



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101939644 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 05

(21) 申请号 200980104349. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 01. 10

G01N 33/48 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/483 (2006. 01)

61/020, 310 2008. 01. 10 US

C12Q 1/02 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 08. 06

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/030686 2009. 01. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/089512 EN 2009. 07. 16

(71) 申请人 休雷尔公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·L·亚穆斯 R·弗雷德曼

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

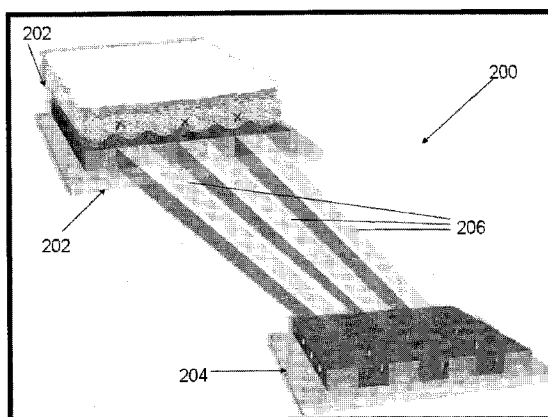
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 9 页

(54) 发明名称

免疫系统模拟装置和方法

(57) 摘要

本发明提供了通过使用免疫模拟系统来检测对测试剂的免疫反应的装置和方法,该系统包括被配置用于培养生物屏障的屏障组件、被配置用于培养免疫细胞的免疫组件,以及屏障组件和免疫组件之间的一个或多个组件间的微流体连接。该系统用于培养系统的屏障组件中的生物屏障,培养系统的免疫组件中的免疫细胞,将测试剂应用到生物屏障上,并监控免疫细胞以检测对测试剂的免疫反应。



1. 一种超敏模拟装置,包括:
配置用于培养构成生物屏障的细胞的第一培养隔室;
配置用于培养免疫细胞的第二培养隔室;
所述第一和第二隔室之间的一个或多个隔室间的微流体连接;和
配置用于观察所述装置内的细胞的光学观察组件。
2. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述一个或多个流体连接允许细胞从所述第一隔室迁移到所述第二隔室。
3. 如权利要求 1 所述的装置,还包括所述第一隔室中的细胞,其中所述细胞选自皮肤、角膜、肺内层、胃肠道内层、泌尿生殖道内层和人造皮肤。
4. 如权利要求 3 所述的装置,还在所述第一隔室中包括树突细胞。
5. 如权利要求 3 所述的装置,还在所述第二隔室中包括免疫细胞。
6. 如权利要求 5 所述的装置,其中所述第二隔室中的唯一细胞为 T 细胞。
7. 如权利要求 1 所述的装置,其中所述第一培养隔室还包括配置用于支持细胞生长的基质。
8. 如权利要求 1 所述的装置,还包括由用于提供培养基的微流体通道相互连接的多个单元的第一和第二培养组件。
9. 一种用于检测对测试剂的超敏反应的方法,包括:
提供超敏模拟装置,所述装置包括:包含构成生物屏障的细胞的第一培养隔室;包含免疫细胞的第二培养隔室;和所述第一和第二隔室之间允许流体连通的一个或多个隔室间微流体连接;
通过使培养基在所述隔室间流动在所述装置内培养所述细胞;
将测试剂应用到所述生物屏障;
监控所述装置内的细胞以检测超敏反应。
10. 如权利要求 7 所述的方法,其中构成所述生物屏障的所述细胞为选自皮肤、角膜、肺内层、胃肠道内层、泌尿生殖道内层和人造皮肤的细胞。
11. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述生物屏障包括包含培养的角质化细胞的人造皮肤。
12. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述生物屏障还包括真皮层。
13. 如权利要求 7 所述的方法,其中检测到的所述超敏反应为延迟型接触性超敏反应。
14. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述测试剂包括药物、化妆品、营养品、合成化学品、香料、润滑剂、肥皂、洗发水、发用产品、防晒剂、洗液或油。
15. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述免疫细胞包括 T 细胞,且还在所述第一隔室中包括树突细胞。
16. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述监控包括观察或测量树突细胞的迁移。
17. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述监控包括测定 T 细胞的增殖。
18. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述监控包括评估细胞的迁移和 T 细胞的增殖。
19. 如权利要求 15 所述的方法,其中所述监控包括测量迁移细胞的迁移速率和 T 细胞的增殖速率。
20. 如权利要求 7 所述的方法,其中所述生物屏障包括来自胃肠道内层的细胞。

21. 如权利要求 16 所述的方法,其中通过位于所述第一或第二隔室或者一个或多个所述流体连接中的光学观察组件监控所述树突细胞的迁移。

免疫系统模拟装置和方法

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 1 月 20 提交的美国临时申请 No. 61/020, 310 的优先权, 该申请通过引用方式结合在本文中。

背景技术

[0003] 生物体的免疫系统一方面可以保护其免于感染, 这通常是通过先天免疫系统和适应性免疫系统实现的。从简单的层面来讲, 生物体依赖物理屏障来防止例如细菌和病毒的病原体进入它们。当病原体突破这些屏障的时候, 先天免疫系统已准备好提供立即的但是非特异性的反应。从较复杂的层面来讲, 当病原体避开先天免疫反应时, 某些动物还具备第三部分, 即适应性免疫系统。

[0004] 几种类型的屏障保护生物体免于感染, 包括机械、化学和生物屏障。动物的皮肤是直接面对生物体可能遇到的暴露环境物质的生物屏障的例子。使用在非细胞异体真皮上培养的自体角质化细胞的复合皮肤替代物已经用作皮肤替代物, 这为烧伤患者带来了希望 (Robert L Sheridan 等人 Burns 2000. 27 :421-424)。

[0005] 吞噬作用是细胞先天免疫的重要特征。分类为吞噬细胞的细胞能够吞入或消灭作用物、病原体或颗粒。吞噬细胞通常游走在动物体内, 例如在皮肤内, 以寻找病原体。

[0006] 树突细胞 (DC) 是被发现与暴露于环境的动物组织相关的吞噬细胞。可在例如皮肤、角膜、鼻子、肺、胃肠道和泌尿生殖道中发现树突细胞。树突细胞已知是参与诱导 T 细胞介导的免疫应答的有效的抗原呈递细胞。一个重要的树突细胞类型是郎格罕斯细胞 (Langerhans cell)。在近些年中, 发展了用于建立和维持树突细胞的无血清的封闭培养系统 (Christina M. Celluzzi 和 Craig Welbon. 2003. Journal of Hematotherapy&Stem Cell Research. , 12(5) :575-585)。

[0007] 超敏是导致动物自身组织损害的一种免疫应答类型 (Ghaffar, Abdul (2006). Immunology-Chapter Seventeen :Hypersensitivity Reactions. Microbiology and Immunology On-Line Textbook. USC School of Medicine ;可从 <http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/hyper00.htm> 获得 ;最后一次访问是 1-10-08)。超敏反应被分为 4 类, 称为 I-IV 型 (见上文)。I 型超敏反应包括通常与变态反应相关的直接的或过敏性的反应, 并通过由肥大细胞和嗜碱性细胞释放的 IgE 介导 (见上文)。II 型超敏反应或抗体依赖性 (或细胞毒性) 超敏反应是由 IgG 和 IgM 抗体介导的 (见上文)。III 型超敏反应可由沉积在不同组织中的免疫复合物 (包括抗原、补体蛋白质及 IgG 和 IgM 抗体的聚集体) 引发 (见上文)。IV 型超敏反应被称为细胞介导的或延迟型超敏反应, 参与许多自体免疫和传染性疾病, 但也可能参与接触性皮炎 (例如毒叶藤) (见上文)。超敏反应是由例如 T 细胞、单核细胞和吞噬细胞 (包括树突细胞和巨噬细胞) 介导的。

[0008] 通过理解环境物质、免疫系统和生物体的超敏反应的相互影响既与医学相关也与商业相关。

发明内容

[0009] 一方面,本文公开了免疫模拟装置,该装置包括:配置用于培养生物屏障的屏障组件;配置用于培养免疫细胞的免疫组件;和该屏障组件和免疫组件之间的一个或多个组件间微流体连接。免疫模拟装置的屏障组件还可以包括配置用于支持细胞生长的基质。

[0010] 在一个实施方式中,免疫模拟装置还包括配置用于观察装置内的细胞的光学观察组件。细胞的观察可以包括细胞移动或 T 细胞增殖或两者的组合。细胞移动可以是免疫细胞(例如树突细胞)从一个隔室移动到另一隔室。光学观察组件可以位于任一隔室中或隔室间流体连接中。

[0011] 在一个实施方式中,该装置包括用于高通量筛选的与互连微流体通道一起多路复用的(multiplexed)多个免疫模块。

[0012] 本发明的另一方面包括用于检测对测试剂的免疫反应的方法,包括:提供免疫模拟系统,所述系统包括配置用于培养生物屏障的屏障组件、配置用于培养免疫细胞的免疫组件,和该屏障组件和免疫组件之间的一个或多个组件间微流体连接;在该系统的屏障组件中培养生物屏障;在该系统的免疫组件中培养免疫细胞;将测试剂应用到该生物屏障;和监控免疫细胞以检测对测试剂的免疫反应。

[0013] 该装置和方法中使用的生物屏障可以选自皮肤、角膜、肺内层、胃肠道内层、泌尿生殖道内层和人造皮肤。在一个实施方式中,生物屏障为包含培养的角质化细胞的人造皮肤。生物屏障还可进一步包括真皮层。在一个实施方式中,检测到的免疫反应为延迟型接触性超敏反应。

