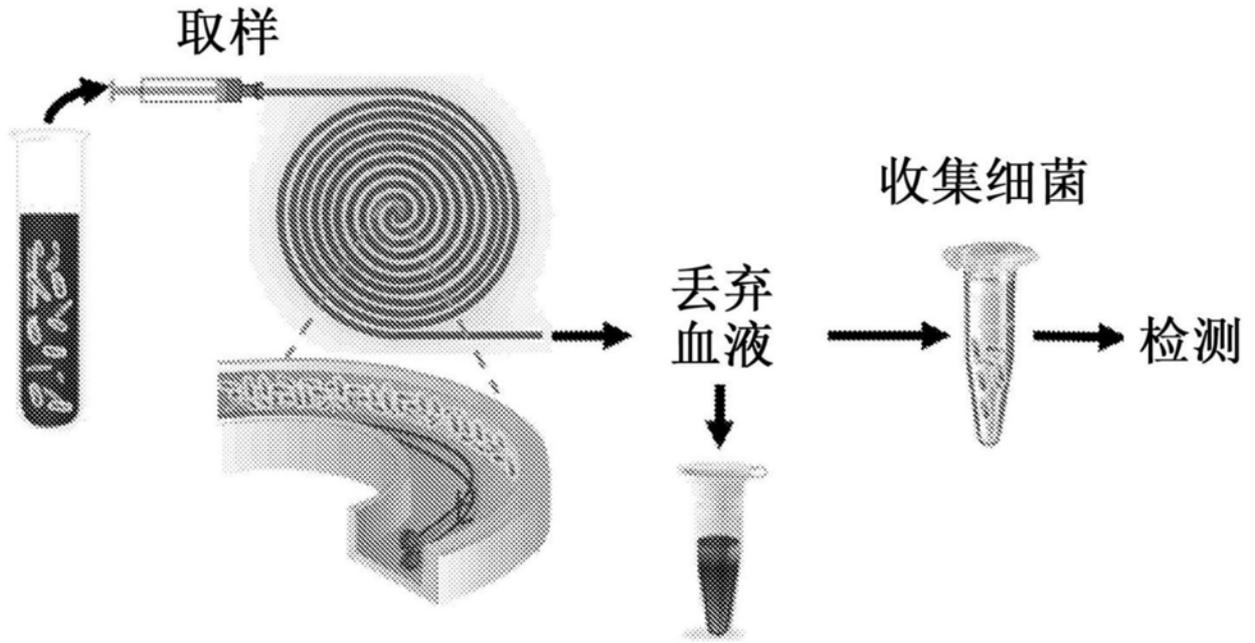


图24

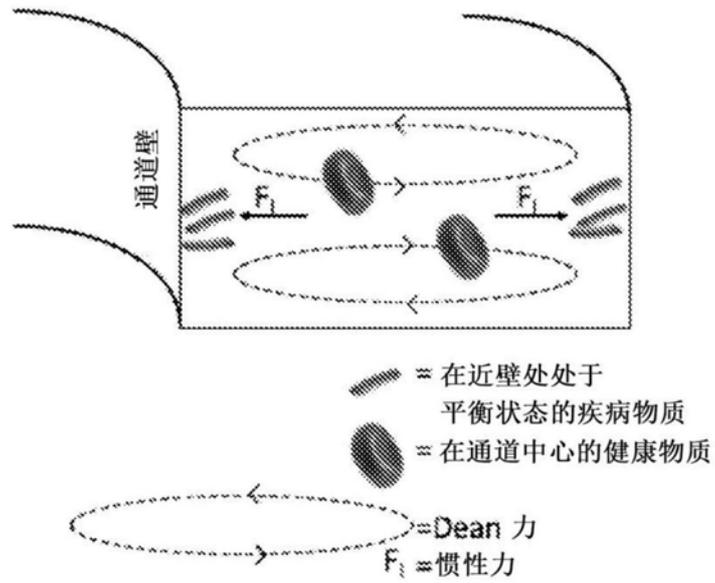


图25

