

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 961 582**

51 Int. Cl.:

G01N 15/10 (2006.01)

G01N 3/08 (2006.01)

G01N 3/32 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2017 PCT/EP2017/082374**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018 WO18108880**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2017 E 17811323 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2023 EP 3551994**

54 Título: **Sistema de medición y proceso de medición de múltiples características biofísicas de las células**

30 Prioridad:
12.12.2016 EP 16306668

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.03.2024

73 Titular/es:
**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) (33.3%)
3, rue Michel Ange
75016 Paris, FR;
NEUROINDX, INC. (33.3%) y
THE FOUNDATION FOR THE PROMOTION OF INDUSTRIAL SCIENCE (33.3%)**

72 Inventor/es:
**COLLARD, DOMINIQUE;
FUJITA, HIROYUKI y
KARSTEN, STANISLAV**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 961 582 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sistema de medición y proceso de medición de múltiples características biofísicas de las células

Campo de la invención

5 La presente invención está relacionada con un sistema de medición utilizado para caracterización biofísica de células y con un proceso para medir características biofísicas de células.

Antecedentes de la invención

En el campo de las ciencias biomédicas, ha habido una gran demanda de soluciones para determinar las características biofísicas de células individuales. Las características biofísicas de las células proporcionan información útil para identificar una relación entre la célula y una determinada enfermedad, como el cáncer.

10 Por otro lado, una mezcla de células que tienen diferentes características biofísicas solo produce los resultados promediados, haciendo que sea difícil identificar cambios específicos de enfermedades que se encuentran solo en regiones subanatómicas o tipos de células específicas.

15 La publicación de patente japonesa No. 2016-099219 describe un sistema de detección para detectar una reacción de una molécula dentro de un canal microfluídico bajo la influencia de un determinado reactivo. Según este sistema, la reacción de una molécula se puede observar mediante manipulaciones directas de la molécula usando unas pinzas.

20 También se han conocido pinzas diseñadas para capturar una célula individual entre sus puntas planas. Véase Nicolas Lafitte, Hervé Guillou, Momoko Kumemura, Laurent Jalabert, Teruo Fujii, Hiroyuki Fujita y Dominique Collard, "Integrated MEMS platform with silicon nanotweezers and open microfluidic device for real-time and routine biomechanical probing on molecules and cells," 35ª Conferencia Internacional Anual del IEEE EMBS, Osaka, Japón, 3-7 de julio de 2013, páginas 148-151.

25 Estas pinzas se introducen en el canal microfluídico a través de una abertura conformada en una pared lateral del canal microfluídico para capturar y manipular directamente una célula o molécula entre las pinzas. Sin embargo, para hacer esto, las pinzas existentes requieren un posicionamiento preciso con relación al canal microfluídico. Este proceso de posicionamiento puede ser muy difícil y considerarse una carga cuando se desea aumentar el rendimiento del sistema (el número de objetos que puede caracterizar el sistema durante un cierto período de tiempo).

Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de medición que proporcione caracterizaciones eficientes de células individuales y haga posible aumentar fácilmente el rendimiento del sistema.

El documento US 2014/0128285 enseña un sensor capacitivo electrostático para caracterización biofísica de células individuales que está integrado en un chip microfluídico. Todo el sensor está sumergido en fluido.

30 Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un sistema de medición que proporcione caracterizaciones eficientes de células individuales y haga posible aumentar fácilmente el rendimiento del sistema.

Compendio de la invención

De acuerdo con una realización de la invención, se proporciona un sistema adaptado para medir múltiples características biofísicas de células de acuerdo con la reivindicación 1.

35 De acuerdo con una realización, el sensor puede ser un sensor programable adaptado para obtener selectivamente una o más características biofísicas de la célula individual.

De acuerdo con una realización, el chip microfluídico puede estar provisto además de al menos un canal microfluídico adicional dispuesto en paralelo con el canal microfluídico.

40 De acuerdo con una realización, el sensor puede estar adaptado para obtener características biofísicas de la célula individual estimulando mecánica y/o eléctricamente la célula individual en el canal microfluídico.

De acuerdo con una realización, el sensor puede estar adaptado para obtener características biofísicas de la célula individual estimulando química y/o biológicamente la célula individual en el canal microfluídico.

45 De acuerdo con una realización, el sensor puede estar adaptado para obtener características biofísicas que incluyen al menos una de entre tamaño, rigidez, tiempo de recuperación de forma, viscosidad e impedancia eléctrica y/o dependencia de la frecuencia de las características biofísicas.

De acuerdo con una realización, el sistema de medición puede comprender además unos medios de recogida en comunicación de fluido con la salida del canal microfluídico.

De acuerdo con una realización, el sistema de medición puede comprender además unos medios de clasificación para clasificar las células que fluyen en el canal microfluídico, dependiendo de las características biofísicas de las células obtenidas por el sensor.

5 De acuerdo con una realización, el chip microfluídico puede estar provisto además de al menos un canal de derivación que sale del canal microfluídico y aguas abajo con relación al sensor.

De acuerdo con una realización, los medios de clasificación pueden comprender una válvula adaptada para dirigir la célula al canal de derivación o aguas abajo del canal microfluídico, dependiendo de las características biofísicas de la célula.

10 De acuerdo con una realización, el sistema de medición puede comprender además un depósito en comunicación de fluido con el canal de derivación.

De acuerdo con una realización, los medios de clasificación pueden estar adaptados para clasificar las células comparando las características biofísicas de la célula con un umbral.

De acuerdo con una realización, el umbral puede ser programable.

15 De acuerdo con una realización no cubierta por la invención reivindicada, se proporciona un proceso de fabricación del sistema de medición. El proceso comprende: aplicar un patrón de máscara correspondiente a la forma del canal microfluídico y a la forma de la parte estacionaria y la parte móvil del sensor; y conformar la forma del sensor junto con el canal microfluídico.

Otro objeto de la invención está relacionado con un proceso de medición de múltiples características biofísicas de células de acuerdo con la reivindicación 13.

20 De acuerdo con una realización, el proceso comprende además estimular química y/o biológicamente la célula en el canal microfluídico.

De acuerdo con una realización, el proceso comprende además clasificar las células que fluyen en el canal microfluídico dependiendo de las características biofísicas de las células obtenidas por el sensor.

25 Las características biofísicas de la célula pueden incluir al menos una de entre tamaño, rigidez, tiempo de recuperación de forma, viscosidad e impedancia eléctrica, y/o dependencia de la frecuencia de las características biofísicas.

Breve descripción de las figuras

Se describirán con mayor detalle realizaciones de la invención con referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra una configuración ejemplar de un sistema de análisis celular que incluye un sistema de medición de acuerdo con una realización;

30 La Figura 2 es una vista esquemática que muestra un sistema de medición de acuerdo con una realización;

La Figura 3 es una vista ampliada que muestra un sensor del sistema de medición y parte de un canal microfluídico cercano;

La Figura 4 es una vista en sección transversal que muestra esquemáticamente el sistema de medición;

35 La Figura 5 es una vista esquemática que corresponde a la Figura 2, pero que muestra el sistema de medición en funcionamiento;

La Figura 6 es una vista ampliada correspondiente a la Figura 3, pero que muestra el sistema de medición en funcionamiento;

Las Figuras 7A a 7D muestran características biofísicas ejemplares que pueden obtenerse mediante el sistema de medición;

40 La Figura 8 muestra una relación ejemplar entre las características biofísicas de una célula y la probabilidad de que sea una célula madre cancerosa;

Las Figuras 9A a 9E muestran configuraciones ejemplares de un elemento sensor del sistema de medición;

La Figura 10 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de medición de acuerdo con otra realización;

45 La Figura 11 es un diagrama esquemático que muestra un sistema de medición de acuerdo con otra realización más;

La Figura 12 ilustra un proceso de fabricación de un elemento sensor de un sistema de medición de acuerdo con una realización no cubierta por la invención reivindicada;

La Figura 13 muestra un patrón de máscara que puede usarse para fabricar el elemento sensor de acuerdo con el proceso ilustrado en la Figura 12; y

5 La Figura 14 muestra el elemento sensor producido de acuerdo con el proceso ilustrado en la Figura 12 usando el patrón de máscara mostrado en la Figura 13.

Descripción detallada de realizaciones de la invención

10 La Figura 1 muestra un sistema de análisis celular 100 que incluye un sistema de medición 10 de acuerdo con una realización de la presente invención. El sistema de análisis celular 100 también incluye unos medios de adquisición de células 120 y un sistema analizador 140.

15 Los medios de adquisición de células 120 tienen funciones de adquirir células individualmente a partir de mezclas de células. Las mezclas de células pueden ser mezclas de células y tejidos heterogéneos complejos, que incluyen, pero no están limitados a, cualquier mezcla multicelular compleja, como por ejemplo cultivos celulares complejos, diseminaciones celulares, secciones de tejido (por ejemplo, tejidos cerebrales), biopsias líquidas, células disociadas de biopsias sólidas. Los medios de adquisición de células 120 también pueden usarse para adquirir células de poblaciones homogéneas con el fin de analizar células individuales. En este último caso, el sistema de análisis 100 puede usarse para comprender la variabilidad de las células individuales entre células genéticamente o morfológicamente similares o idénticas.

20 Los medios de adquisición de células 120 pueden estar configurados para aspirar y recoger una célula individual de mezclas de células generando vacío, como se describe en la patente de Estados Unidos Nº 8,797,644. Por ejemplo, las células de interés se colocan directamente debajo de la punta de una unidad capilar desechable (DCU) y se aplica un impulso de vacío preciso para recoger las células individuales deseadas e introducir las células en el cilindro de la DCU (véase Kudo LC, Vi N, Ma Z, Fields T, Avliyakov NK, Haykinson MJ, Bragin A, Karsten SL. Novel Cell and Tissue Acquisition System (CTAS): microdissection of live and frozen brain tissues. PLoS One. 2012;7(7):e41564. doi: 10.1371/journal.pone.0041564. Publicación electrónica del 24 de julio de 2012. PMID: 22855692). La muestra adquirida puede transferirse a un recipiente para su uso posterior en el sistema de medición 10, o introducirse directamente en el sistema de medición 10.

30 Los medios de adquisición de células 120 pueden emplear microdissección por captura láser (LCM), que utiliza un láser para separar y recoger células individuales. Los medios de adquisición de células 120 también pueden emplear la técnica de clasificación de células asistida por fluorescencia (FACS) que utiliza una etiqueta fluorescente específica para identificar células individuales. Los instrumentos de clasificación de células asistida por fluorescencia son capaces de separar una suspensión heterogénea de células en fracciones purificadas en base a las propiedades de fluorescencia y dispersión de la luz. Dicho en pocas palabras, las células a analizar se ponen en suspensión y se inyectan en el sistema de medición 10.

35 Alternativamente, las células se pueden capturar directamente de un portaobjetos de microscopio o de una placa de Petri, o recogerse simplemente por pipeteado. Se pueden usar otros tipos de dispositivos para aislar y recoger células individuales.

40 El sistema de medición 10 incluye un sensor 30 adaptado para obtener una o más características biofísicas de las células adquiridas por los medios de adquisición de células 120. El sistema de medición 10 también puede incluir unos medios de clasificación 40 y unos medios de recogida 60.