[0014] 免疫细胞可以是任何免疫细胞,例如 T 细胞和树突细胞或来自淋巴结的免疫细胞。在一个实施方式中,免疫细胞包括 T 细胞,且生物屏障包括人造皮肤和进一步包括树突细胞。在另一实施方式中,在免疫组件中包含的唯一细胞包括 T 细胞,且在评估过程中,树突细胞可以迁移到免疫组件中,作为响应于测试剂的超敏反应的指征。

[0015] 可以使用该装置来评估测试剂引起免疫或超敏反应的能力。可以测试的一些测试剂包括药物、化妆品、营养品、合成化学品、香料、润滑剂、肥皂、洗发水、发用产品、防晒剂、洗液或油。

[0016] 监控免疫细胞可以包括监控 T 细胞的增殖。在另一实施方式中,监控免疫细胞包括监控树突细胞的迁移。在一个实施方式中,可以使用一个或多个光学观察窗口来监控细胞的速率或量和/或 T 细胞增殖的速率和量。可以使用其他方式来监控树突细胞的迁移和/或 T 细胞的增殖。

[0017] 通过引用引入

[0018] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请均通过引用方式结合在本文中,就好像各出版物、专利和专利申请均具体地和单独地通过引用方式结合在本文中。

[0019] 附图简述

[0020] 本发明的新的特征特别表述在所附权利要求书中。通过参考表明示例性实施方式(其利用了本发明的原理)的以下具体描述和所附附图,可以更好地理解本发明的特征和优势:

[0021] 图 1 为免疫模拟系统的一个实施方式的示意图。

[0022] 图 2 为免疫模拟系统的一个实施方式的透视图。

- [0023] 图 3 为免疫模拟系统的屏障组件的透视图。
- [0024] 图 4 为包括免疫细胞和梯度的免疫模拟系统屏障组件的透视图。
- [0025] 图 5 为包括免疫细胞的免疫模拟系统免疫组件的透视图。
- [0026] 图 6 为免疫模拟系统的一个实施方式的截面图。
- [0027] 图 7 为包括泵、控制器和贮库的免疫模拟系统的集成实施方式的透视图。
- [0028] 图 8 为显示与用于本发明的扫描传感系统的装置通讯的代表性示例逻辑装置的框图。
- [0029] 图 9 为显示试剂盒的代表性例子的框图。

具体实施方式

[0030] 本文描述的本发明涉及模拟生物屏障中的免疫功能。典型的生物屏障包括但不限于动物和人的皮肤、角膜、肺内层 (lining)、胃肠道内层和泌尿生殖道内层。

[0031] 在进一步具体描述本发明之前,可以理解的是,这些发明不局限于所描述的特定的方法、装置、溶液或设备,因为这些方法、装置、溶液或设备当然可以发生变化。还可以理解的是,本文所用的术语仅意图用于描述特定的实施方式,并不意图限制本发明的范围。

[0032] 除非上下文明确表明存在其他含义,所使用的单数形式“一”和“该”包括复数含义。

[0033] 当提到数值范围时,可以理解的是,还具体公开了该范围的所述上限和下限之间的介于其间的各整数数值及其各分数,以及该数值之间的各子范围。任何范围的上限和下限可以独立地被包括在范围内或被排除在范围外,包括上限和下限其一或两者或者都不包括的各范围也包括在本发明之中。当讨论的数值具有固有的极限值时,例如当某一成分存在的浓度可以为 0-100%或当水溶液的 pH 可以为 1-14 时,这些固有的极限值也被具体公开了。当明确地描述一数值时,可以理解的是,与描述的数值具有大约相同的数量或量的数值也包括在本发明的范围内,基于该范围的范围也包括在本发明的范围内。当公开一组合时,该组合的元素的各子组合也被具体公开了,并且包括在本发明的范围内。相反,当公开不同的元素或元素组时,其组合也被公开了。当本发明的任何元素被公开为具有多个替代物时,本文还公开了其中各替代物被单独或与其他替代物的任何组合形式被排除的本发明的例子;一项发明的多于一个元素可以具有这种排除,因而本文公开了具有这样的排除的所有元素组合。

[0034] 除非另有限定或本文明确表明存在其他含义,本文使用的所有技术和科学术语均具有本发明所属技术领域普通技术人员所常规理解的含义。尽管与本文描述的那些方法和材料相似或等同的任何方法和材料均可用于实施或测试本发明,但优选的方法和材料如下文所述。

[0035] 本文公开的装置和方法可用于例如药物的发现和开发,以及用于消费和工业产品的测试,包括体内代用品测试。

[0036] 针对欧洲理事会指令 (European Council Directive) 76/768/EEC (当存在动物测试的替代方式时,其禁止在动物身上进行化妆品测试以及销售这类产品,并且对于三种特定的类别,截止 2009 年和截止 2013 年完全禁止在动物身上进行化妆品测试),前所未有地急需需要体外化妆品测试的严格的和预测性形式。本文描述了小鼠局部淋巴结测试

“LLNA”)的可靠替代方法。在小鼠 LLNA 中,在暴露在致敏测试物质之后,局部淋巴结中出现淋巴细胞的增殖。LLNA 测量耳部淋巴结中淋巴细胞(其排出耳部-暴露的位点)增殖的增加。通过测量掺入淋巴结细胞 DNA 中的 [3H] 胸苷,可以使用 LLNA 评估增殖。或者,可以通过使用流式细胞检测方法测量插入淋巴结细胞 DNA 中的胸苷类似物溴脱氧尿苷 (BrdU) 来评估增殖。

[0037] 集成免疫系统模拟:

[0038] 图 1 是本文公开的免疫模拟系统的一个方面的示意图。如图所示,免疫模拟系统 100 可以包括屏障组件 102,其通过组件间微流体 106 与免疫组件 104 流体连通。尽管仅显示了一个屏障组件 102 和一个免疫组件 104,但是可以想到,可以排列流体连通的多个各组件。类似地,尽管显示了三个隔室间微流体 106,但是可以想到,可采用单个或多个隔室间微流体提供流体连通。因此,可以想到,流体连通的屏障组件 102 和免疫组件 104 的并联或大量并联的配置是可能的(未显示)。

[0039] 再如图 1 所示,提供微流体 112 用于从贮库 110(例如用于培养基)和泵/控制器 108(例如用于提供和控制流体流,包括流体在系统 100 中的再循环)到屏障组件 102 和免疫组件 104 的流体连通。可以想到,如果需要的话,系统 100 可以包括多个泵/控制器 108 部件和多个贮库 110 部件。此外,根据需要,系统还可以在微流体中或在隔室间微流体中包括一个或多个阀门以控制流体流(未显示)。

[0040] 一方面,提供了体外延迟型接触超敏反应装置和其使用方法。在特定的实施方式中,免疫模拟系统提供了 LLNA 的体外替代。该系统可以包括,例如 1) 成活的表皮以提供屏障功能和皮肤代谢,2) 树突细胞/郎格罕斯细胞隔室,这些细胞可在其中被活化,3) T 细胞隔室,其允许通过迁移、活化的树突细胞(例如郎格罕斯细胞)激活 T 细胞。这些组件一起以及其他部件可以构建免疫系统模型,其是 LLNA 的体外替代,并可用于例如测量延迟型接触超敏反应。

[0041] 图 1 还显示了用于提供液体(例如培养基)的示例性泵 108 和贮库 110、至少一个屏障组件 102 和免疫组件 104。泵 108 和贮库 110 可以通过微流体 112 或多个微流体 112 与组件流体连通。微流体 112 还可以包括再循环部件。在此还可以设想,泵 108 和贮库 110 通过任何方法(如较大尺寸的流体组件,例如管)与组件流体连通。在一实施方式中,泵 108 被自动控制,或按照来自内部或外部源的方案控制,或由使用者手动控制。

[0042] 在一个实施方式中,被用于连接包含生物屏障的隔室和包含免疫细胞或 T 细胞的隔室的微流体微通道的宽度和高度可以小于约 10 微米。

[0043] 如图 2 所示,免疫模拟装置 200 可以包括与三维免疫组件 204 流体连通的三维屏障组件 202。如图所示,隔室间微流体 206 可以提供屏障组件 202 和免疫组件 204 之间的流体连通。图 3 显示了屏障组件 202 的一个实施方式的细节。在一实施方式中,免疫模拟装置还包括配置用于观察装置内的细胞移动的光学观察组件。细胞移动可以是免疫细胞(例如树突细胞)从一个隔室移动到另一隔室。观察组件可以是光学透明的。在一实施方式中,观察组件是隔室间微流体 206。在另一实施方式中,观察组件还包括与免疫模拟装置接触或与免疫模拟装置光学连通的成像组件。例如,CCD 照相机、显微镜、CMOS 传感器或光电二极管可用作成像组件来观察免疫细胞从一个隔室向另一隔室的移动。在具有多个屏障隔室 202 或多个免疫隔室 204 的实施方式中,装置可以包括多个观察组件。

[0044] 在某些实施方式中,可以使用单个免疫系统模块;但是非常有用的是,能够通过高通量筛选来快速筛选大量物质对生物屏障的生理影响。在一些实施方式中,免疫模块被制备成微阵列,以在单个平台或芯片上提供多个免疫模块。人们可以在单个平台或芯片上使用 1、2、10、12、20、24、50、70、96、100、384 或 1536 或者任何数目的单个免疫模块。通过使用这类阵列,本文描述的免疫模拟装置可被制成高通量形式,以作为动物测试系统的替代使用活体细胞筛选潜在的致敏性或毒性。