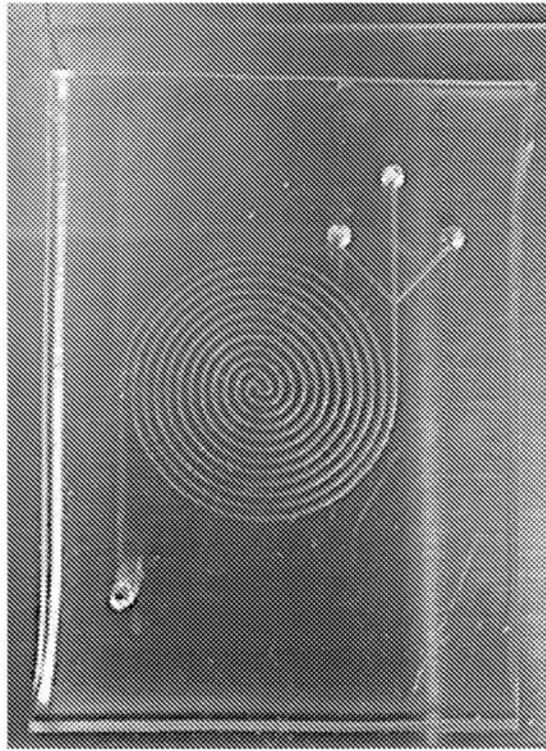


图26

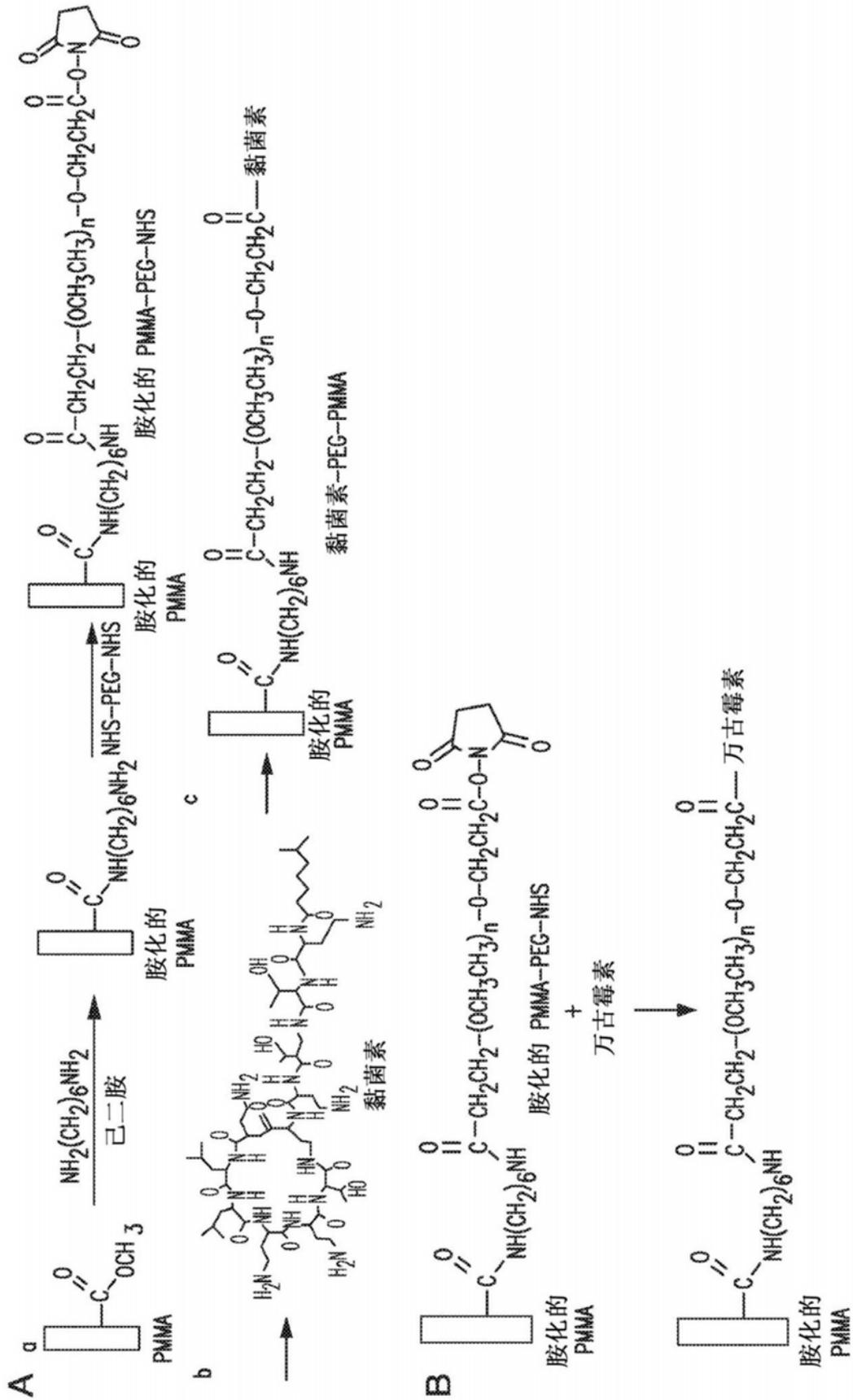


图27