Los medios de clasificación 40 son capaces de clasificar las células individuales, dependiendo de sus características biofísicas. Las células clasificadas se recogen mediante los medios de recogida 60 para garantizar que las células clasificadas no se mezclen con otras células.

45 El sistema analizador 140 realiza análisis adicionales de las células recogidas según sea necesario. Por ejemplo, las células se someten a análisis molecular, que incluye, pero no está limitado a, síntesis de ADNc, análisis de micromatrices, aplicaciones proteómicas, secuenciación de nueva generación (NGS), etc.

De acuerdo con la realización, el sistema de medición 10 está configurado como un sistema integrado que incluye un canal microfluídico a través del cual se suministran las células y un sensor que obtiene características biofísicas de las células dentro del canal microfluídico.

50 Haciendo referencia a las Figuras 2 a 4, se describirá la configuración detallada de un sistema de medición 10 ejemplar. La Figura 2 es una vista esquemática que muestra el sistema de medición 10. La Figura 3 es una vista ampliada que muestra un sensor 30 del sistema de medición 10 y parte de un canal microfluídico 14 cercano. La Figura 4 es una vista en sección transversal que muestra esquemáticamente el sistema de medición 10.

El sistema de medición 10 incluye un chip microfluídico 12 provisto de un canal microfluídico 14. El canal microfluídico 14 tiene una entrada 14a en un extremo y una salida 14b en el otro extremo. El sistema de medición 10 también incluye una pluralidad de sensores 30. En la realización ilustrada, el sistema de medición 10 incluye cuatro sensores 30 dispuestos a lo largo del canal microfluídico 14.

5 Como se muestra en la Figura 4, el chip microfluídico 12 incluye una placa base 13 hecha de vidrio o silicio y una capa de protección 15 dispuesta en una superficie superior 13a de la placa base 13. La capa de protección 15 puede estar hecha de polidimetilsiloxano (PDMS). La capa de protección 15 tiene, en una superficie orientada hacia la placa base 13, una ranura 15a que se conforma de una manera conocida, por ejemplo, mediante fotolitografía y estructuración. La estructuración se puede realizar mediante moldeo. El canal microfluídico 14 está definido entre la ranura 15a y las paredes laterales 15b de la capa de protección 15 y la superficie superior 13a de la placa base 13.

Volviendo a la Figura 2, el canal microfluídico 14 incluye un canal principal 16 alargado y canales de derivación 18. El canal principal 16 se extiende entre la entrada 14a y la salida 14b. Los canales de derivación 18 salen del canal principal 16 y están dispuestos aguas abajo de los respectivos sensores 30. En la realización ilustrada, cuatro pares de canales de derivación 18 están conformados en una relación espaciada entre sí, y cada par de canales de derivación 18 se extiende de forma sustancialmente lateral desde ambos lados del canal principal 16 en direcciones opuestas.

El chip microfluídico 12 también está conformado con depósitos 11 que se proporcionan en los extremos terminales de los canales de derivación 18 y en comunicación de fluido con los canales de derivación 18 correspondientes.

El chip microfluídico 12 también incluye válvulas 42 como medios de clasificación 40 para clasificar las células en función de sus características biofísicas. Las válvulas 42 se proporcionan inmediatamente aguas abajo de los respectivos sensores 30. Las válvulas 42 están configuradas para guiar selectivamente las células ya sea por uno de los canales de derivación 18 o aguas abajo del canal principal 16. En consecuencia, las células que tienen ciertas características biofísicas serán separadas de las otras por las válvulas 42.

El sistema de medición 10 también incluye una unidad de aspiración 62. La unidad de aspiración 62 está dispuesta en la salida 14b del canal microfluídico 14. La unidad de aspiración 62 se opera generando vacío a través de una bomba de vacío (no mostrada) para recoger las células que han alcanzado la salida 14b. También se pueden proporcionar unidades de aspiración similares en los depósitos 11.

Cada uno de los sensores 30 tiene un par de elementos sensores 31 y 32 que se proporcionan en los lados opuestos del canal principal 16 y están situados uno frente al otro a ambos lados del canal principal 16. Los elementos sensores 31 y 32 tienen brazos 34 que se extienden lateralmente (de forma sustancialmente perpendicular al canal principal 16) y hacia el canal principal 16. Haciendo referencia a la Figura 4, los elementos sensores 31 y 32 también tienen una parte de base 36 que está unida fijamente a la placa base 13 del chip microfluídico 12.

Los brazos 34 se proyectan hacia el interior del canal principal 16 a través de aberturas 14c conformadas en las paredes laterales 15b de la capa de protección 15 que definen el canal principal 16. Las aberturas 14c son lo suficientemente pequeñas para evitar que se escape un fluido de dentro del canal principal 16, pero al mismo tiempo, lo suficientemente grandes para permitir que el extremo de punta de los brazos 34 del sensor 30 se introduzca en el canal principal 16 a través de la abertura 14c. Los elementos sensores 31 y 32 tienen un tamaño del orden de micrómetros o nanómetros. De esta manera, los elementos sensores (y más particularmente los extremos de punta de los brazos 34) proporcionan una interfaz entre fluido y aire en el sistema. De esta manera, además de las partes de los elementos sensores que están en contacto con la célula dentro del canal microfluídico, el sensor está dentro del aire, lo que evita cualquier amortiguación de sus componentes y proporciona así una mayor precisión de la medición.

Al menos uno de los elementos sensores 31 y 32 incluye una parte móvil que se puede mover junto con el brazo 34 con relación a la parte restante (por ejemplo, la parte de base 36). La parte móvil del elemento sensor 31 o 32 puede ser accionada electrostáticamente mediante un actuador basado en sistemas microelectromecánicos (MEMS) conocidos. La parte móvil de los elementos sensores 31 o 32 también puede ser accionada térmicamente o piezoeléctricamente.

Gracias a la interfaz fluido-aire proporcionada por los elementos sensores, el actuador permanece dentro del aire, lo que evita cualquier amortiguación del accionamiento electrostático.

En consecuencia, los brazos 34 de los elementos sensores 31 y 32 están configurados para acercarse o alejarse unos con respecto a otros mediante los actuadores basados en MEMS. Los extremos de punta de los brazos 34 pueden estar configurados para facilitar la captura de una célula individual y/o la detección de la propiedad biofísica de la célula capturada entre los brazos 34. Uno de los elementos sensores 31 y 32 puede estar configurado como un sensor pasivo, que está fijado al chip microfluídico 12. Gracias a los actuadores basados en MEMS, el sensor 30 es capaz de estimular mecánica y/o eléctricamente células individuales. La estimulación de las células se puede realizar de diversas formas. Las células pueden ser sometidas a la medición de propiedades eléctricas bajo tensión mecánica o de propiedades mecánicas bajo estimulación eléctrica. Para estimular eléctricamente las células, los brazos 34 pueden ser capaces de actuar como electrodos.

El sensor 30 puede estar configurado para medir más de una característica biofísica de las células. El sensor 30 puede ser programable para obtener selectivamente una o más características biofísicas de las células.

5 El actuador basado en MEMS puede incluir un actuador de accionamiento tipo peine, un actuador de placa paralela o un actuador bimorfo. Los actuadores basados en MEMS pueden operarse de acuerdo con un programa para cambiar un espacio entre las puntas de los brazos 34 de manera controlada.

El desplazamiento de los brazos 34 puede detectarse como diferencia de capacitancia. Se puede usar un sensor capacitivo conocido para detectar un espacio entre los brazos 34. También se puede usar un sensor piezorresistivo conocido para el mismo propósito. El espacio entre los brazos 34 puede detectarse en tiempo real.

10 Los sensores 30 también pueden incluir un elemento sensor basado en MEMS capaz de detectar cambios en las propiedades mecánicas o eléctricas de células individuales en respuesta al accionamiento de los actuadores basados en MEMS. El elemento sensor y el actuador basados en MEMS pueden incorporarse en un único brazo 34.

15 Los elementos sensores 31 y 32 se fabrican a partir de sustrato de silicio utilizando técnicas conocidas tales como grabado con iones reactivos, oxidación local y grabado anisótropo de una manera similar a la descrita en C. Yamahata, D. Collard, B. Legrand, T. Takekawa, M. Kumemura, G. Hashiguchi y H. Fujita, "Silicon Nanotweezers With Subnanometer Resolution for the Micromanipulation of Biomolecules," J. Microelectromech. Syst., vol. 17, núm. 3, págs. 623-631, 2008. El proceso de fabricación para conformar el sensor 30 de acuerdo con una realización se describirá más adelante con más detalles.

20 Las características biofísicas de las células obtenidas por el sensor 30 incluyen, pero no están limitadas a, rigidez, tamaño, tiempo de recuperación de forma, viscosidad e impedancia eléctrica de las células, o cualquier combinación de las mismas. Las características biofísicas se pueden obtener como variables que tienen cierta dependencia de las frecuencias de resonancia, las conductividades o las propiedades de amortiguamiento, etc.

Los sensores 30 también pueden proporcionar fenotipado físico de las células. Las células se pueden categorizar según una o más propiedades mecánicas, eléctricas y/o electromecánicas.

Haciendo referencia ahora a las Figuras 5 y 6, se describirá el funcionamiento del sistema de medición 10.

25 Las células 70 adquiridas por los medios de adquisición 120 se introducen en la entrada 14a del canal microfluídico 14 mediante una herramienta conocida, como por ejemplo una pipeta 110. Las células 70 se pueden suministrar al canal microfluídico 14 consecutivamente a intervalos de tiempo predeterminados.

30 Cuando una célula 70 que fluye en el canal principal 16 alcanza uno de los sensores 30, el sensor 30 se acciona para mover el brazo 34 del elemento sensor 31 hacia el otro elemento sensor 32, por ejemplo, como se ilustra en la Figura 6, para capturar la célula 70 entre las puntas de los brazos 34. A continuación el sensor 30 manipula eléctrica y/o mecánicamente la célula 70 capturada para caracterización de la célula con respecto a su propiedad o propiedades mecánicas o eléctricas o electromecánicas. De acuerdo con una realización, medir las características biofísicas de la célula 70 mediante el sensor 30 puede llevar aproximadamente un minuto.

35 Cuando se completa la caracterización, el sensor 30 libera la célula 70, permitiéndole pasar a la etapa de clasificación. La válvula 42 guía la célula 70 aguas abajo del canal principal 16 o hacia el canal de derivación 18, dependiendo de las características biofísicas de la célula.

40 Por ejemplo, si la rigidez de la célula 70 está dentro de un cierto rango entre un umbral inferior y un umbral superior, la válvula 42 dirige la célula 70 aguas abajo del canal principal 16 para una caracterización adicional. Cuando la rigidez de la célula 70 es menor que el umbral inferior, la célula 70 es dirigida a uno de los canales de derivación 18 en el lado izquierdo (el lado del elemento sensor 31). Por otro lado, cuando la rigidez de la célula 70 es mayor que el umbral superior, la célula 70 es dirigida al otro canal de derivación 18 en el lado opuesto (el lado del elemento sensor 32). Los umbrales usados para clasificar las células 70 pueden ser ventajosamente programables.