[0045] 免疫模拟装置的微阵列具有使模块的多个组件在芯片上的可编址位置上的各种不同实施方式。例如,本文描述的装置的单个组件(例如屏障组件或免疫组件)可以构成阵列的单元,或者完整的免疫模块可以表示微阵列上呈现的许多单元的单个单元。通过一个或多个观察组件与免疫组件流体连通的屏障组件可以构成阵列的单元。通过一个或多个观察组件与多个免疫组件流体连通的多个生物屏障组件可以构成阵列的单元。许多生物屏障组件可配置为与一个或几个免疫组件微通道连通,或者一个或几个生物屏障可配置与许多免疫组件微通道连通。在一个实施方式中,监控阵列来测量独立地或单独地应用到分离的生物屏障上的多个测试剂的综合作用,但是仍能使各单个测试剂的一些效应区分开。

[0046] 被配置为独立地控制阵列的各单元的流速的微流体系统可以有助于将培养基有效地输送给阵列上的细胞。该系统可以使用系统中的阀门和传感器控制向微阵列的单个模块提供不同的流速。该系统可以包括反馈监控系统以根据免疫模块的代谢需求个体化地控制培养基的输送。

[0047] 图 3 表明了免疫模拟装置的屏障组件 302。屏障组件 302 可以包括基底 303。基底 303 的例子包括但不限于玻璃、聚合物、硅和金属。基底 303 可以包括适宜细胞生长的材料。基底 303 可以包括单个或多个培养基获取通道 305。在另一实施方式中,培养基获取通道 305 位于基底 303 的表面上。培养基获取通道 305 的形状可为如图 3 的示例性实施方式所示的方管状,或可为本领域普通技术人员显而易见的其他任何形状。多个培养基获取通道 305 之间的空间或免疫模拟装置的边缘可包括至少一个免疫组件获取通道 307。免疫组件获取通道 307 可与装置的免疫组件流体连通。

[0048] 在一个实施方式中,培养基获取通道 305 可以包括单个或多个流体通孔 309,可通过通孔 309 向生物屏障 311 提供培养基。可以想到,培养基获取通道 305 可以具有多个流体通孔 309,且在一些实施方式中,在培养基获取通道 305 的表面上具有多个流体通孔 309。生物屏障 311 可以包括任何生物实体,例如结缔组织和上皮细胞。在一实施方式中,生物屏障 311 包括上皮细胞。还可以想到,生物屏障 311 可以进一步包括表皮组织和真皮层的至少一种。在另一实施方式中,真皮组织位于上皮组织和培养基获取通道 305 之间。生物屏障 311 可以包括成纤维细胞。在另一实施方式中,生物屏障 311 包括树突细胞,例如郎格罕斯细胞。在再另一实施方式中,聚合物基质位于生物屏障 311 和培养基获取通道 305 之间(未显示)。该基质可以附着到屏障组件的基底上,且可以作为例如生物屏障的连接部件。

[0049] 图 4 表明免疫模拟装置的屏障组件 402 的另一示例性实施方式。该图显示了位于基底 403 上的多个培养基获取通道 405 中的流体通孔 409。可以通过培养基获取通道 405 向生物屏障 411 提供培养基。在图 4 的示例性实施方式中,多个培养基获取通道 405 之间的区域和/或体积显示为免疫组件获取通道 407。生物屏障 411 可以包括吞噬细胞,例如树

突细胞 414,其可用生物屏障 411 培养,且能够移动脱离生物屏障 411。典型的树突细胞为郎格罕斯细胞。可在生物屏障 411 内形成影响树突细胞的物质梯度 416,从而树突细胞 414 从该屏障移动离开。例如,物质可与生物屏障 411 的表面相接触,以在屏障中产生其中树突细胞 414 从该屏障移动离开的响应。在另一实施方式中,通过使该层与引诱剂连通在生物屏障 411 中形成梯度 416,其中引诱剂产生其中树突细胞 414 从生物屏障 411 移动离开的梯度 416。在一实施方式中,树突细胞 414 在免疫组件获取通道 407 内移动离开生物屏障 411。

[0050] 图 5 表明免疫模拟装置的示例性免疫组件 504。在一实施方式中,免疫组件 504 包括基底 503 和至少一个培养基获取通道 505。培养基获取通道 505 可以包括单个或多个流体通孔 509,培养基可以通过通孔 509 流出通道。可以在与培养基获取通道 505 和 / 或基底 503 流体连通的情况下培养免疫细胞 (T 细胞或免疫淋巴结细胞) 517。在一实施方式中, T 细胞或免疫淋巴结细胞 517 粘附到基底 503 或培养基获取通道 505 上。在另一实施方式中,基底 503 包括如上针对屏障组件讨论的基质。多个培养基获取通道 505 之间的区域或体积或基底的边缘可以包括单个或多个 T 细胞隔室或淋巴结隔室通道 518。

[0051] 图 6 表明了免疫模拟装置 600 的一个实施方式。示例性的装置包括:包括生物屏障 611 和屏障基底 603 的屏障隔室、包括免疫基底 619 和免疫细胞 (T 细胞或免疫淋巴结细胞) 617 的免疫隔室 615、屏障隔室界面 623、免疫隔室界面 621 和微流体 612。在该示例性的实施方式中,免疫模拟装置 600 包括可用于构建该装置的多个层。屏障隔室是分离的基底 (屏障基底 603) 的部分或连接到分离的基底上,免疫隔室 (免疫基底 619) 则不是这样。基底可以包含相同或不同的材料。在一实施方式中,基底彼此粘附在一起。在另一实施方式中,基底彼此流体连通。

[0052] 图 7 表明在此描述的集成免疫模拟系统 700 的一个方面,该集成免疫模拟系统 700 包括通过组件间微流体 706 与免疫组件 704 流体连通的屏障组件 702。在一实施方式中,集成系统 700 位于基底 703 上或是基底 703 的一部分。系统还可以包括用于通过微流体 712 从贮库 710 向系统的组件提供流体的泵 708。可用于集成免疫模拟系统 700 中流体的例子包括但不限于细胞培养基。在一实施方式中,微流体 712 将组件的培养基获取通道连接到贮库 710,其中贮库 710 可以通过泵 708 向通道和组件提供培养基。在另一实施方式中,微流体 712 通过毛细作用向系统的组件提供培养基。向组件提供液体的微流体 712 可以包括流阻器 (fluidic resistor) 720 以根据需要影响流体的流动。

[0053] 在一实施方式中,例如在图 7 中的示例性的实施方式中,集成免疫模拟系统 700 用来模拟免疫系统反应。例如,生物屏障的层 (例如上皮) 可进行培养或置于屏障组件 702 上,并通过微流体 712 提供培养基,以维持生物屏障的健康。生物屏障可以是上皮,例如人造皮肤,包括表皮和真皮,其中上皮可以暴露在环境中以更接近地模拟人体上的皮肤。在一个实施方式中,人造皮肤被维持在半渗透膜上。为了模拟免疫系统,可将测试物质应用到生物屏障的表面上,其随之导致生物屏障内的免疫细胞 (例如树突细胞) 活化或从生物屏障迁移出 (或使用例如引诱剂或驱逐剂物质被诱导迁移)。树突细胞可与系统的免疫组件 704 形成流体连通。免疫组件 704 可包括吸引性的免疫系统细胞,例如 T 细胞,以模拟体内免疫系统。由于树突细胞形成从一个组件向另一组件移动的梯度,可测量或观察树突细胞的移动以确定应用到生物屏障的物质的免疫反应。或者,可以测量树突细胞活化导致的 T 细胞

的增殖。

[0054] 在一个实施方式中,本文描述的免疫模拟装置的检测方法包括与测量 T 细胞活化结合的树突细胞的趋化率 (rate of chemotaxis)。可以通过向免疫组件迁移的细胞数目来测量趋化率,而可以通过细胞增殖的程度或 T 细胞衍生细胞因子的分泌程度来测量 T 细胞的活化。例如,可以使用基于荧光的细胞标记来定量这种增殖的水平。通过结合趋化率和 T 细胞活化率或程度,本文描述的免疫模拟装置可以提供有关产生细胞应答的致敏测试剂的相对敏化潜力和 / 或浓度的信息。通过结合趋化率和 T 细胞活化率,有可能确定测试剂引发细胞应答的阈值水平。利用对两个参数的分析进行更为精确和动态的评估。例如,可以向生物屏障组件应用各种不同浓度的物质,且可以量化树突细胞迁移和 T 细胞活化之间细胞动力学 (例如反应率) 的浓度依赖性的变化。这种分析更好地确定可在体内应用的制剂中耐受的测试剂的致敏潜力和 / 或阈值水平。在一个实施方式中,测量了迁移细胞的迁移速率 (rate of migration) 和 T 细胞增殖的速率 (rate of the proliferation)。或者,可以测量迁移细胞的迁移量 (迁移细胞的数目) 和 T 细胞增殖的水平。

[0055] 在集成免疫模拟系统 700 中潜在地产生免疫反应的测试物质的例子包括但不限于药物、化妆品、营养品、合成化学品、香料、润滑剂、肥皂、洗发水、发用产品、防晒剂、洗液和油。

