

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 004 542**

51 Int. Cl.:

G01N 35/02 (2006.01)

G01N 1/31 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.09.2020 PCT/EP2020/076978**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.04.2021 WO21058782**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.09.2020 E 20775357 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 4034887**

54 Título: **Sistema de procesamiento de muestras biológicas**

30 Prioridad:

27.09.2019 EP 19200101

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

12.03.2025

73 Titular/es:

**LUNAPHORE TECHNOLOGIES SA (100.00%)
Route de Lully 5C
1131 Tolochenaz, CH**

72 Inventor/es:

**JORIS, PIERRE;
EROGLU, DENIZ;
DUPOUY, DIEGO;
PELZ, BENJAMIN y
AMMANN, MARCO**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 3 004 542 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 procesamiento de muestras biológicas.

5 La presente invención se refiere a un sistema de procesamiento de muestras biológicas para analizar muestras de tejido fijadas en un soporte, utilizando un sistema de formación de imágenes que incluye un microscopio.

10 Los soportes convencionales para el análisis de muestras de tejido incluyen típicamente portaobjetos o cubreobjetos de vidrio, que pueden no estar recubiertos o pueden estar recubiertos, tales como portaobjetos recubiertos con pollisina o portaobjetos recubiertos con gel, para fijar las muestras de tejido sobre el soporte. Sin embargo, los soportes también pueden estar hechos de otros materiales.

15 Las muestras incluyen muestras de tejido completo, biopsias quirúrgicas o biopsias con aguja de tipos de tejido, muestras de sangre o extensiones celulares. Las muestras de tejido pueden proporcionarse como tejido cortado en secciones delgadas y posteriormente aplicadas a un soporte, muestras de tejido untadas en un soporte, muestras de tejido proporcionadas como fluidos goteados o aplicados de otro modo sobre el soporte. Las muestras de tejido pueden ser, por ejemplo, muestras de tejido mamario, tejido pulmonar, tejido amigdalino, tejido de colon, tejido de ganglios linfáticos, tejido prostático, tejido intestinal, tejido hepático o tejido renal. Las muestras para el análisis pueden ser muestras tumorales, incluidas biopsias de cánceres, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer colorrectal y melanoma. La presente invención también se puede aplicar a muestras de naturaleza microbiana tales como bacterias, o muestras de tejido vivo tales como cultivos de tejidos.

20 Una forma común de fijar muestras de tejido para su análisis son las muestras incrustadas en parafina fijadas con formalina (FFPE - *Formalin Fixed Paraffin Embedded*).

25 El análisis de muestras de tejido biológico incluye inmunohistoquímica (IHC) e inmunofluorescencia.

30 La IHC es una técnica que implica el uso de moléculas de sonda específicas, tales como anticuerpos, para detectar la existencia de biomarcadores específicos (por ejemplo, antígenos) que pueden ser expresados por células en una muestra de tejido. La IHC se utiliza ampliamente tanto en entornos clínicos como de investigación, por ejemplo, para diagnosticar enfermedades particulares como un tipo de cáncer o para investigar la correlación entre el pronóstico de la enfermedad y la expresión de nuevos biomarcadores. El área de aplicación dominante de la IHC es el diagnóstico del cáncer; pero tiene otras áreas de aplicación que incluyen la detección de agentes infecciosos como los virus y la ayuda en el diagnóstico de otras enfermedades como el Alzheimer.

35 La inmunofluorescencia es una técnica alternativa a la inmunohistoquímica clásica, especialmente para aplicaciones donde se desea observar múltiples mediciones moleculares en una sola muestra. Sin embargo, tiene varias limitaciones que dan como resultado una baja multiplexidad (es decir, el número de lecturas moleculares simultáneas). Su principal limitación es la diafonía entre las señales del fluoróforo. Una superposición entre los espectros de emisión de las moléculas de detección disminuye la especificidad de cada señal, lo que hace factible un máximo de solo 4-5 lecturas simultáneas. Otra limitación proviene del hecho de que cada diana molecular requiere un anticuerpo primario derivado de una especie diferente, lo que limita gravemente la multiplexidad. Esto se puede superar si se utiliza el marcaje directo de anticuerpos en lugar de ensayos de tipo sándwich; pero esto daría como resultado señales de salida mucho más bajas debido a la falta de amplificación, lo que llevaría a una disminución de la sensibilidad.