45 La célula 70 que fluye aguas abajo del canal principal 16 es sometida a caracterización mediante otro sensor 30. El sistema de medición 10 de acuerdo con la realización ilustrada tiene cuatro sensores 30, pero puede tener cualquier número determinado de sensores 30 según sea necesario. El sistema de medición 10 puede incluir solo un sensor 30 y una válvula 42.

Cada sensor 30 puede obtener una o más características biofísicas de una célula, dependiendo de la aplicación preferida. En consecuencia, el sistema de medición 10 con más de un sensor 30 puede obtener diferentes tipos de características físicas de las células 70.

50 Si una célula 70 fluye a través del canal principal 16 para alcanzar la salida 14b, la unidad de aspiración 62 aspira la célula 70 fuera del canal microfluídico 14 para su posterior análisis mediante el sistema analizador 140 como se describió anteriormente con referencia a la Figura 1. En otra realización, las células 70 se pueden recoger directamente en un tubo de ensayo que está conectado a la salida 14b del canal microfluídico 14.

- De acuerdo con la realización descrita anteriormente, el brazo 34 del elemento sensor 31 se acciona con relación a la parte de base 36 que está unida fijamente al chip microfluídico 12 y con relación al otro brazo 34 del elemento sensor 32 en el lado opuesto. La integración de los elementos sensores 31 y 32 con el chip microfluídico 12 elimina la necesidad de posicionar con precisión el sensor 30 con relación al canal microfluídico 14 cada vez que el sensor 30 se introduce en el canal microfluídico 14. Por lo tanto, el proceso de obtención de las características biofísicas de las células individuales 70 puede ser más eficiente, en comparación con la técnica existente.
- Además, dado que el sensor 30 es capaz de capturar una célula 70 que fluye dentro del canal microfluídico 14, las células 70 se pueden suministrar al canal microfluídico 14 una tras otra para su caracterización consecutiva. Esto contribuye a aumentar el rendimiento del sistema de medición 10.
- Además, cuando el sistema de medición 10 incluye una pluralidad de sensores 30 a lo largo del canal microfluídico 14, se pueden obtener diversas características biofísicas de las células 70 durante un proceso de medición continuo.
- Además, las células 70 se clasifican dependiendo de sus características biofísicas, mientras fluyen a través del canal microfluídico 14. Como resultado, sólo las células 70 que tengan ciertas características biofísicas alcanzarán la salida 14b. Por lo tanto, no hay necesidad de medios adicionales para separar las células sometidas a un análisis adicional de otras.
- Las Figuras 7A a 7D muestran ejemplos de los parámetros biofísicos de células obtenidos por el sensor 30. La Figura 7A muestra fuerza con respecto a una cantidad de cierre del espacio (un desplazamiento relativo entre los brazos 34 en una dirección de cierre). Una línea continua en la Figura 7A representa una célula que tiene menor rigidez y mayor tamaño de célula que otra mostrada mediante una línea discontinua. La figura 7B muestra fuerza con respecto al tiempo. Una línea continua en la Figura 7B representa una célula que tiene una viscosidad más baja que otra mostrada por una línea discontinua.
- La Figura 7C muestra la amplitud de vibración con respecto a la frecuencia de resonancia de la medición mecánica. La frecuencia de resonancia es mayor cuando la célula tiene mayor rigidez. Por otro lado, el pico de la amplitud de vibración a la frecuencia de resonancia depende de la viscosidad. Cuanto mayor es la viscosidad de la célula, más pequeño se vuelve el pico a la frecuencia de resonancia.
- La Figura 7D muestra la impedancia eléctrica con respecto a la frecuencia de resonancia de la medición eléctrica. La línea continua representa una célula que tiene menor resistividad del citoplasma, que tiene menor impedancia. La línea discontinua corresponde a una célula que tiene una capacitancia de membrana más baja o, dicho de otra manera, mayor impedancia.
- Existe una conexión bien establecida entre las propiedades biofísicas de las células y una determinada enfermedad. Por ejemplo, algunos estudios recientes han demostrado claramente que las células cancerosas experimentan modificación de tamaño y alteraciones complejas de sus propiedades mecánicas.
- Las características biofísicas de la célula proporcionan una buena indicación de la conexión con una enfermedad potencial. La Figura 8 muestra la diferencia en los parámetros biofísicos entre una célula que tiene mayor probabilidad de ser una célula madre cancerosa y una célula que tiene menor probabilidad. Con una relación conocida de este tipo entre las características biofísicas de las células y una enfermedad potencial, una persona experta en la técnica determinaría fácilmente valores umbral apropiados para clasificar las células en términos de si se requieren o no análisis adicionales de las células.
- Las Figuras 9A a 9E muestran diferentes configuraciones del elemento sensor. Las figuras 9A a 9E solo muestran un elemento sensor 31, pero el otro elemento sensor 32 también puede estar configurado de diferentes maneras. De acuerdo con una realización, los elementos sensores 31 y 32 pueden estar configurados como un dispositivo modular que puede combinarse con otros. Por tanto, el sensor 30 puede tener un diseño modular.
- Por ejemplo, la Figura 9A muestra un elemento sensor 31 que incluye un elemento pasivo flexible 31a diseñado para entrar en contacto con una célula para establecer contacto eléctrico entre ambos.
- La Figura 9B muestra un elemento sensor 31 que incluye una combinación del elemento pasivo 31a ilustrado en la Figura 9A y un elemento de accionamiento 31b. El elemento de accionamiento 31b se puede utilizar para accionar el elemento pasivo 31a para estimulación mecánica o eléctrica de una célula.
- La Figura 9C muestra un elemento sensor 31 que incluye un elemento de detección de armónicos 31c diseñado para proporcionar estimulación mecánica de una célula según la frecuencia de resonancia. El elemento de detección de armónicos 31c se puede utilizar para obtener las características biofísicas de las células que muestran dependencia de la frecuencia de resonancia.
- La Figura 9D muestra un elemento sensor 31 que incluye un elemento de detección de desplazamiento 31d. Este tipo de elemento sensor 31 no tiene unos medios de accionamiento y sólo puede accionarse de forma pasiva.

La Figura 9E muestra un elemento sensor 31 que incluye un elemento de detección de desplazamiento 31d y un elemento de accionamiento 31e.

5 Debería entenderse que la presente invención no está limitada a ninguna combinación particular de los elementos sensores. Aunque no se muestran en los dibujos, los elementos sensores también pueden estar diseñados para ser accionados térmicamente o accionados piezoeléctricamente. El elemento de detección también puede tener la forma de un sensor piezorresistivo.

Aunque los elementos sensores 31 y 32 pueden tener diferentes configuraciones, se pueden fabricar a partir de un sustrato de silicio de la misma manera mediante un método conocido, por ejemplo, fotolitografía, usando diferentes patrones de máscara.

10 La Figura 10 muestra un sistema de medición 10 de acuerdo con otra realización. El sistema de medición 10 también tiene un chip microfluídico 12 conformado con un canal microfluídico 14 y una pluralidad de sensores 30 integrados con el chip microfluídico 12. A diferencia del sistema de medición 10 mostrado en la Figura 2, el sistema de medición 10 de acuerdo con esta realización no está provisto de los canales de derivación 18 y las válvulas 42. Por lo tanto, el sistema de medición 10 no tiene una función de clasificación de células, dependiendo de las características biofísicas de las células.

15 Este tipo de sistema de medición 10 se utiliza para realizar manipulación química o biológica de las células exponiendo la célula a una solución que incluye un reactivo bioquímico. En este caso, la solución se suministra desde la entrada 14a a través del canal microfluídico 14 para asegurarse de que las células de interés puedan caracterizarse bajo la influencia del reactivo. Por ejemplo, se puede observar la evolución de las células expuestas al reactivo. Para caracterizar las células, los elementos sensores 31 y 32 capturan una célula individual entre las puntas de los brazos de la misma manera que se describió anteriormente con referencia a la Figura 6. La reacción de la célula se puede obtener mediante manipulación directa de la célula ya que las características biofísicas de las células cambian en consecuencia.

20 Aunque en la Figura 10 se ilustran seis sensores 30 a modo de ejemplo, el sistema de medición 10 puede incluir cualquier número de sensores 30 según sea necesario.

25 De acuerdo con la realización en la que el sistema de medición 10 tiene una pluralidad de sensores 30 a lo largo del canal microfluídico 14, la caracterización se puede realizar para más de una célula simultáneamente. Cuando se completa la caracterización, todas las células se mueven hasta la salida 14b donde son aspiradas fuera del canal microfluídico 14 por la unidad de aspiración 62. No obstante, de acuerdo con una realización, el sistema de medición 10 también puede estar provisto de un único sensor 30.

30 La Figura 11 muestra un sistema de medición 10 similar al mostrado en la Figura 10, pero que tiene un rendimiento aumentado. Haciendo referencia a la Figura 11, se proporcionan cuatro canales microfluídicos 14 independientes en paralelo entre sí, a modo de ejemplo. Los canales microfluídicos 14 se pueden utilizar independientemente unos de otros y, por lo tanto, el rendimiento del sistema de medición 10 se puede aumentar hasta cuatro veces. La configuración modular del sistema de medición 10 hace que sea fácil aumentar el rendimiento según sea necesario combinando un sistema de medición con otro.

Además, los sistemas de medición 10 descritos anteriormente pueden estar configurados como un dispositivo modular, de tal manera que los sistemas de medición 10 sean compatibles con otros aparatos existentes.

35 Haciendo referencia a las Figuras 12 a 14, se describirá un proceso de fabricación ejemplar para producir un sensor 30 de acuerdo con una realización.

La Figura 12 ilustra un proceso de fabricación de elementos sensores 31 y 32 de un sistema de medición 10 de acuerdo con una realización. La Figura 13 muestra un patrón de máscara que se puede usar para fabricar los elementos sensores 31 y 32. La Figura 14 muestra los elementos sensores 31 y 32 producidos usando una máscara 240 mostrada en la Figura 13.

40 Como se muestra en la Figura 12(a), se proporcionan un objeto multicapa y una máscara 240 para producir los elementos sensores 31 y 32. Una capa de silicio en bruto 200 está dispuesta en la parte inferior del objeto. Una capa de óxido 210 está dispuesta en la parte superior de la capa de silicio en bruto 200. En el otro lado de la capa de óxido 210, se proporciona una capa superior de silicio 220. Una resistencia 230 forma una capa superior del objeto.

45 Para obtener una forma deseada de los elementos sensores 31 y 32, se proporciona la máscara 240. Como puede verse comparando las Figuras 13 y 14, la máscara 240 tiene una forma correspondiente a los elementos sensores 31 y 32 y al canal microfluídico 14.

50 A continuación, la resistencia 230 se somete a irradiación a través de la máscara 240 para eliminar parte de la resistencia 230 de acuerdo con el patrón de la máscara, como se ilustra en la Figura 12(b). A continuación, se graba la capa superior de silicio 220 y se retira la resistencia 230 (Figura 12(c)).