[0056] 生物屏障可以是来自任何生物屏障的细胞,例如皮肤、角膜、肺内层、胃肠道内层、泌尿生殖道内层或包含培养的角质化细胞的人造皮肤。

[0057] 使用任何生物屏障,有可能筛选测试剂并鉴别超敏反应。例如,人们可以使用来自角膜的细胞作为测试装置中的生物屏障。同样地,可以使用来自胃肠道的细胞作为装置中的生物屏障以筛选测试剂在例如炎症肠病、克隆氏病、溃疡性结肠炎、溃疡性直肠炎或原发性硬化性胆管炎的状态中的敏感性。选择来自身体的不同生理区域的特定细胞来形成生物屏障可使人们针对各种不同的疾病或状况和各种不同的生理系统来调整筛选方法和分析测试剂的超敏性。

[0058] 角质细胞“人造皮肤”组件:

[0059] 描述的实施方式一个目的在于提供作为活表皮模型的人造皮肤。为了获得这种人造皮肤,可以使用本领域中已知的角质化细胞培养的标准技术。在一个实例中,原代角质化细胞可从人包皮样品中获得,且可以通过将淹没的培养物升高到空气-液体界面上来形成分层的培养物。在另一实施例中,可以替代地使用重建的皮肤模型。例如,可以使用如 SkinEthic Laboratories 描述的 REALSKTN FT 或 EpiSkin (参见 http://www.skinethic.com/_int/_en/index.aspx; 最后一次访问该网页是 1-4-09)。可以使用增殖和分化的标志物 (例如 Ki67、内皮蛋白 (involucrin) 等) 来监控 / 跟踪角质化细胞的生长和发育。

[0060] 可以评估人造皮肤的许多特征,包括但不限于评估屏障功能 (例如通过渗透性研究)、评估代谢和评估人造皮肤的分层组织的成熟。可以例如通过向细胞培养基中的简单添加或通过置于人造皮肤顶部的染料饱和的滤器的局部应用评估人造皮肤的屏障功能。可以例如通过监控荧光染料在从角质化细胞单层发展为三维的分层表皮的几个阶段的渗透性评估屏障功能。可以例如通过使用非荧光染料的 HPLC 方法或荧光染料的共焦显微分析测定染料的渗透性。可以例如使用包含伯氨基的化合物 (例如对氨基苯甲酸、苯佐卡因和偶氮彩色还原产物) 以及对照的非代谢化合物 (例如如苯并 [a] 芘和 / 或 7- 乙氧基香豆

素)来监控皮肤层中的代谢。

[0061] 树突细胞/T细胞组件：

[0062] 本发明的另一目的在于提供作为与屏障层相互作用的免疫系统组件模型的树突细胞和/或T细胞组件。在一个实施方式中,提供了用于培养树突细胞和通过使用例如配备有DIC物镜、落射荧光(epifluorescent)照明和CCD照相机的倒置显微镜的随时间的显微分析观察它们的迁移的隔室、池、腔或通道。可以想到,使用本文描述的装置有可能观察到迁移的活化树突细胞。例如,当树突细胞从培养的人造皮肤屏障层迁移出来时,可以通过显微镜观察树突细胞。可以在任何屏障组件、组件间微流体连接和免疫组件中或它们所有中进行观察。

[0063] 在特定的实施方式中,由于下游异源刺激,树突细胞趋化性地朝向包括其它免疫细胞(例如T细胞)的隔室、池、腔或通道。在该实施方式中,可在相互连接的分开的隔室、池、腔或通道中培养两种类型的细胞。可以想到,相互连接可以是任何形式的流体连接,包括但不限于通道、微通道、管、槽等。培养和相互连接的细胞类型数目不应该局限于仅两种。可以想到,可以在细胞类型之间提供理想的相互作用的构造中培养多个免疫系统细胞组件(例如三个或更多、四个或更多等)。

[0064] 除了树突细胞以外或代替树突细胞,可以设想,其他吞噬细胞类型(例如巨噬细胞和/或嗜中性粒细胞)可以代替树突细胞来研究与屏障层的免疫系统成分的相互作用。

[0065] 可以使用例如本领域公知的荧光方法来评估T细胞对树突细胞的异源刺激。可以通过多种方法来评估细胞迁移和T细胞的增殖的分析。在一个实施方式中,装置中提供有光学透明的区域以视觉观察细胞。可以在装置的各种不同地方整合一个或多个这样的光学窗口,包括第一隔室、第二隔室和一个或多个相互连接的微流体通道。通过使用显微镜,可以观察迁移细胞的速率和数目以及增殖T细胞的速率和数目。

[0066] 在其他实施方式中,本文的装置可以使用其他方法来鉴别用于指示物质对一种或多种生物屏障的效应的生物标志物。可通过本领域已知的分析方法表征迁移到屏障组件外的树突细胞。可使用的分析方法包括通常用于分析RNA表达水平、遗传物质的含量、糖蛋白和由细胞产生的生物物质的组成的方法。分析方法的非限定性的例子包括聚合酶链反应、DNA测序、DNA印迹法、RNA印迹法、蛋白质印迹法、微阵列、2D电泳和免疫分析。

[0067] 在一个实施方式中,将所研究的物质应用到生物屏障组件上,收集迁移的树突细胞或者另外鉴别生物屏障组件外或内的迁移的树突细胞,和可以确定迁移细胞的特性。例如,可以分析由此收集的细胞的蛋白质表达分布。将蛋白质分布与代表正常或静止的树突细胞的蛋白质分布相对比,差异性表达的或与所述收集的树突细胞唯一相关的蛋白质被识别为生物标志物。在另一实施方式中,提供了通过本文描述的装置识别的生物标志物,以表明存在通过树突细胞基本可检测水平的物质。在再另一实施方式中,生物标志物的水平与表明物质的相对致敏潜力的预测值相关。可以进行迁移树突细胞活化水平的评估以筛选测试剂以及其对生物屏障组件的作用。在一个实施方式中,装置可仅包括具有迁移树突细胞的生物屏障,且可以评价迁移树突细胞的活化。

[0068] 在一个实施方式中,装置的免疫组件可以包含T细胞及其他细胞,例如存在于淋巴结中的细胞。在另一实施方式中,在分析开始时,免疫组件在隔室中仅包含T细胞而不包含任何其他细胞。T细胞可在配置为促进细胞生长的常规载体或基质上以2-D层进行培

养,或者 T 细胞可以使用本领域已知的常规培养技术在培养基的悬浮液中培养。在分析过程中,来自生物屏障隔室或层的树突细胞可以迁移到免疫隔室或层中。

[0069] 有利的是,在一个实施方式中,系统用于锁定(或集中)了移动细胞上的分子、试剂或化合物(例如趋化剂)的浓度梯度。为了实现该点,在一个特定的实施方式中,可以在微流体通道中建立梯度,具有实时调节梯度的位置和斜率的额外能力。在相关实施方式中,可以通过包括计算机控制器来提供系统的控制,该计算机控制器例如随着移动细胞的位置和形状的改变调节梯度的位置和斜率。通过这样的计算机控制,有可能实现将趋化因子刺激的时间和空间成分解偶联(decouple)的反馈系统。还可以想到,可使用芯片上阀的系统在微流体通道内控制移动细胞上浓度梯度的斜率和位置。计算机可通过可能包括例如细胞的物理位移、在定向迁移过程中细胞形状的改变或参与信号传导过程的荧光标记分子的表达水平的反馈机制(feed-back loop)控制该阀。

[0070] 提供的树突细胞可以来自人血液及树突型细胞系,例如 MUTZ-3,其可被诱导成熟(例如表达 CD83、CD1a 等)。可以监控迁移细胞的形态改变,并可用于探测成熟水平、抗原摄取、抗原呈递和/或 T 细胞激活。

[0071] 作为一个非限定性的例子,梯度分子可以是趋化因子配体(CCL19)/MIP3- β 和 CCL21/SLC,其是由淋巴结(LN)和其他免疫细胞组成型表达的两种趋化因子,其具有共同的趋化因子受体 CCR7。

[0072] 免疫模拟系统的构建

[0073] 在一个实施方式中,免疫模块可以是培养生物屏障细胞和任选的树突细胞的第一培养隔室、培养免疫或淋巴细胞(例如仅 T 细胞作为淋巴细胞)的第二隔室,和连接第一和第二隔室以允许隔室之间的流体连通和细胞迁移的一个或多个微流体通道的相对简单的构建体。构建免疫模块和仅包括单一淋巴细胞类型有利于得到有效的分析装置,其非常快速地提供在体外筛选多种测试剂的体内应用潜力的能力。在免疫模块中使用单一淋巴细胞类型而避免了许多系统的复杂化,这提供了有效运行和测试剂的快速筛选。在替代的实施方式中,免疫模块仅包括几种淋巴细胞类型。

[0074] 作为一个非限定的例子,用于制造本文描述的免疫模拟装置和系统的起始材料或基底可以是通常由硅(Si)或氧化硅(SiO_2)制成的晶片。使用的最常见的晶片直径为 4"、6" 和 8"。制造屏障组件、免疫组件和组件间微流体的过程包括两个基本过程,即淀积和蚀刻。下面给出各个过程的简单描述。

[0075] 在某些实施方式中,制造本文描述的系统的方法可以包括但不限于激光刻写、UV 刻写和光子带隙波导方法。一些实施方式中的制造方法包括一个或多个淀积、掩蔽和蚀刻步骤。

[0076] 淀积

[0077] 在淀积步骤中,将具有良好控制的厚度的确定材料层淀积在整个晶片上。用于微流体层淀积的最常见的材料是氧化硅(SiO_2),也被称为玻璃。还使用其他材料例如硅、玻璃、环氧树脂、铌酸锂、磷化铟和 SiON (氮氧化硅)及其衍生物。