40 La multiplexación multiciclo es una técnica que puede superar ciertas limitaciones de los procedimientos de multiplexación clásicos. La técnica implica la elución del anticuerpo diana o la inactivación de las moléculas marcadoras después de cada ciclo de tinción y formación de imágenes. Sin embargo, existen varias desventajas asociadas con las tecnologías convencionales de tinción e imagenología de múltiples ciclos para secciones de tejido. Un primer inconveniente son los tiempos de respuesta extremadamente largos, resultantes de largos ciclos de incubación y lavado (generalmente hasta varias horas), que limitan el rendimiento y pueden causar la degradación de la muestra con el tiempo. Además, las etapas repetidas de montaje/desmontaje de cubreobjetos de imágenes deterioran aún más la integridad del tejido. La manipulación manual de muestras durante los ciclos también disminuye la reproducibilidad y la fiabilidad. Otra consideración es el área de muestra de la que se va a obtener la imagen y la precisión del escaneo de todo el portaobjetos. Cuando se obtienen imágenes de portaobjetos enteros o grandes áreas de interés con objetivos de gran aumento, se utilizan soluciones de software de superposición/costura para obtener la imagen. La extracción y re inserción de la muestra debajo del objetivo después de cada ciclo de tinción puede dar como resultado errores de alineación entre las imágenes correspondientes a diferentes marcadores y disminuye la precisión de la multiplexación.

60 El documento WO 2013/128322 A1 divulga un sistema de procesamiento de muestras biológicas según el preámbulo de la reivindicación 1.

65 Un objetivo de esta invención es proporcionar un sistema de procesamiento de muestras biológicas para obtener imágenes y analizar muestras de tejidos fijadas en un soporte, que sea rápido y eficiente, y permita obtener imágenes precisas de muestras de tejido en un área grande.

Resulta ventajoso proporcionar un sistema de procesamiento de muestras biológicas que sea versátil y pueda usarse o adaptarse para diferentes aplicaciones.

5 Resulta ventajoso proporcionar un sistema de procesamiento de muestras biológicas que pueda realizar un procesamiento múltiple secuencial de una muestra biológica con una secuencia de reactivos que genere resultados rápidos, precisos y confiables.

10 Otro objetivo de esta invención es proporcionar un cartucho microfluídico para un sistema de procesamiento de muestras biológicas para obtener imágenes y analizar muestras de tejidos fijadas en un soporte, que permita obtener imágenes rápidas, eficientes y precisas de muestras de tejido en un área grande.

15 Resulta ventajoso proporcionar un cartucho microfluídico que sea versátil y pueda usarse o adaptarse para diferentes aplicaciones.

Resulta ventajoso proporcionar un cartucho microfluídico que sea compacto, económico y fácil de instalar y reemplazar.

20 Los objetivos de la invención se han logrado proporcionando un sistema de procesamiento de muestras biológicas según la reivindicación 1.

En esta invención se describe un sistema de procesamiento de muestras biológicas según la reivindicación 1.

25 En una realización ventajosa, la ventana del soporte del cartucho microfluídico comprende un rebaje dentro del cual la lente se inserta parcialmente en la posición de formación de imágenes.

En una realización ventajosa, la estación de procesamiento de muestras comprende al menos tres, preferentemente cuatro o más conjuntos de procesamiento de muestras.

30 En una realización ventajosa, la plataforma de manipulación comprende un mecanismo de desplazamiento giratorio para girar el soporte entre posiciones.

35 En una realización ventajosa, cada conjunto de procesamiento de muestras comprende un mecanismo de sujeción que incluye un mecanismo de bloqueo y un accionador de presión configurado para aplicar presión sobre el soporte de tejido contra el cartucho microfluídico en una posición cerrada, el mecanismo de sujeción comprende un pistón de gas comprimido.

40 En una realización ventajosa, cada conjunto de procesamiento de muestras comprende un sistema de control de temperatura que incluye un sistema de enfriamiento y calentamiento acoplado al soporte de portaobjetos de tejido.