5 A continuación se graba la capa de óxido 210 para dar forma a la capa superior de silicio 220 (Figura 12(d)). En esta etapa, se le da forma al brazo 34 del sensor 30 así como a los elementos sensores 31 y 32. Finalmente, se proporciona una tapa 250 hecha de PDMS en la parte superior de la capa superior de silicio 220, para obtener los elementos sensores 31 y 32 así como el canal microfluídico 14 (Figuras 12(e) y 14). Haciendo referencia a la Figura 14, las porciones sombreadas representan una parte estacionaria unida fijamente a la placa base del chip microfluídico.

10 En consecuencia, el sensor integrado 30 se modela en la placa base del chip microfluídico 12. La forma del sensor 30 se obtiene con una técnica de micromecanizado que permite tener la parte fija en la placa base y el brazo flexible 34. Cuando los elementos sensores 31 y 32 y la abertura 14c se fabrican sobre la placa base, los brazos flexibles 34 se autoalinean con la abertura 14c para garantizar la impermeabilidad de la abertura 14c y el correcto funcionamiento del sistema de medición 10.

Según el proceso de fabricación descrito anteriormente, los elementos móviles tales como un actuador y/o sensor y la abertura lateral 14c del canal 14 se modelan con la misma máscara 240, por tanto estas partes también se autoalinean como resultado del proceso mostrado en la Figura 12. Por otro lado, la tapa de PDMS 250 se puede colocar relativamente suelta con relación a los elementos sensores 31 y 32.

15 Los sistemas de medición 10 descritos anteriormente facilitan el análisis específico de células en el campo de las ciencias biomédicas. Las posibles aplicaciones incluyen, pero no están limitadas a, investigación básica, diagnóstico del cáncer, investigación traslacional, desarrollo de fármacos, estudios moleculares, práctica de la medicina, etc.

20 En oncología clínica, el perfilado molecular de células tumorales circulantes aisladas (CTC) o poblaciones de células microdisecionadas puede generar un mapa global de información "ómica" que (en combinación con análisis morfológicos y biofísicos) puede proporcionar la base para el diagnóstico, el pronóstico y la terapia diseñada a medida de forma individualizada.

Las células individuales perfiladas (investigación de células individuales) también proporcionan detalles moleculares adicionales de los mecanismos de la enfermedad y nuevas capas de datos para identificar y priorizar dianas para fármacos e hipótesis terapéuticas.

REIVINDICACIONES

1. Sistema (10) adaptado para medir múltiples características biofísicas de células, comprendiendo el sistema (10):
 - un chip microfluídico (12) provisto de un canal microfluídico (14) que permite que fluyan células a través de él, teniendo el canal microfluídico (14) una entrada (14a), una salida (14b) y una abertura lateral (14c) situada entre la entrada (14a) y la salida (14b); y
 - un sensor capacitivo (30) integrado en el chip microfluídico, que tiene un par de elementos sensores (31, 32), estando adaptado el sensor (30) para obtener características biofísicas de una célula individual en el canal microfluídico (14) manipulando directamente la célula individual mediante los elementos sensores (31, 32) a través de la abertura lateral (14c) del canal microfluídico (14), donde los elementos sensores (31, 32) incluyen un par de brazos (34) que se extienden uno hacia el otro, estando dispuestas puntas del par de brazos (34) en aberturas laterales (14c) conformadas en el lado opuesto del canal microfluídico (14),
 - comprendiendo el sensor (30) una parte estacionaria y una parte móvil impulsada electrostáticamente que se puede mover con relación a la parte estacionaria, estando fijada la parte estacionaria al chip microfluídico (12), estando dispuesta la parte móvil en la abertura lateral (14c) del canal microfluídico (14), donde la parte móvil comprende al menos un brazo (34) del par de brazos configurado para acercarse al o alejarse del otro brazo (34),
 - caracterizado por que
 - las aberturas laterales (14c) y las puntas de los brazos (34) tienen un tamaño seleccionado para crear una interfaz entre fluido y aire, para permitir que las puntas de los brazos (34) se introduzcan en el canal microfluídico (14) a través de la respectiva abertura (14c) evitando al mismo tiempo que se escape un fluido de dentro del canal microfluídico (14).
2. Sistema (10) de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por que el sensor (30) es un sensor programable adaptado para obtener selectivamente una o más características biofísicas de la célula individual.
3. Sistema (10) de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado por que el chip microfluídico (12) está provisto además de al menos un canal microfluídico (14) adicional dispuesto en paralelo con el canal microfluídico (14).
4. Sistema (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que el sensor (30) está adaptado para obtener características biofísicas de la célula individual estimulando mecánica y/o eléctricamente la célula individual en el canal microfluídico (14).
5. Sistema (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que el sensor (30) está adaptado para obtener características biofísicas que incluyen al menos una de entre tamaño, rigidez, tiempo de recuperación de forma, viscosidad e impedancia eléctrica, y/o dependencia de la frecuencia de las características biofísicas.
6. Sistema (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende además unos medios de recogida (60) en comunicación de fluido con la salida (14b) del canal microfluídico (14).
7. Sistema (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado por que comprende además unos medios de clasificación (40) para clasificar las células que fluyen en el canal microfluídico (14), dependiendo de las características biofísicas de las células obtenidas por el sensor (30).
8. Sistema (10) de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado por que el chip microfluídico (12) está provisto además de al menos un canal de derivación (18) que sale del canal microfluídico (14) y aguas abajo con relación al sensor (30).
9. Sistema (10) de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por que los medios de clasificación (40) comprenden una válvula (42) adaptada para dirigir la célula al canal de derivación (18) o aguas abajo del canal microfluídico (14), dependiendo de las características biofísicas de la célula.
10. Sistema (10) de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, caracterizado por que comprende además un depósito (11) en comunicación de fluido con el canal de derivación (18).
11. Sistema (10) de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por que los medios de clasificación (40) están adaptados para clasificar las células comparando las características biofísicas de la célula con un umbral.
12. Sistema (10) de acuerdo con la reivindicación 11, caracterizado por que el umbral es programable.
13. Proceso de medición de múltiples características biofísicas de células, que comprende:

- proporcionar un sistema (10) de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12;
- hacer fluir células a través del canal microfluídico (14) entre la entrada (14a) y la salida (14b);
- manipular directamente una célula individual mediante el par de brazos (34) del sensor (30) a través de la abertura lateral (14c) del canal microfluídico (14) para obtener características biofísicas de dicha célula individual.

- 5 14. Proceso de acuerdo con la reivindicación 13, que comprende además estimular química y/o biológicamente la célula en el canal microfluídico.
15. Proceso de acuerdo con la reivindicación 13 o la reivindicación 14, que comprende además clasificar las células que fluyen en el canal microfluídico (14) dependiendo de las características biofísicas de las células obtenidas por el sensor (30).
- 10 16. Proceso de acuerdo con una de las reivindicaciones 13 a 15, en el que las características biofísicas incluyen al menos una de entre tamaño, rigidez, tiempo de recuperación de forma, viscosidad e impedancia eléctrica y/o dependencia de la frecuencia de las características biofísicas.