[0078] 使用几种技术例如 PECVD(等离子体强化化学气相沉积)、LPCVD(低压 CVD)、APCVD(大气压 CVD)、FHD(火焰水解沉积)和本领域公知的其他技术完成淀积步骤。

[0079] 掩蔽

[0080] 在淀积之后和蚀刻步骤之前,通过掩盖不需要蚀刻掉的区域将免疫模拟装置的希望二维结构转印到淀积的晶片上。分几步中完成掩蔽,包括使用光敏感材料覆盖晶片、通过光刻掩膜将其暴露在光中,和除去暴露的材料而保留掩膜在原地。

[0081] 蚀刻

[0082] 在蚀刻步骤中,从基底的顶部核心 1023 层除去未掩蔽的区域中的材料。蚀刻速率是已知的参数,因此可以通过时间来控制蚀刻的深度。用于蚀刻的两种最常用的技术是湿蚀刻和反应离子蚀刻 (RIE)。

[0083] 在蚀刻步骤之后,采用与上面描述的方法类似的淀积步骤来产生上覆盖或顶覆盖 1029 层。根据需要可以重复上面的步骤以一层在另一层上面地产生几个层。

[0084] 当完成了晶片加工后,可将其切成单个的芯片。

[0085] 系统控制

[0086] 一方面,使用者可以操作或控制本文描述的装置或系统。如图 8 所示,使用者可通过使用计算机与该装置或系统通讯。计算机的用户界面可以包括键盘、鼠标和监视器。计算机可以通过硬线 (hard-line) 连接 (例如以太网、带电线 (Fire Wire)、USB 或其他连接) 与装置通讯,或者可以与装置无线通讯 (例如通过无线网络或蓝牙)。计算机可以包括用于存储来自装置或系统的信息的硬盘,且可以包括向存储装置 (例如闪存驱动器、CD-ROM 或 DVD) 写入数据的方法。

[0087] 数据分析

[0088] 在某些实施方式中,在暴露于试剂、化合物、制剂或组合物的生物屏障测试样品 (例如皮肤样品) 中检测状况 (例如过敏、自体免疫和 / 或炎性状况)。在进一步的实施方式中,可以使用分析该试剂、化合物、制剂或组合物对测试样品的作用的测量结果来诊断患者的状况或疾病状态。在再另一实施方式中,本发明的检测方法还可以包括诊断状况或疾病状态的方法。在相关的实施方式中,诊断疾病的方法可以包括总结或分析涉及状况或疾病状态检测的数据,并向患者、保健提供者或保健管理者提供结论,该结论是基于与状况或疾病诊断相关的数据的总结或分析。使用本文描述的计算机或其他数字化装置和网络可能有利于总结或分析这类数据。可以想到,有关这类数据的信息可以通过网络传输。

[0089] 图 8 是显示代表性示例逻辑装置的框图,通过该装置可以实现有关本发明的数据的总结或分析。这样的数据可与受试者中的疾病、障碍或状况相关。图 8 显示了与用于免疫模拟系统 824 的设备 820 相连使用以例如产生结果计算机系统 (或数字化装置) 800。计算机系统 800 可以理解为可从介质 811 和 / 或网络端口 805 (其可任选地与具有固定的介质 812 的服务器 809 相连) 读取指示的逻辑装置。图 8 中显示的系统包括 CPU 801、磁盘驱动器 803、任选的输入装置 (例如键盘 805 和 / 或鼠标 816) 和任选的监视器 807。可以通过与处于本地或远程位置的服务器 809 相连的将所示通讯介质实现数据通讯。通讯介质可以包括传送和 / 或接受数据的任何方式。例如,通讯介质可以是网络连接、无线连接或互联网连接。可以想到,本发明相关的数据可以通过这样的网络或连接传输。

[0090] 在一个实施方式中,计算机可读的介质包括适于传输生物测试样品的分析结果的介质。该介质可以包括与受试者的状况或疾病或状态相关的结果,其中这种结果是通过本文描述的方法获得的。

[0091] 试剂盒

[0092] 还提供了包含用于实施本文所描述方法的试剂的试剂盒。

[0093] 在某些实施方式中,试剂盒包含试剂,包括免疫模拟系统、培养基和本文描述的其他组件。

[0094] 试剂盒任选地可以包含以下的一种或多种:一个或多个模拟系统、一个或多个可在该系统中培养的细胞培养物,和各种不同的趋化因子、细胞因子、生长因子等。

[0095] 试剂盒的组件可保持在壳体(housing)中。可向壳体提供使用试剂盒执行所述方法的说明,并可在任何固定的介质中提供。说明可以位于壳体内或壳体外,可以打印在使说明可被阅读的任何形成壳体的表面的内部或外部。试剂盒可以是用于测试多个测试样品和/或多种试剂的多元形式。

[0096] 如本文所描述的和如图9所示的,在某些实施方式中,试剂盒903可以包括用于容纳各种组件的容器或壳体902。如图9所示和如本文所描述的,在一个实施方式中,提供了包括一个或多个免疫模拟系统900和任选的试剂905的试剂盒903。如图9所示和如本文所描述的,试剂盒903可任选地包括说明901。还可以设想试剂盒903的其他实施方式,其中组件包括本文描述的各种附加特征。

[0097] 尽管本文显示和描述了本发明的优选实施方式,但是所属领域普通技术人员明白,这些实施方式仅是用于举例。在不偏离本发明的情况下,许多的变型、改变和替代方式是本领域技术人员很容易想到的。可以理解的是,可以使用本文描述的本发明实施方式的各种替代方式实现本发明。意欲用下述权利要求限定本发明的范围,且在这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物也被覆盖在本发明的范围内。