En una realización ventajosa, el soporte de cartucho microfluídico y el soporte de tejido están acoplados de forma pivotante entre sí a través de un acoplamiento de bisagra.

45 En una realización ventajosa, el soporte de cartucho microfluídico está en forma de una tapa móvil y el soporte de portaobjetos de tejido en forma de una base fijada estáticamente al soporte de una plataforma de manipulación.

En una realización ventajosa, la ventana de visualización del soporte de cartucho microfluídico comprende un rebaje biselado.

50 También se describe en la presente un cartucho microfluídico para un sistema de procesamiento de muestras biológicas que comprende un sustrato, una red de flujo de fluido formada dentro del sustrato, un sello montado en el sustrato, una cavidad de una cámara de reacción formada en el sustrato y una ventana de visualización, el cartucho microfluídico configurado para colocarse contra un soporte de tejido para cubrir dicha cavidad y constituir un lado de la cámara de reacción, la cámara de reacción se forma así entre el soporte de tejido y el cartucho microfluídico. La red de flujo de fluido comprende una entrada, una red de canales de entrada y una pluralidad de orificios de entrada de cámara. La red de flujo de fluido comprende además una salida, una red de canales de salida y una pluralidad de orificios de salida de la cámara. Los orificios de entrada de la cámara y los orificios de salida de la cámara están dispuestos en lados opuestos de la cavidad de la cámara de reacción para el flujo de reactivos a través de la cámara de reacción. El sello rodea la cavidad de la cámara de reacción y los orificios de entrada y salida de la cámara.

60 La ventana de visualización comprende una cubierta transparente de menos de 1 mm de espesor y que tiene una superficie externa dentro de un rebaje formado en el sustrato de la ventana de visualización con respecto a una superficie externa del sustrato, configurada para permitir que una lente de un microscopio se inserte parcialmente en dicho rebaje de la ventana de visualización.

65 En una realización ventajosa, la cubierta transparente está hecha de vidrio o zafiro.

En una realización ventajosa, la cubierta transparente tiene un espesor de menos de 0,5 mm, preferentemente de menos de 0,3 mm de espesor.

5 En una realización ventajosa, el cartucho comprende además elementos espaciadores que definen una altura de la cámara de reacción cuando se coloca un soporte de tejido y se presiona contra el mismo.

El elemento espaciador puede tener forma de protuberancia continua o parcialmente continua, o preferentemente de protuberancias separadas discretas.

10 En una realización ventajosa, los elementos espaciadores están dispuestos en un lado exterior del sello con respecto a la cámara de reacción.

15 En una realización ventajosa, el sello está montado en una ranura en el sustrato

Otros objetos y características ventajosas de la invención resultarán evidentes a partir de las reivindicaciones, de la descripción detallada y de los dibujos adjuntos, donde:

20 La Figura 1 es una vista esquemática en perspectiva de un sistema de procesamiento de muestras biológicas según una realización de la invención;

La Figura 2 es una vista en perspectiva esquemática de los componentes principales de una estación de procesamiento de muestras de un sistema de procesamiento de muestras biológicas según una realización de la invención;

25 Las Figuras 3a y 3b son vistas en perspectiva de un conjunto de procesamiento de muestras de la estación de procesamiento de muestras según realizaciones de la invención, en la posición abierta (Figura 3a) y la posición cerrada (Figura 3b);

La Figura 3c es una vista en perspectiva en sección transversal de un conjunto de procesamiento de muestras de la estación de procesamiento de muestras según realizaciones de la invención, en la posición cerrada;

30 Las Figuras 4a y 4b son vistas en perspectiva lateral superior e inferior de un cartucho microfluídico de un sistema de procesamiento de muestras biológicas según realizaciones de la invención;

La Figura 5 es una vista esquemática en sección transversal ampliada de un cartucho microfluídico montado en un portaobjetos en un sistema de procesamiento de muestras biológicas según una realización de la invención.