100

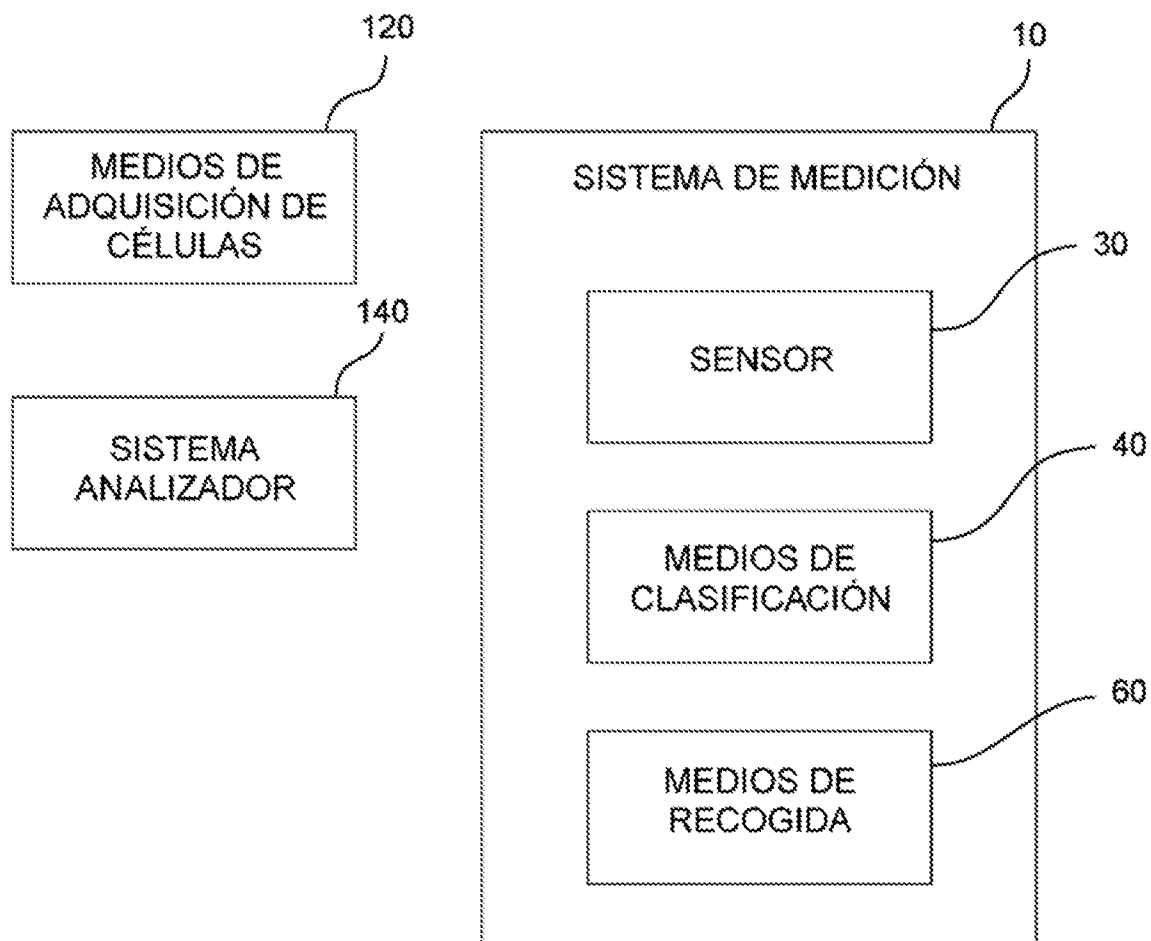


FIGURA 1

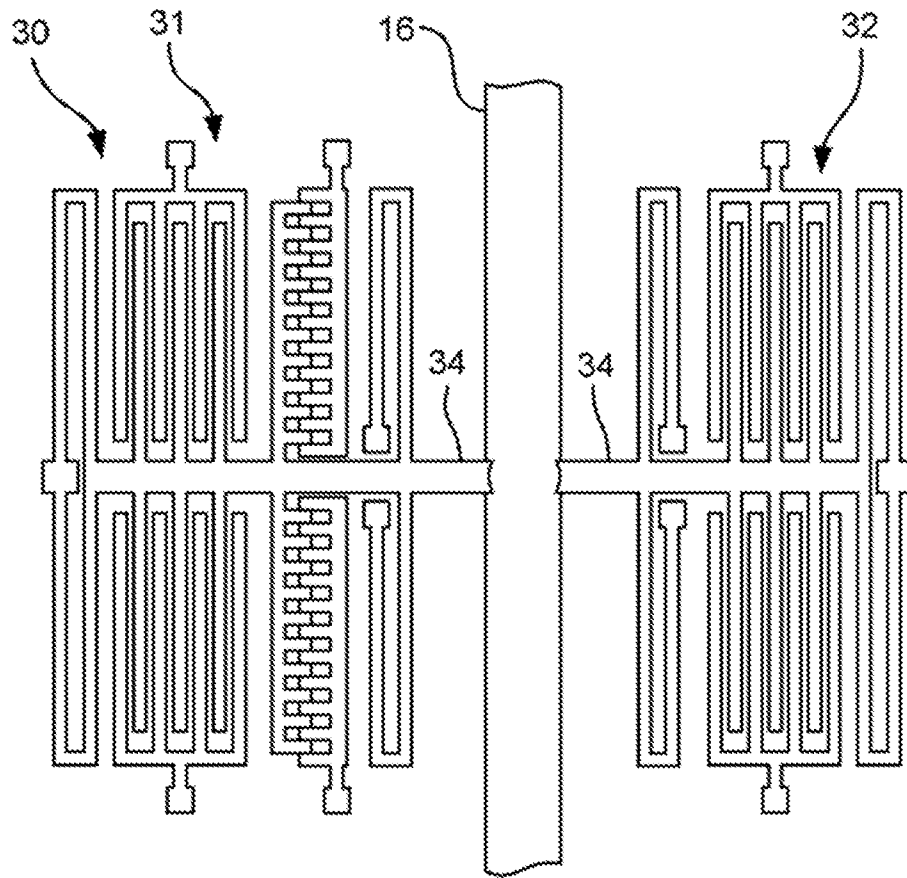


FIGURA 3

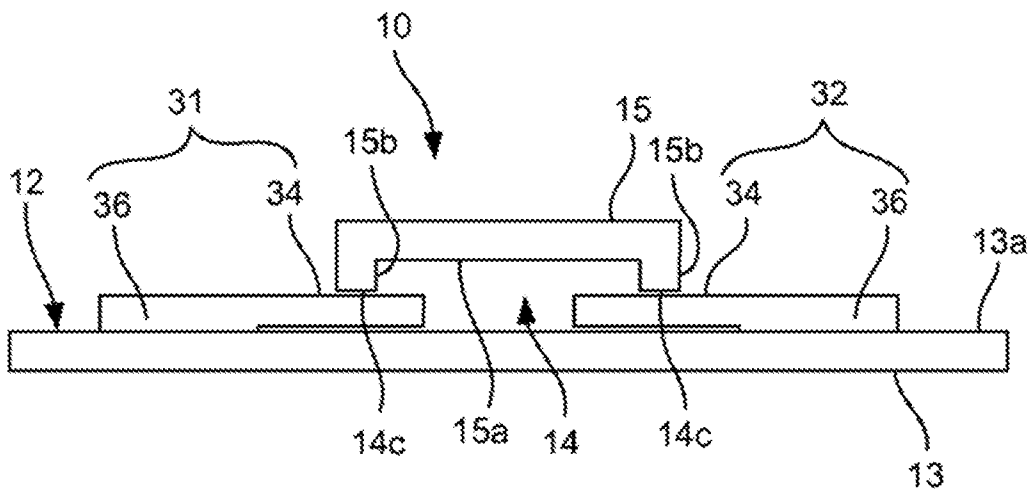


FIGURA 4

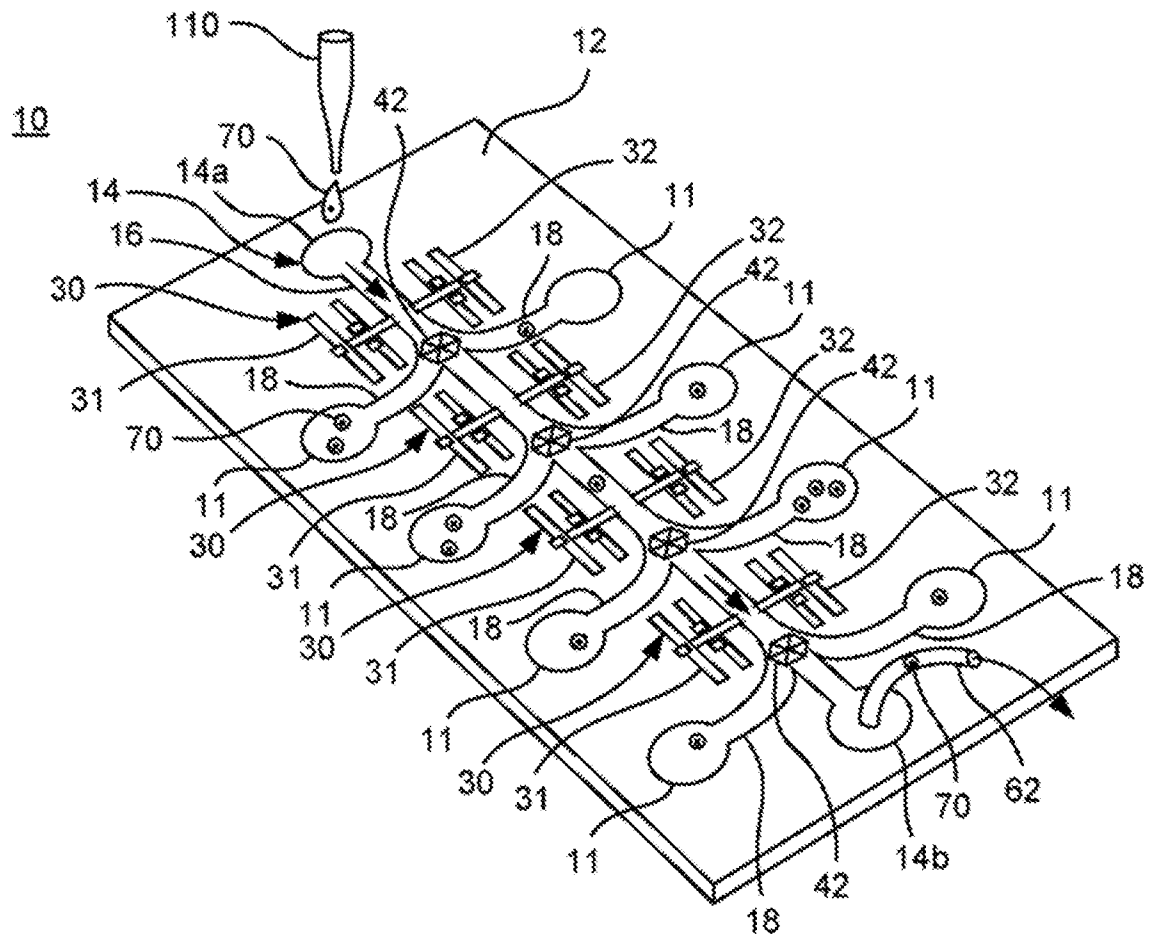


FIGURA 5

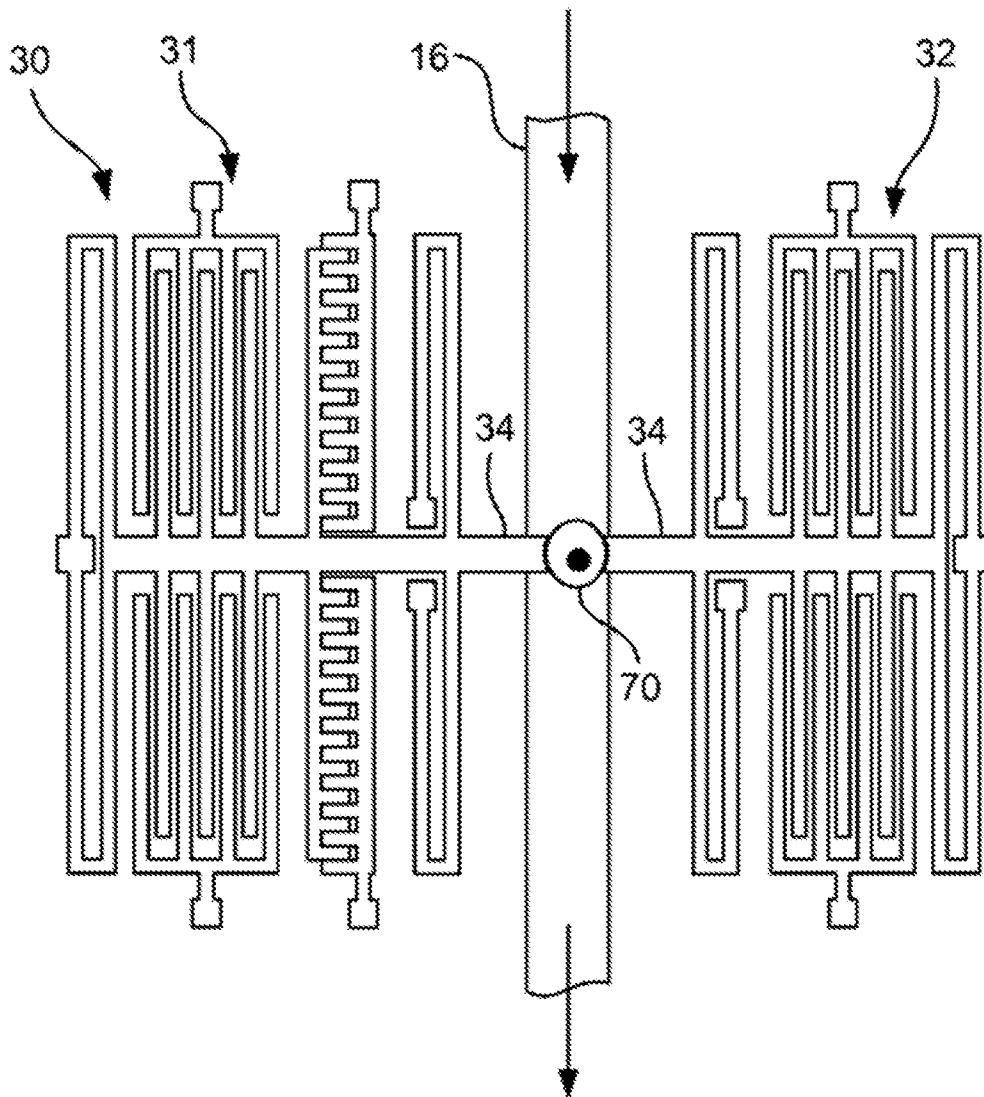


FIGURA 6