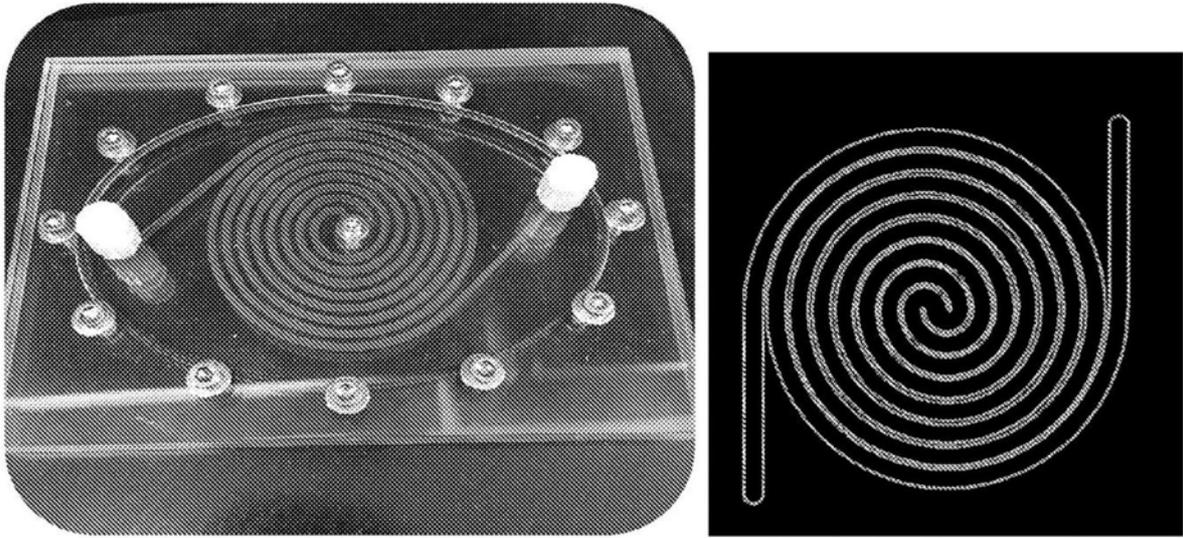


图28

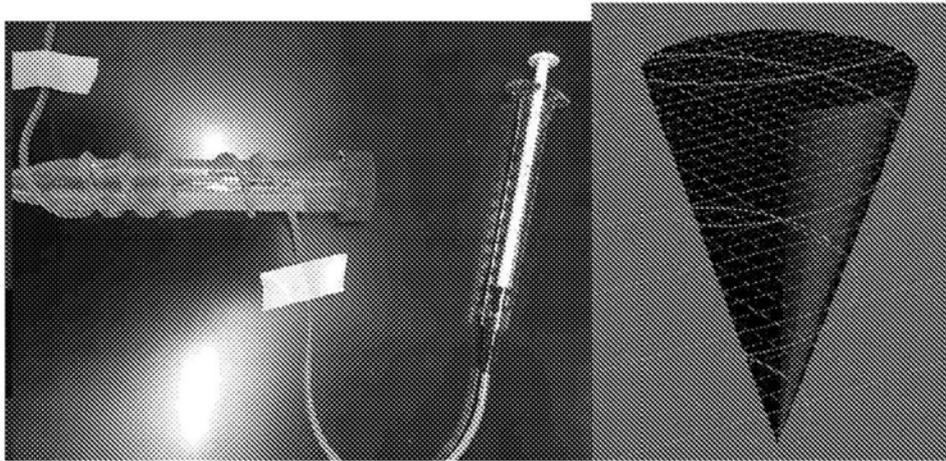


图29