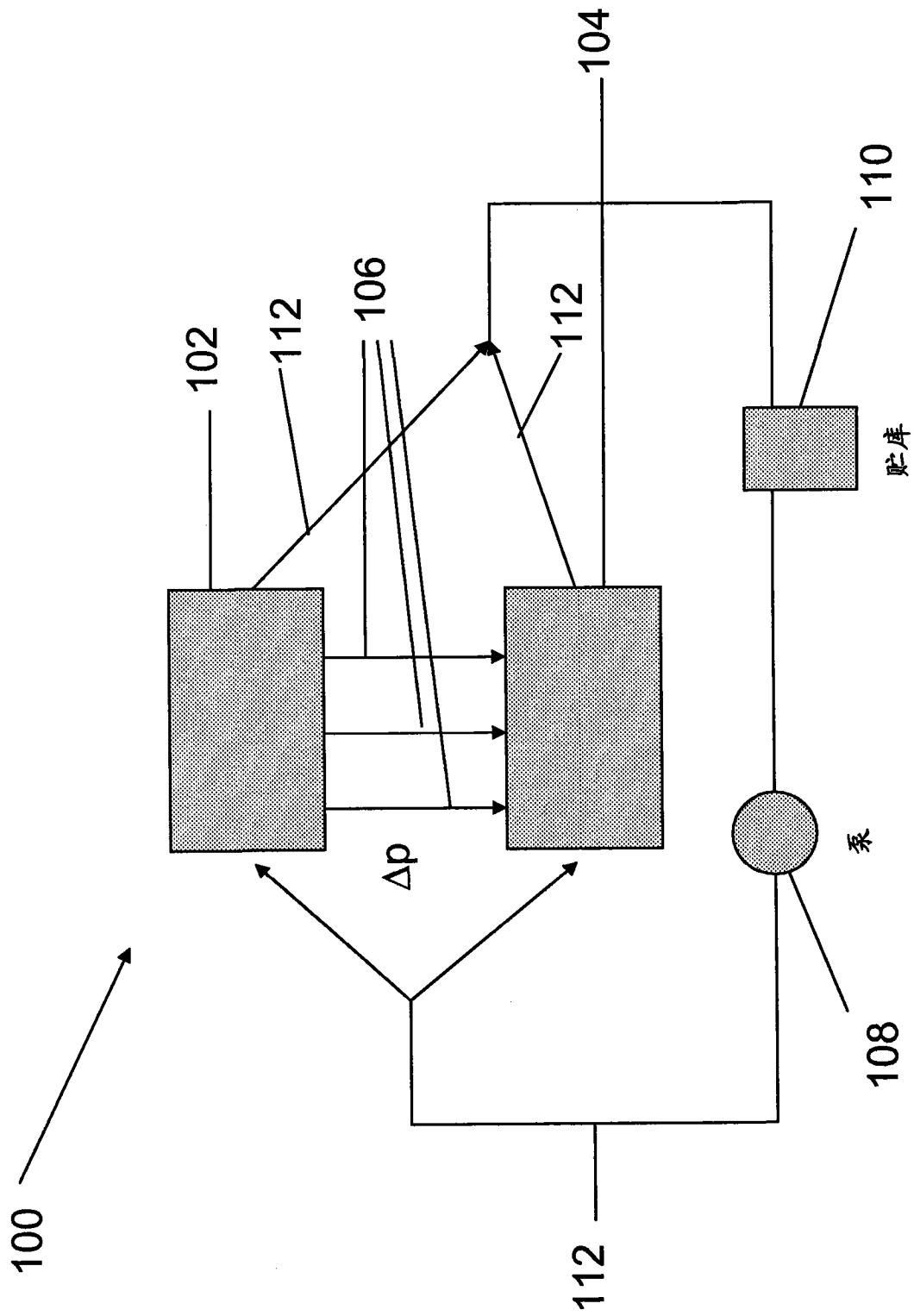


图 1

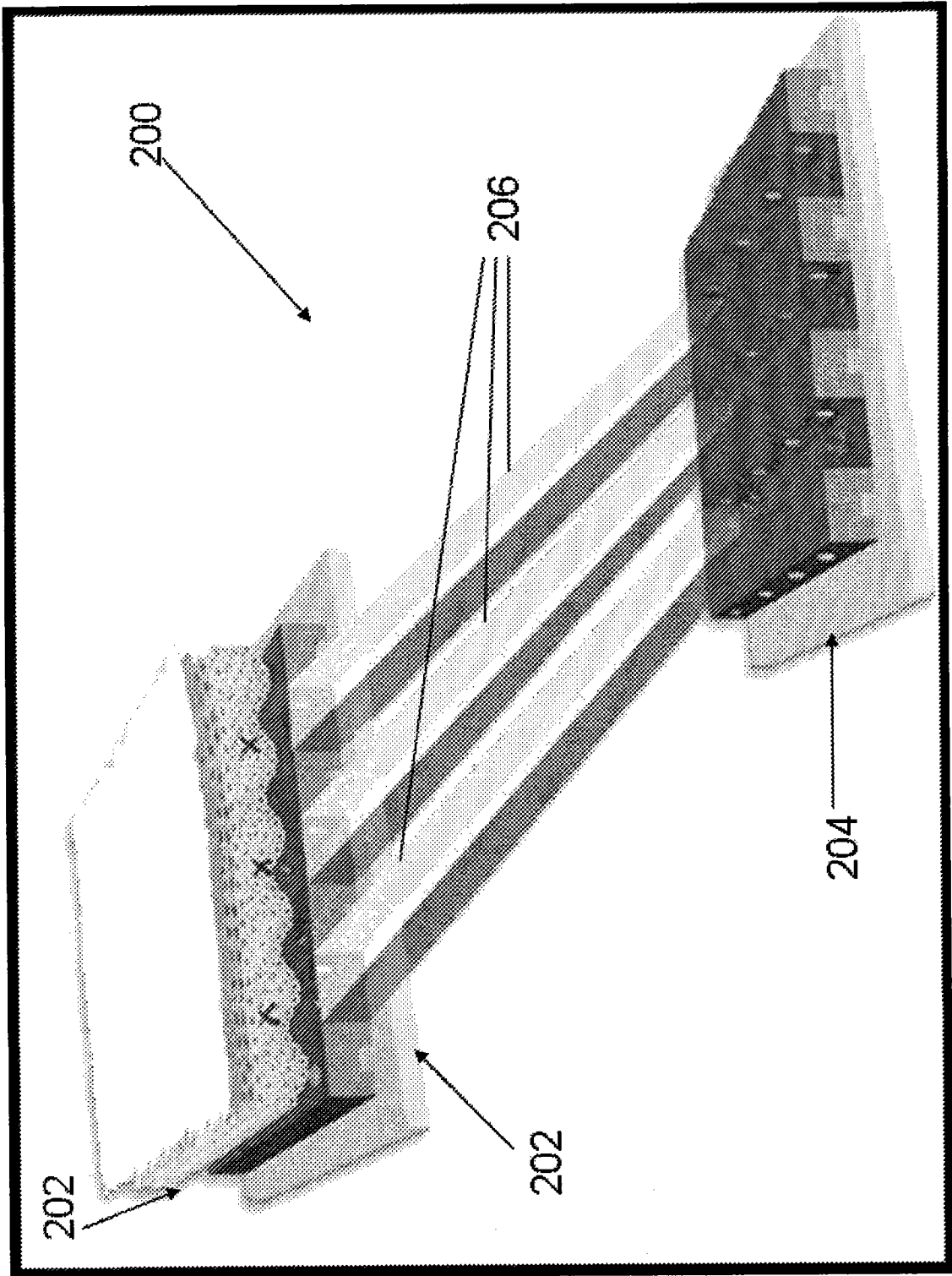


图 2

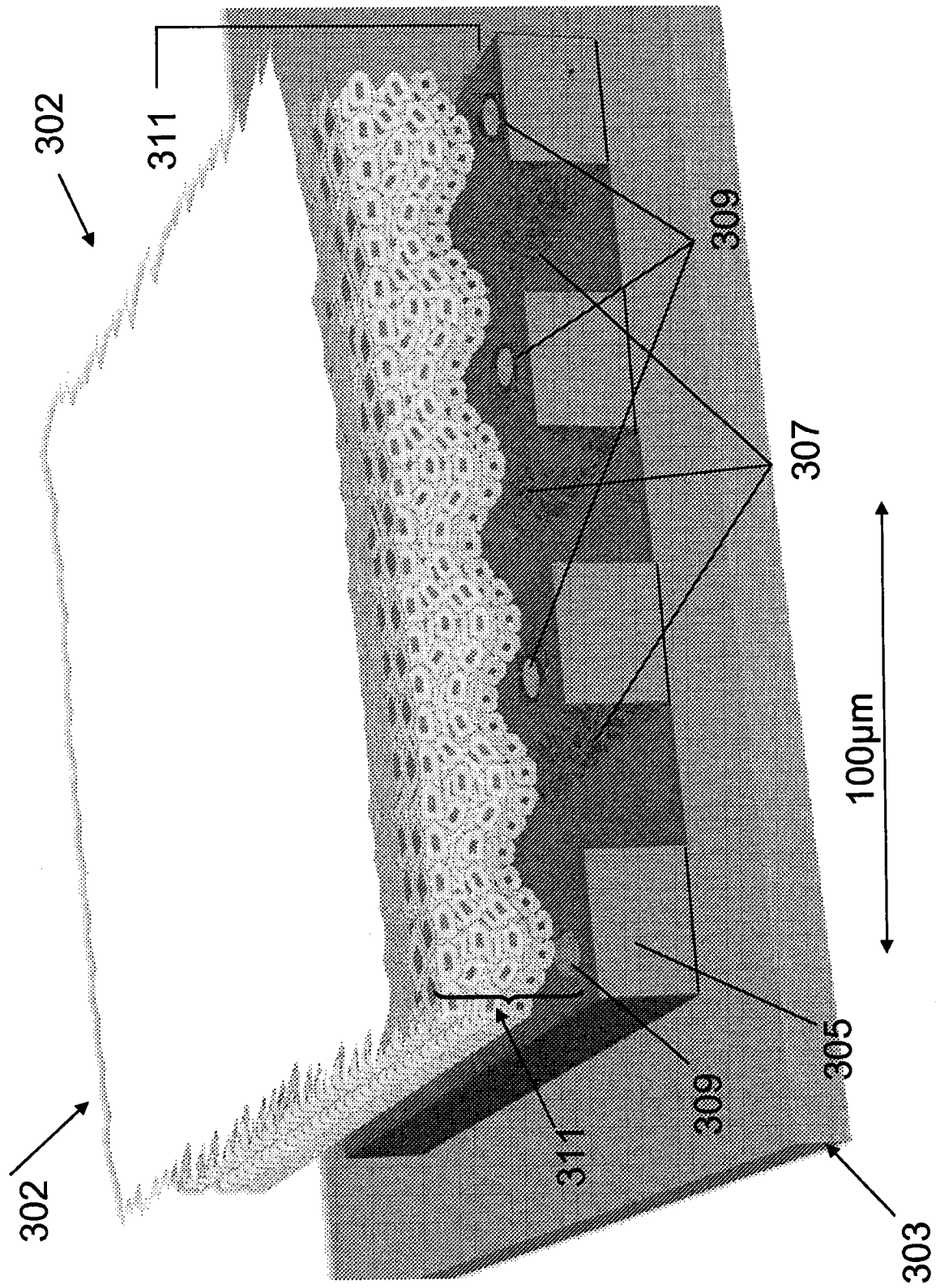


图 3