35 Con referencia a las figuras, un sistema de procesamiento de muestras biológicas según realizaciones de la invención comprende un conjunto de formación de imágenes 2, una estación de procesamiento de muestras 3 y una pluralidad de cartuchos microfluídicos 4 montados en la estación de procesamiento de muestras 3. El sistema de procesamiento de muestras biológicas 1 es para analizar muestras de tejido biológico 36 que pueden fijarse a un soporte 34.

40 El soporte 34 puede estar en forma de un portaobjetos de microscopio convencional, por ejemplo, hecho de vidrio y que tiene dimensiones típicas de 3 x 2 cm de área de superficie y aproximadamente 1 mm de espesor. Dichos portaobjetos de microscopio se utilizan ampliamente para fijar muestras de tejido para su colocación bajo un objetivo de microscopio para analizar las muestras manualmente o mediante un sistema de imágenes automatizado. Sin embargo, también se pueden usar otros soportes, ya sean convencionales o no, para fijar una muestra de tejido para su análisis con un sistema de formación de imágenes según realizaciones de la invención. Preferentemente, el soporte es transparente para proporcionar una fuente de luz debajo de la muestra, aunque dentro del alcance de la invención, el soporte puede ser opaco y se puede proporcionar una luz para la obtención de imágenes desde el lado de visualización de la muestra.

50 Se pueden analizar varias muestras de tejido, habiéndose proporcionado ejemplos en la sección introductoria de la presente anteriormente.

Una aplicación que se beneficia de las características ventajosas de la presente invención incluye el análisis de muestras de tejido de biopsias que se toman justo antes del análisis y donde se requiere un análisis rápido del tejido. Esto puede producirse, por ejemplo, durante biopsias de un posible cáncer. En particular, una aplicación donde la generación rápida de resultados es muy ventajosa es durante la extirpación quirúrgica de tejido canceroso, con el fin de verificar que todo el tejido portador de células cancerosas se ha eliminado por completo. Por lo tanto, el análisis se puede realizar durante la cirugía y antes de completar la operación quirúrgica. La presente invención permite que el procesamiento de muestras de tejido se realice en menos de una hora, preferiblemente menos de cuarenta y cinco minutos, posiblemente menos de treinta minutos.

60 Sin embargo, el sistema de procesamiento biológico según las realizaciones de la invención se puede usar en otras aplicaciones que no requieren dicha salida rápida de resultados, sin embargo, que se benefician del análisis rápido, confiable y eficiente de muestras de tejido. Una de las ventajas buscadas es reducir la cantidad de tejido requerido para el análisis con el fin de garantizar que el procedimiento de biopsia sea lo menos invasivo posible.

65 El conjunto de formación de imágenes 2 comprende uno o más microscopios, cada uno con al menos una lente 14, y

un sistema de procesamiento de imágenes (detalles internos no ilustrados explícitamente) que comprende un sensor de captura de imágenes y un circuito electrónico y software asociados para capturar y procesar imágenes vistas a través de la lente del microscopio. Los sistemas de formación de imágenes para la captura, procesamiento y almacenamiento de imágenes son bien conocidos *per se* y no necesitan describirse adicionalmente en el presente documento.

El sistema de procesamiento de muestras biológicas puede comprender además un módulo de almacenamiento y suministro de reactivos (no se muestra) para suministrar reactivos, soluciones amortiguadoras y soluciones de lavado a la estación de procesamiento de muestras, en particular para el flujo a través de una cámara de reacción 29 del cartucho microfluídico 4 para el análisis de la muestra.

La estación de procesamiento de muestras 3 comprende una plataforma de manipulación 5 y una pluralidad de conjuntos de procesamiento de muestras 7 montadas en el soporte 17 de la plataforma de manipulación 5. La plataforma de manipulación 5 comprende además un mecanismo de desplazamiento (no se muestra) para mover el soporte 17 y/o el conjunto de procesamiento de muestras 7 sobre el soporte para mover el conjunto de procesamiento de muestras 7 entre una posición por debajo de la lente del microscopio 14 hasta al menos una posición para cargar y descargar un portaobjetos de tejido 34 desde un conjunto de procesamiento de muestras 7.