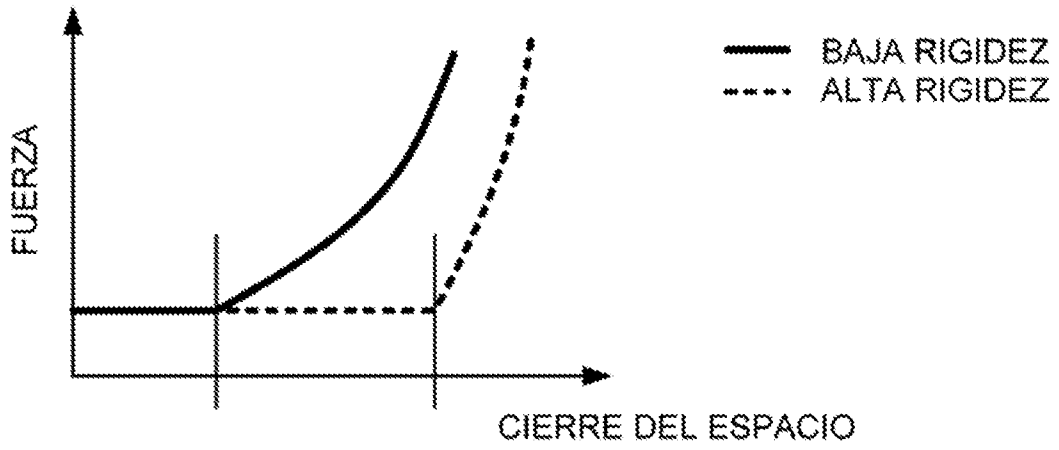


FIGURA 7A

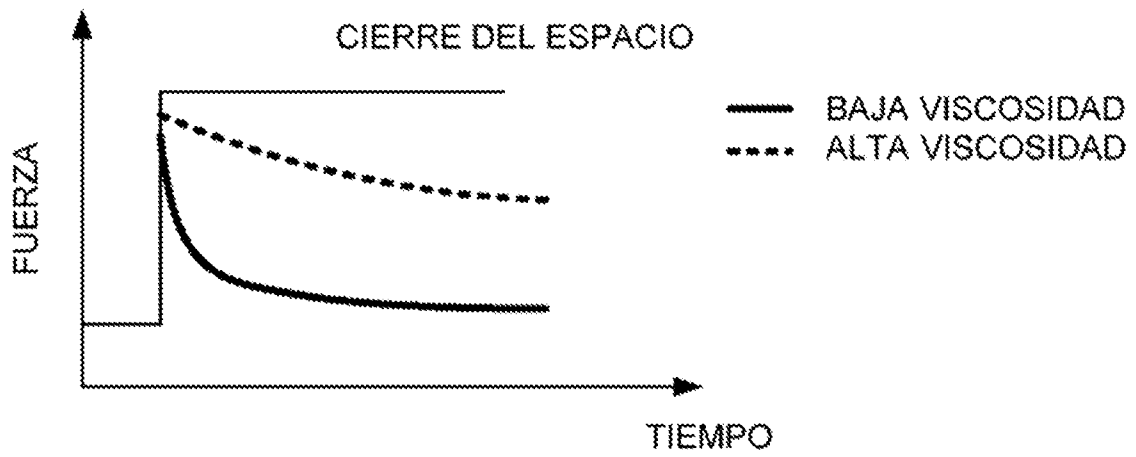


FIGURA 7B

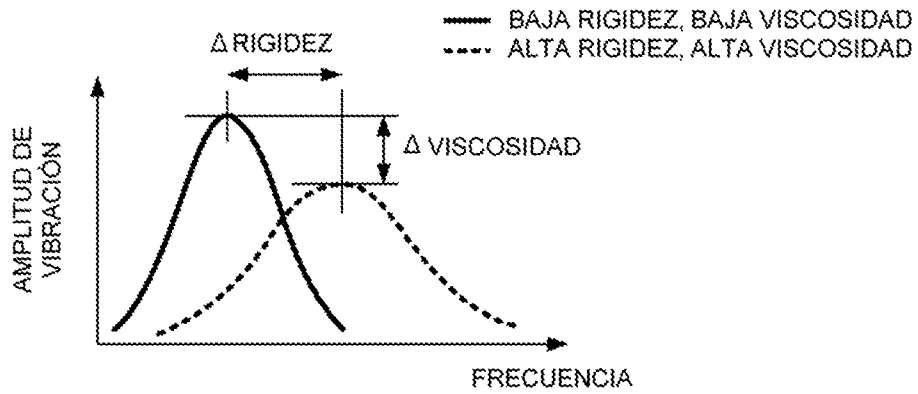


FIGURA 7C

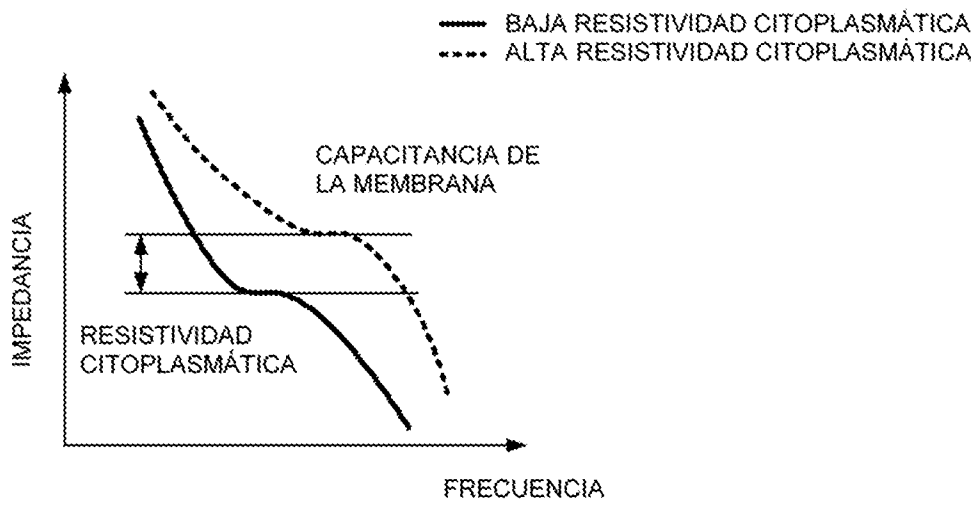


FIGURA 7D

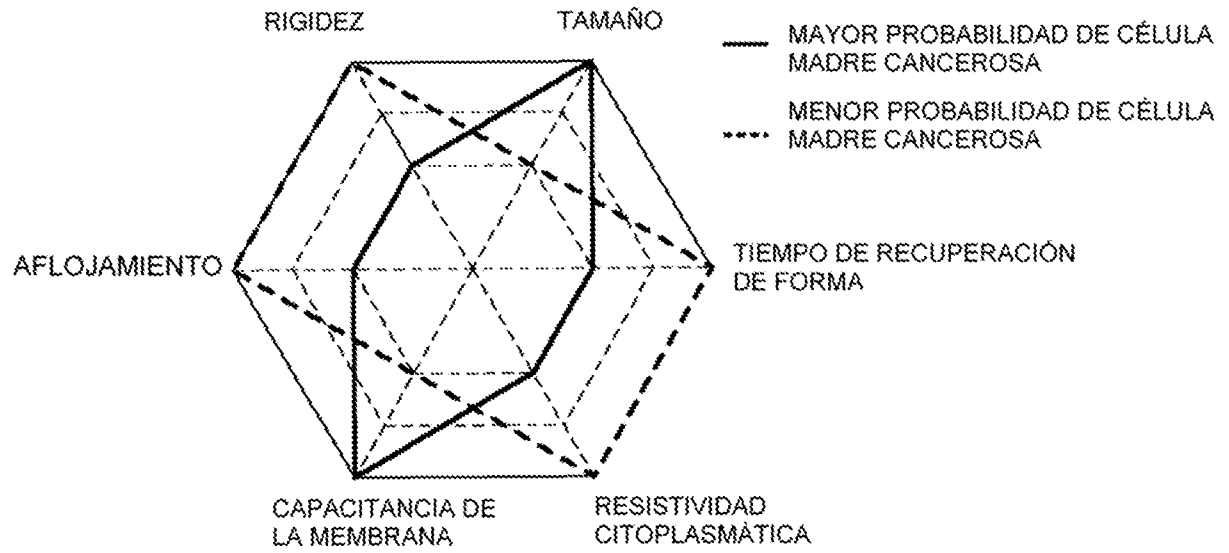


FIGURA 8