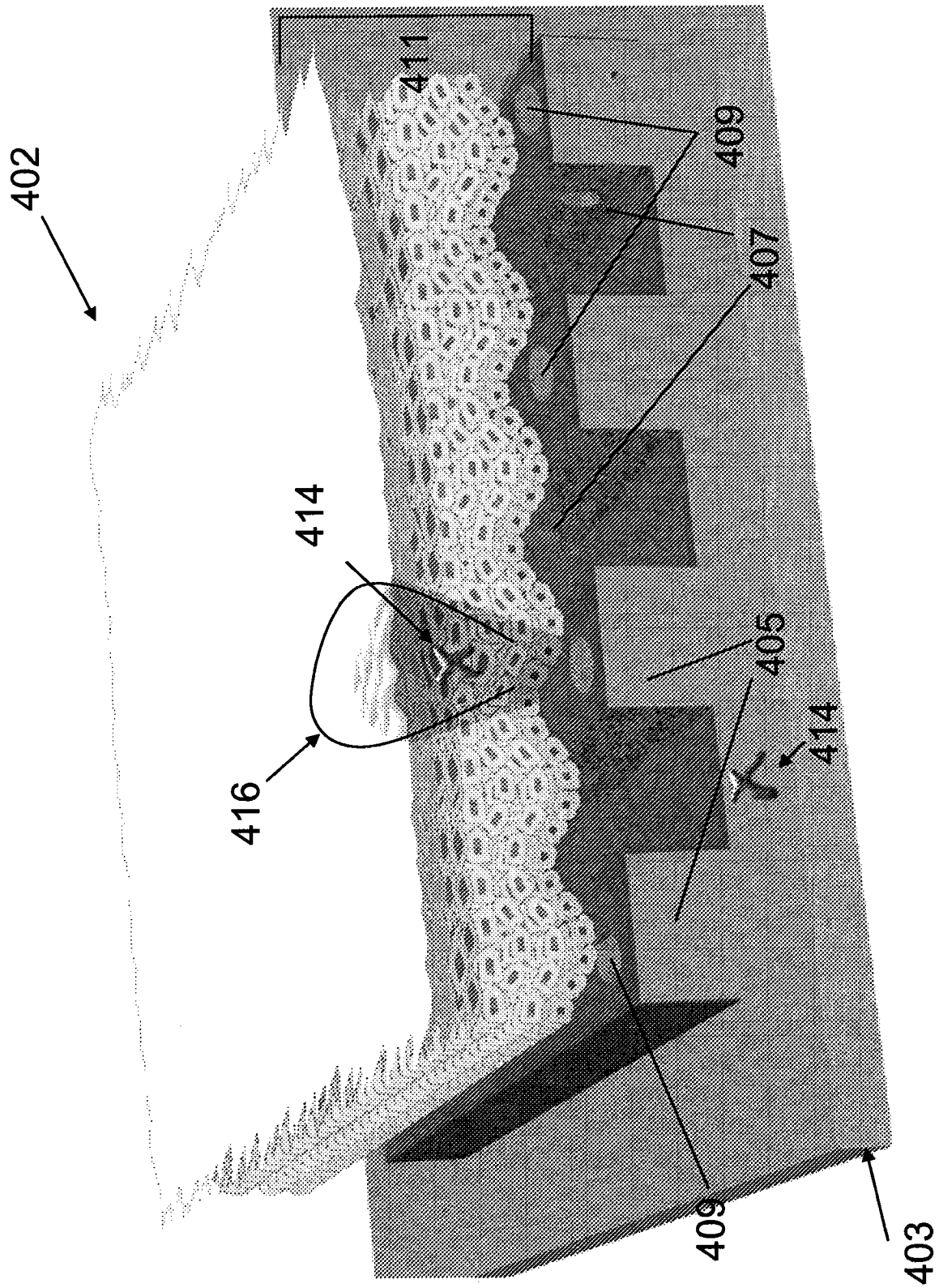


图 4

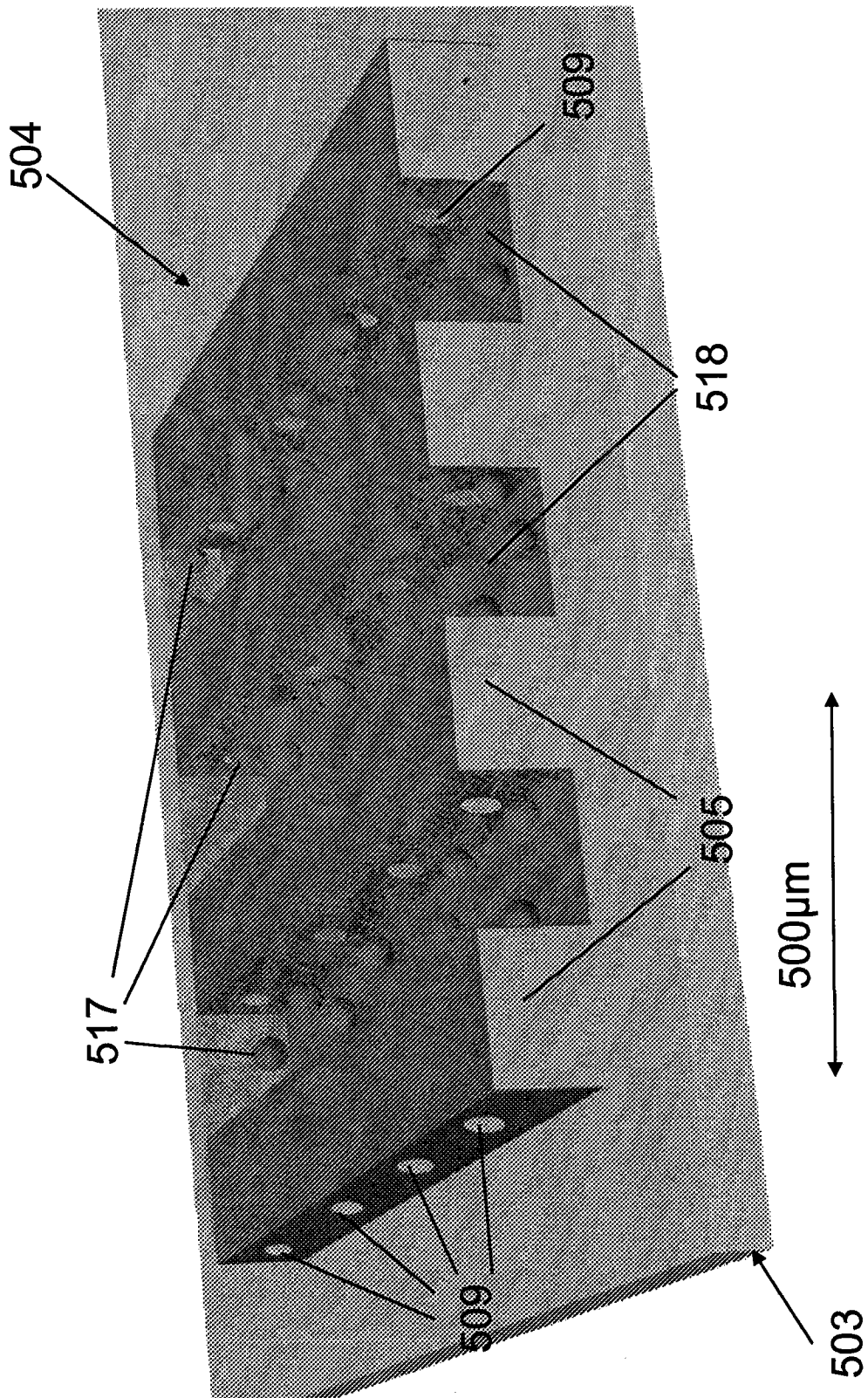


图 5

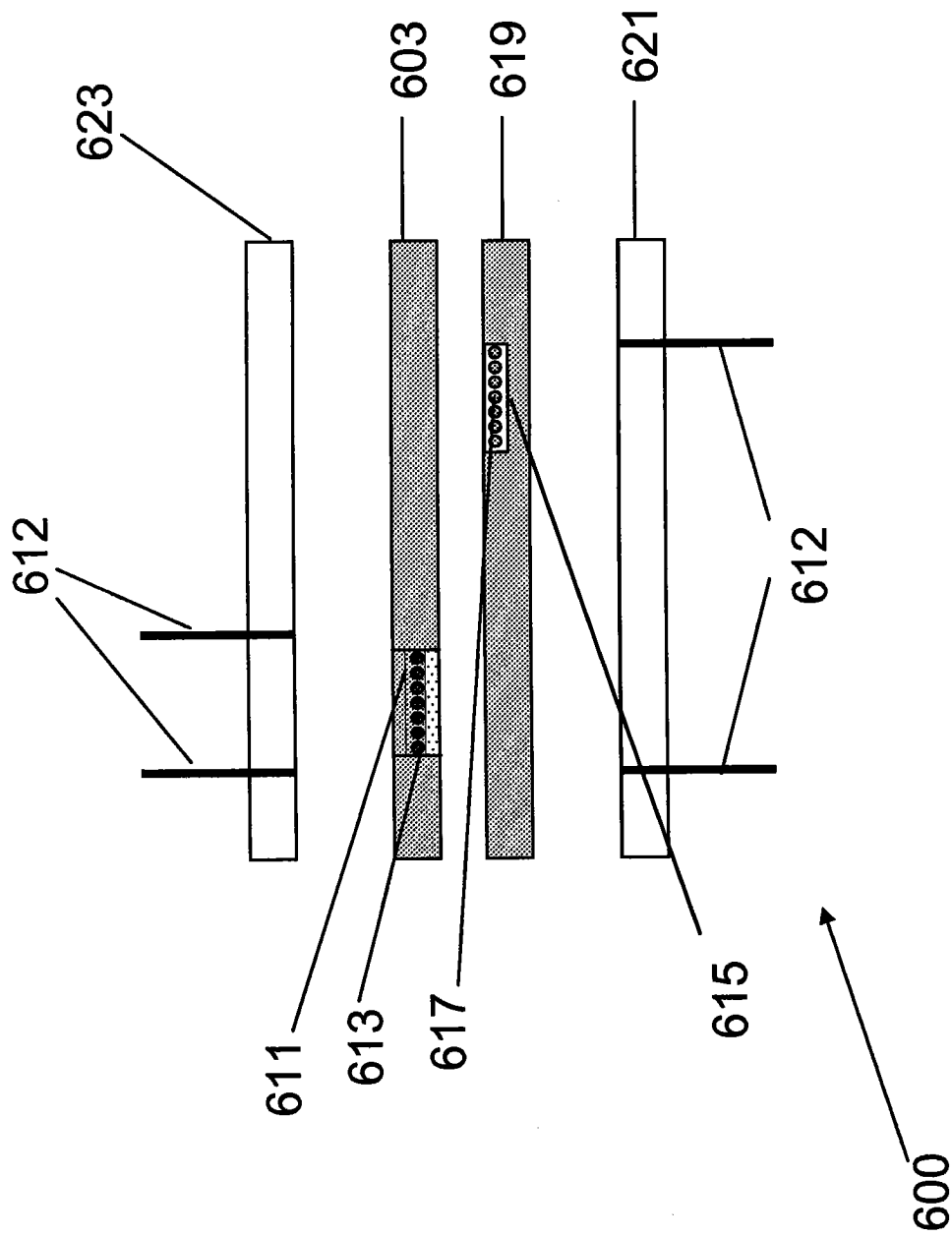


图 6

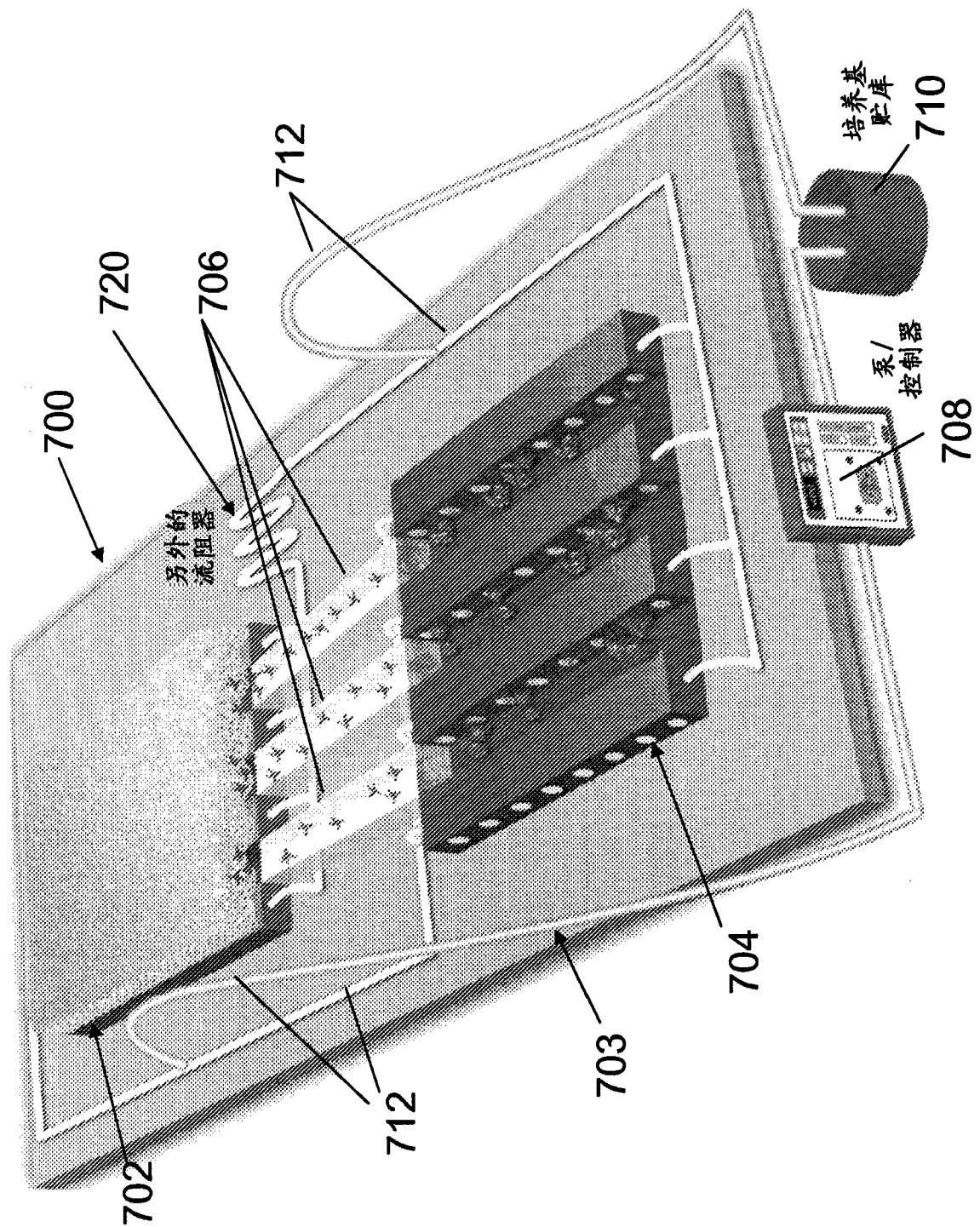


图 7

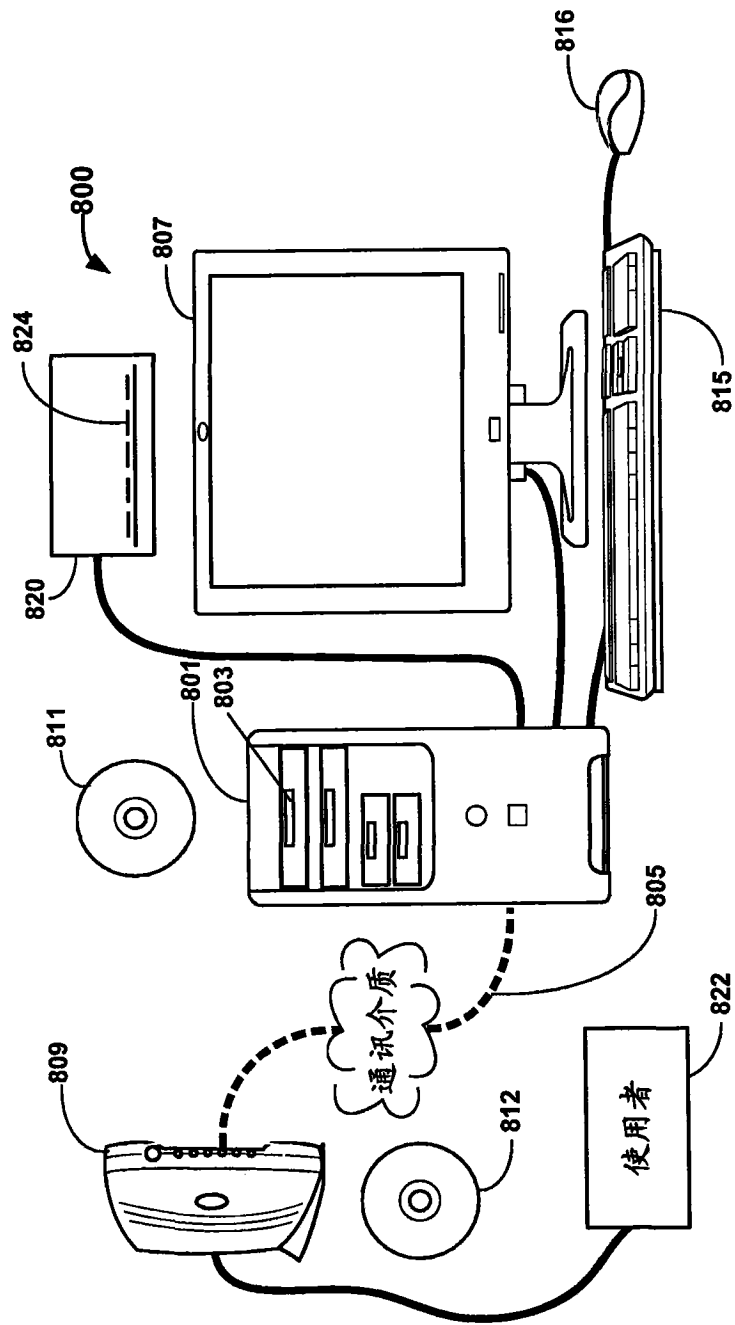


图 8

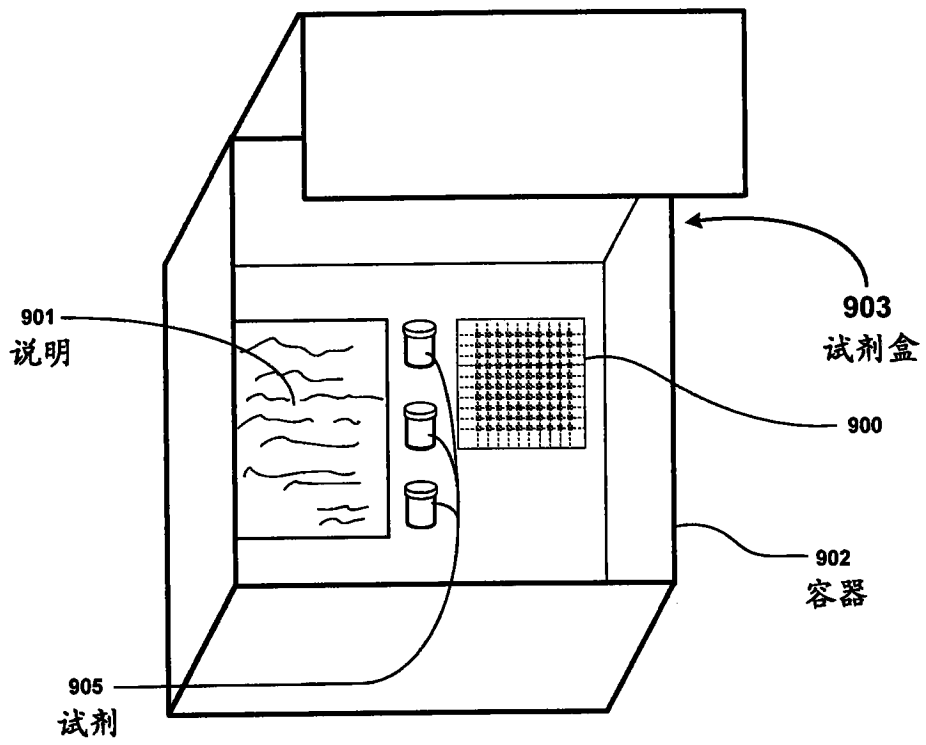


图 9