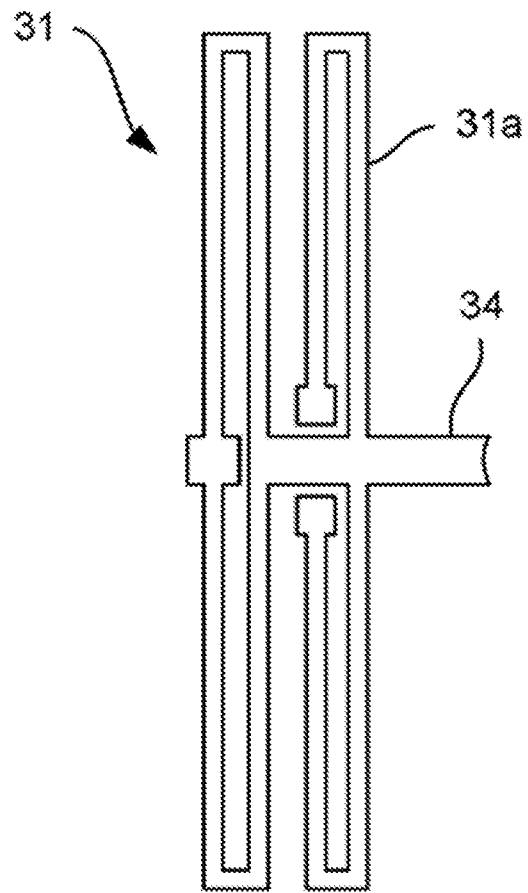


FIGURA 9A

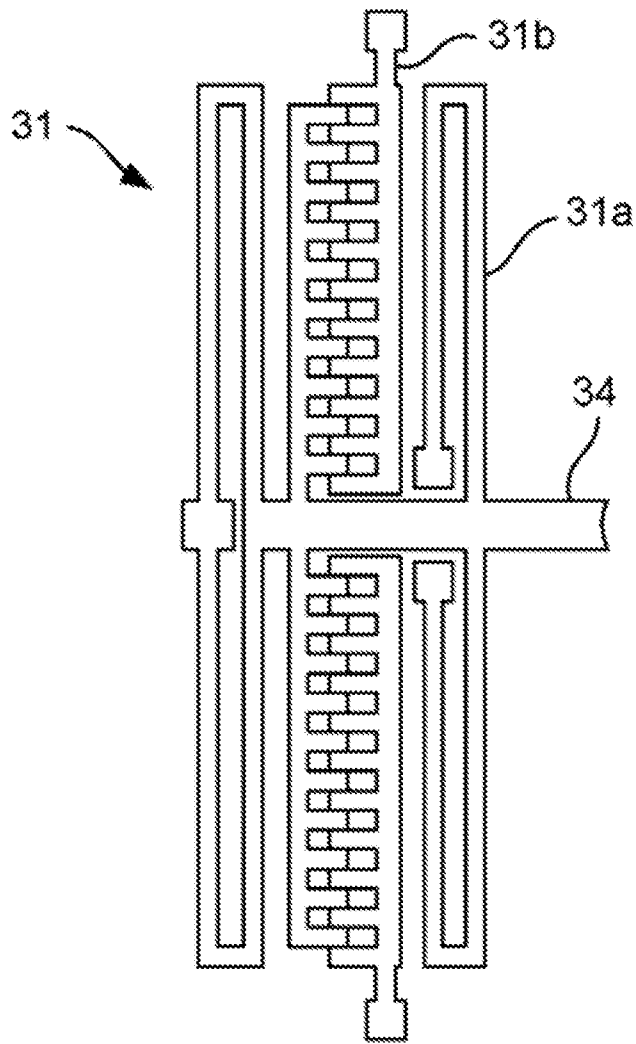


FIGURA 9B

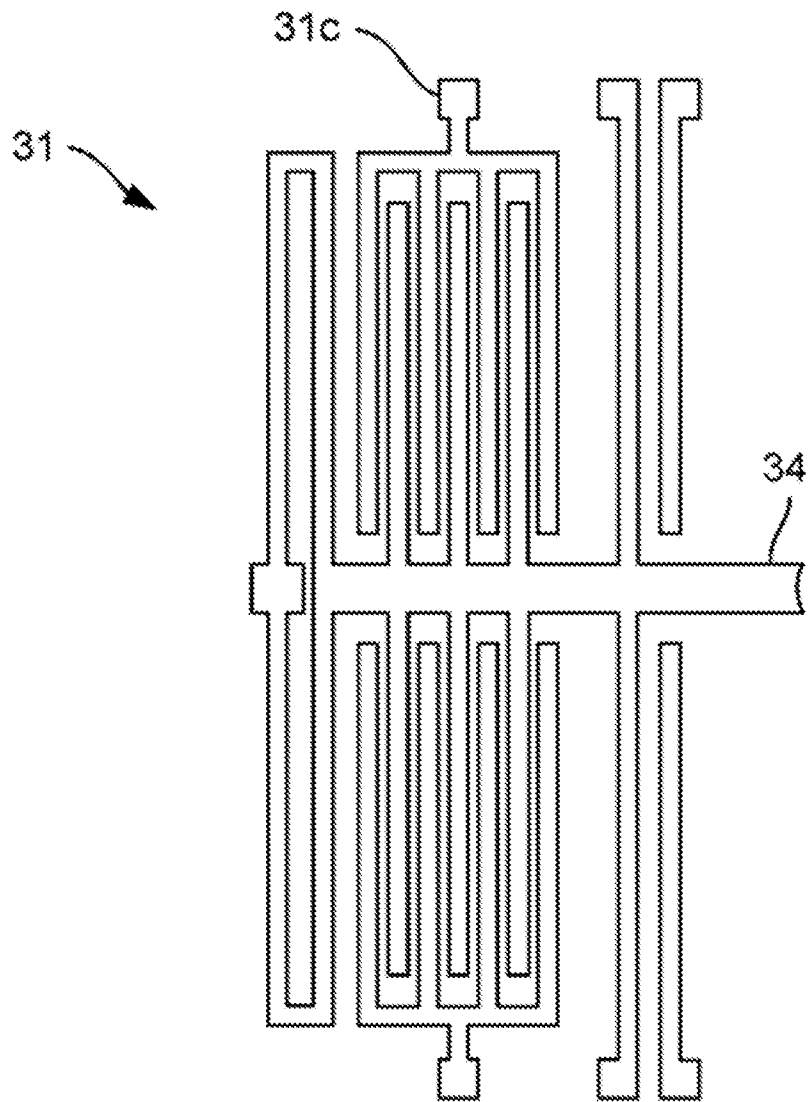


FIGURA 9C

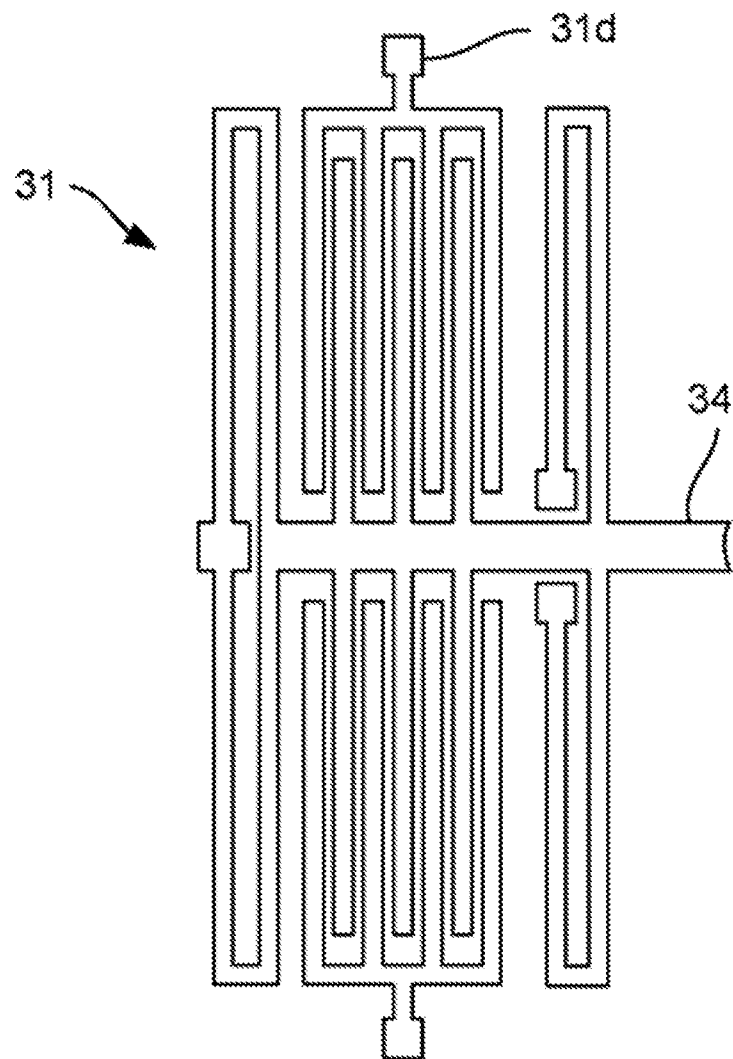


FIGURA 9D

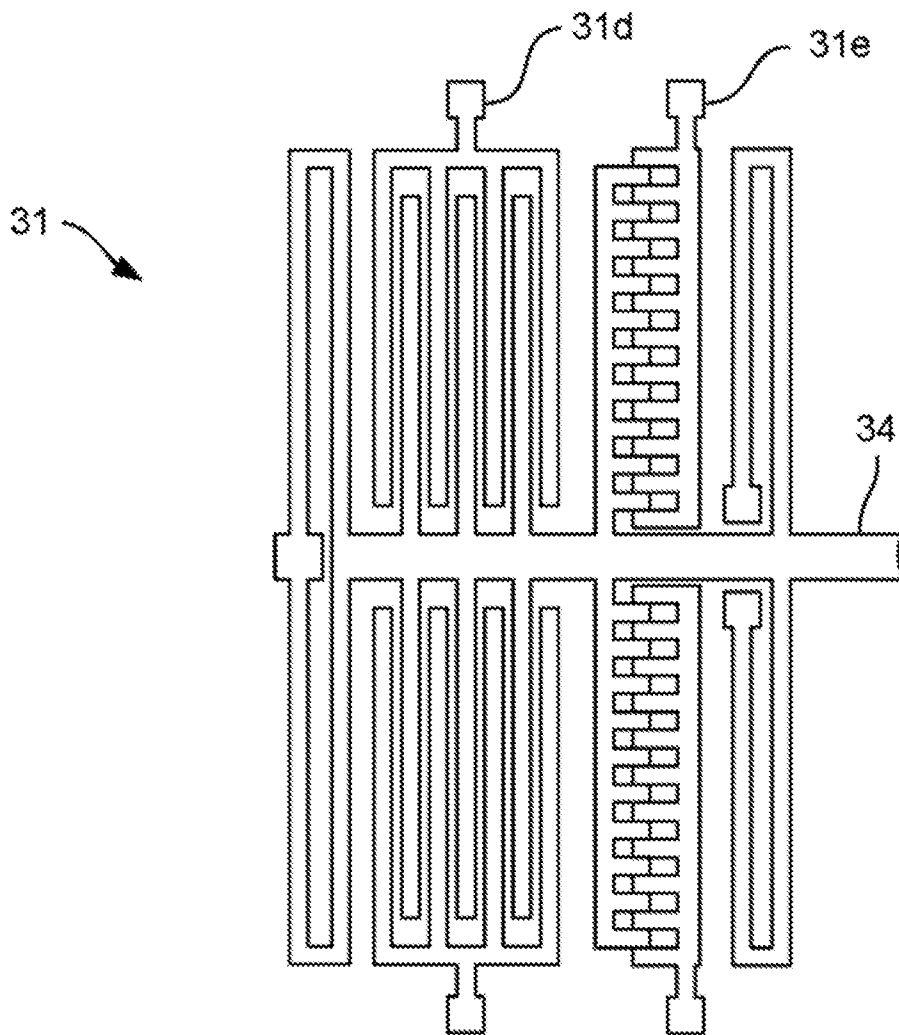


FIGURA 9E

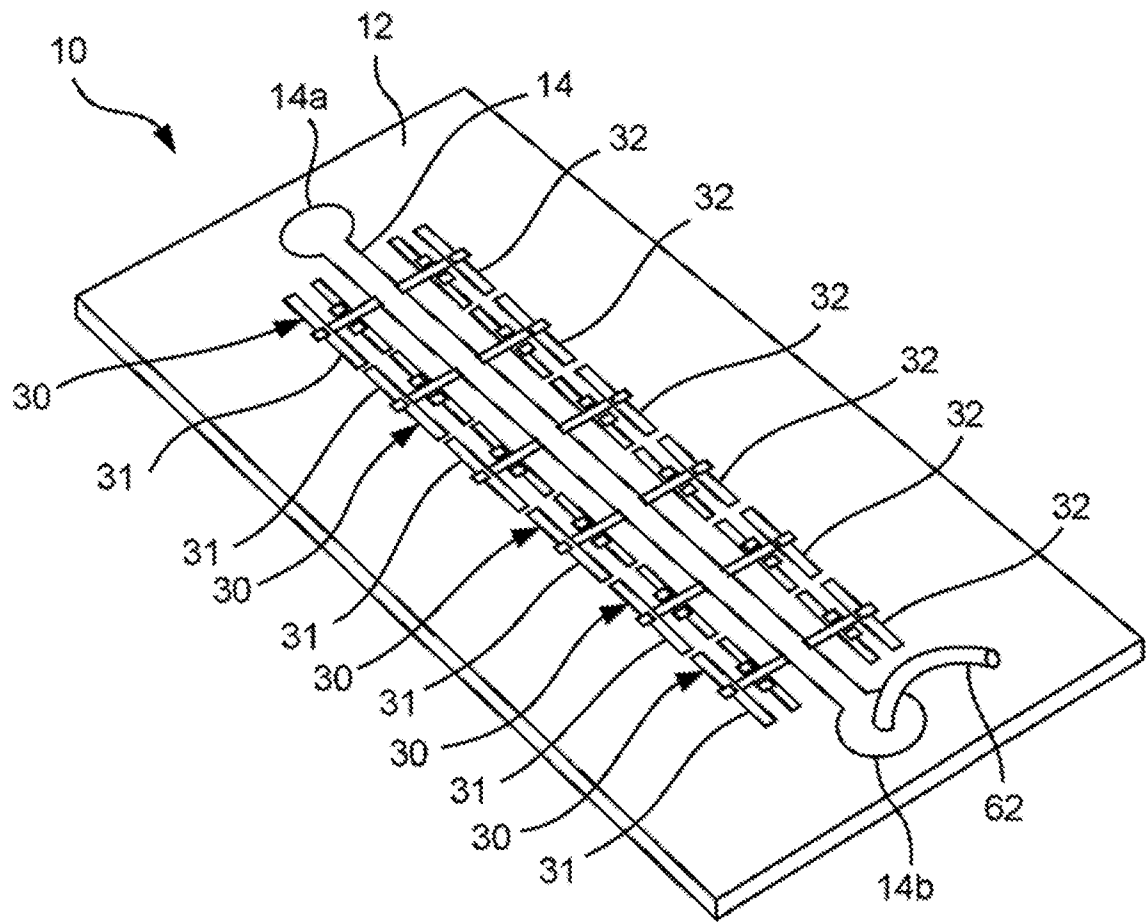


FIGURA 10

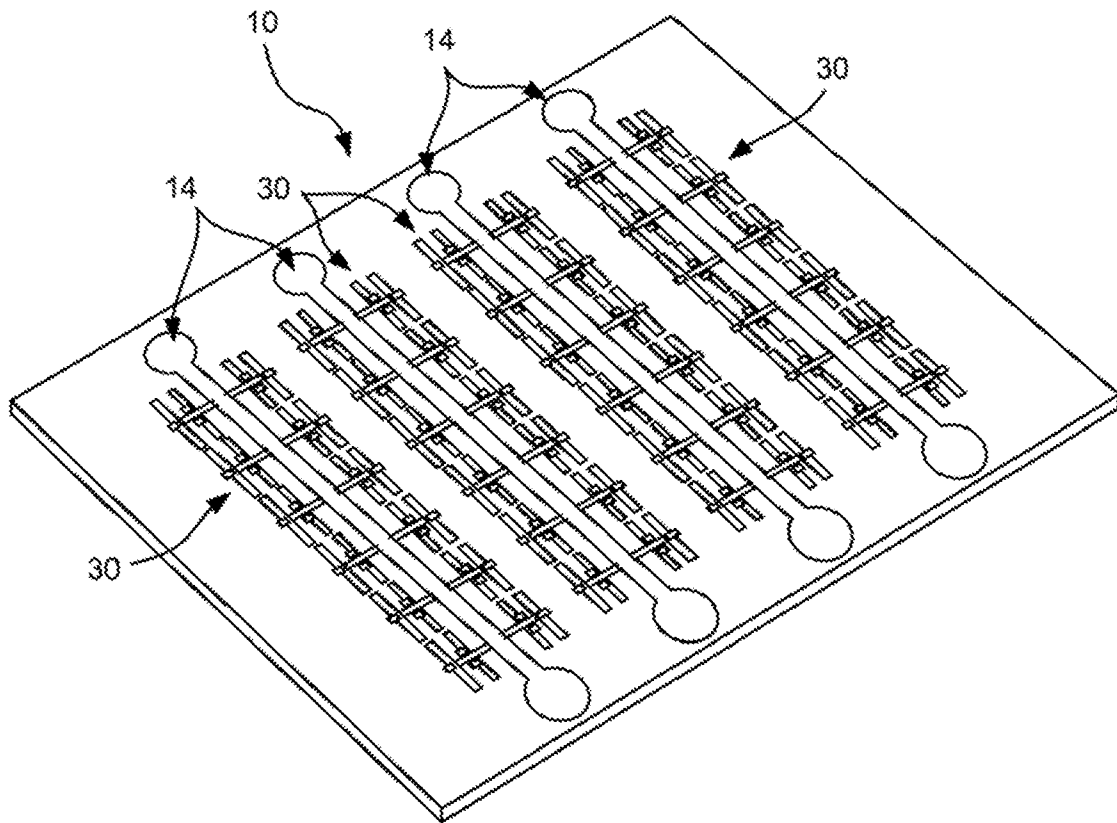


FIGURA 11

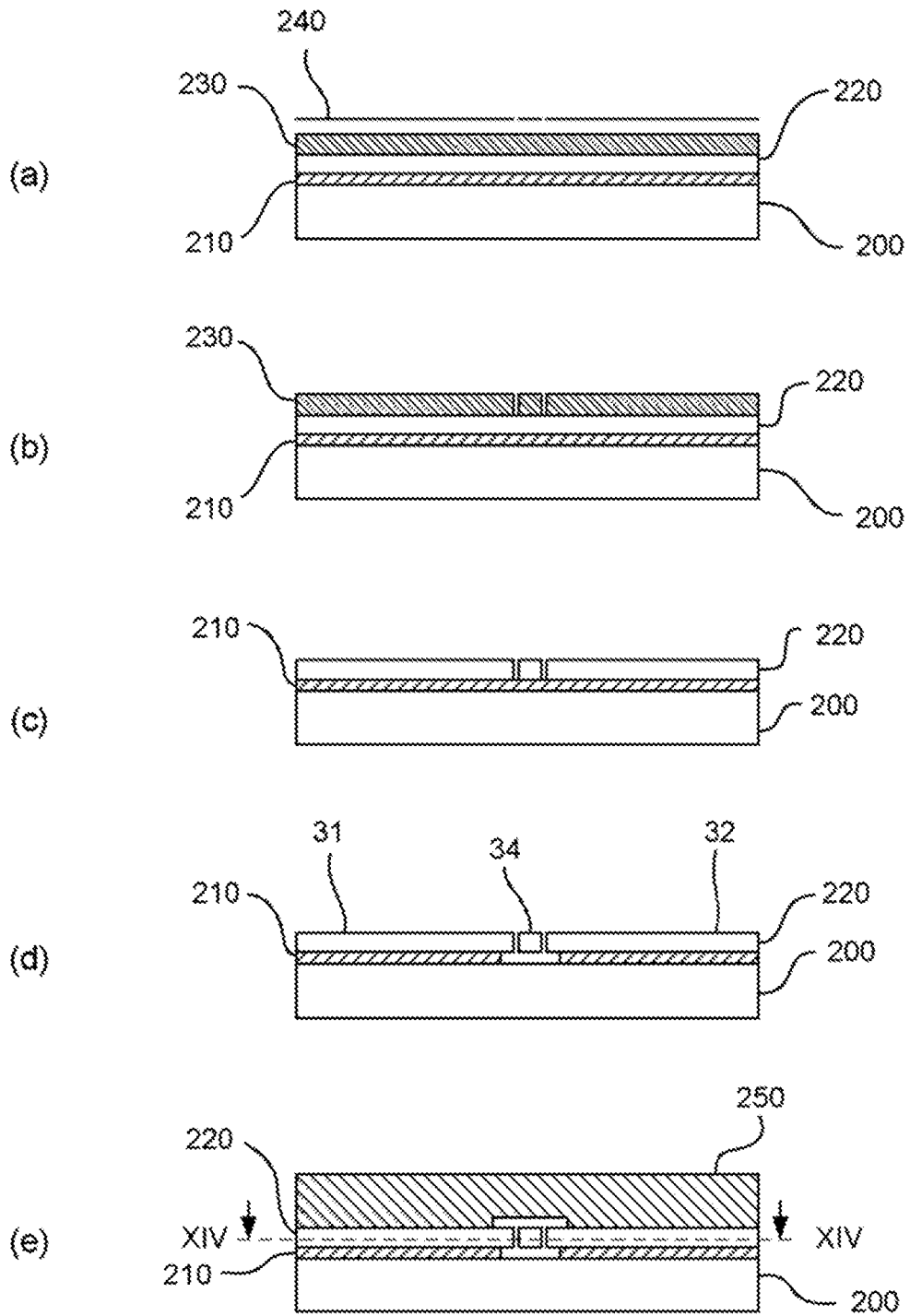


FIGURA 12

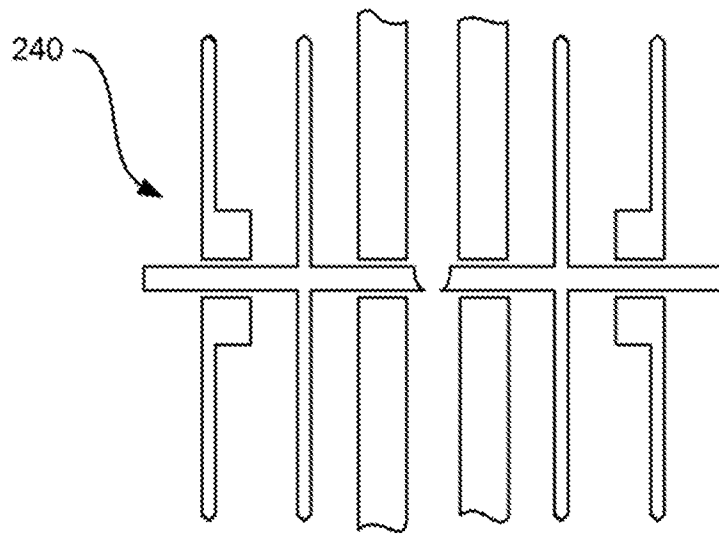


FIGURA 13

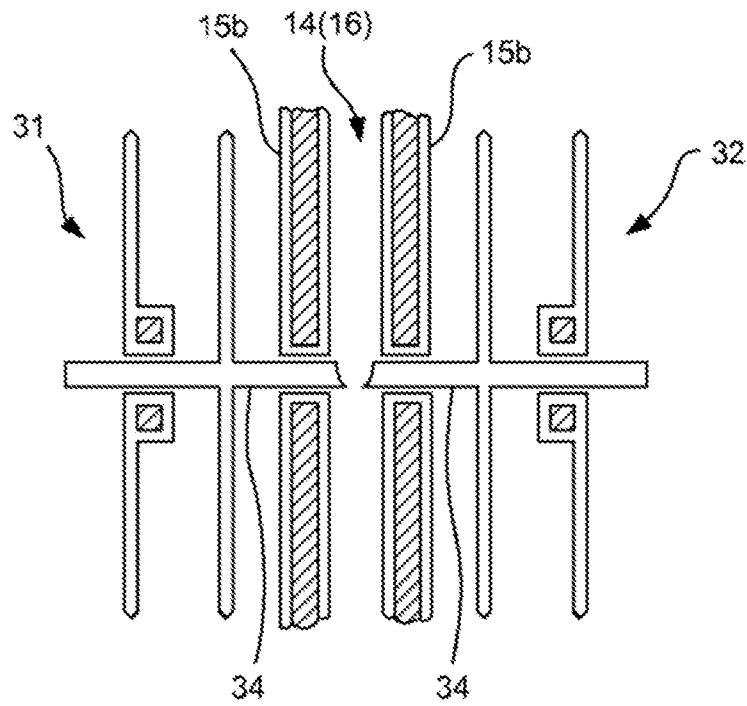


FIGURA 14