En una realización, el mecanismo de desplazamiento puede comprender un acoplamiento giratorio, por ejemplo, dispuesto debajo del soporte 17 para la rotación del soporte alrededor de un eje central. En la realización ilustrada, la pluralidad (aquí se muestran cuatro) de conjuntos de procesamiento de muestras 7 se giran alrededor del eje central A entre las posiciones de carga y visualización y cualquier otra posición (por ejemplo, posiciones de espera).

En otra realización (no mostrada), la estación de procesamiento de muestras puede comprender, por ejemplo, solo dos conjuntos de procesamiento de muestras que están montados en un portaobjetos del mecanismo de desplazamiento para la traslación entre las posiciones de visualización y carga.

Sin embargo, varias combinaciones de ejes de rotación y/o traslación de desplazamiento pueden implementarse en mecanismos de desplazamiento dentro del alcance de la invención.

Cada conjunto de procesamiento de muestras 7 comprende un soporte de cartucho microfluídico 9, un soporte de tejido 11 y un acoplamiento 13 entre ellos para permitir el movimiento del soporte de cartucho 9 con respecto al portaobjetos de tejido 11 para montar y desmontar el portaobjetos de tejido 34. En la realización ilustrada, el soporte de cartucho microfluídico se proporciona en forma de una tapa acoplada de forma giratoria a través de una bisagra que forma el acoplamiento 13 a una base que forma el portaobjetos de tejido 11.

Sin embargo, dentro del alcance de la invención, también se puede prever tener el soporte de cartucho microfluídico como base y el soporte del portaobjetos de tejido como la tapa montada de forma móvil en la base. Esta configuración se puede usar, por ejemplo, en combinación con microscopía invertida.

La base está montada de forma fija en la plataforma de manipulación 5 de la estación de procesamiento de muestras 3.

El acoplamiento 13 puede proporcionarse en otras formas en lugar de una bisagra de pivote, por ejemplo, por medio de brazos de enlace o un portaobjetos que permite que el soporte de cartucho microfluídico se aleje de la base que sostiene el portaobjetos de tejido 11, en un movimiento de traslación o un movimiento combinado de traslación y rotación. Sin embargo, el acoplamiento 13 en forma de una bisagra de pivote es simple y robusto y corresponde a una realización preferida.

El soporte de cartucho microfluídico 9 comprende ventajosamente una ventana de visualización 19 con un rebaje 43 configurado para recibir al menos parcialmente en el mismo una lente 14 del microscopio de modo que la lente del microscopio pueda colocarse muy cerca de una ventana de visualización 12 del cartucho microfluídico. Por lo tanto, se puede utilizar una lente con una apertura numérica muy grande para mejorar la calidad de la captura de imágenes de la muestra observada.

Un conjunto de procesamiento de muestras 7 comprende además ventajosamente un mecanismo de sujeción 15 que incluye un mecanismo de bloqueo 16 y un accionador de presión 18. El accionador de presión 18 puede comprender un pistón impulsado por un fluido comprimido, por ejemplo, un pistón de aire comprimido 37, que aplica presión sobre el portaobjetos de tejido 34 contra el cartucho microfluídico 4. La presión asegura que un sello 10 dispuesto entre un sustrato 6 de un cartucho microfluídico 4 y el portaobjetos de tejido 34 esté cerrado herméticamente para soportar una presión en la cámara de reacción 29 durante la inyección de reactivo y otros fluidos en la cámara de reacción. La presión aplicada por el actuador de presión asegura que la presión máxima alcanzada en la cámara de reacción no cause fugas en el sello 10.

El mecanismo de bloqueo 16 puede tener, por ejemplo, la forma de uno o más pasadores de bloqueo insertados en los orificios correspondientes en una brida o pestaña de bloqueo en la otra tapa o base. Sin embargo, dentro del

alcanse de la invención, el mecanismo de bloqueo puede tener otras configuraciones, por ejemplo, un brazo giratorio con un hombro de retención que se acopla a un hombro de retención correspondiente en la otra de las partes de tapa o base.

5 La parte móvil del soporte de cartucho microfluídico o portaobjetos de tejido puede accionarse manualmente o puede incluir un mecanismo de accionamiento motorizado (no mostrado) y, de manera similar, el mecanismo de bloqueo puede accionarse manualmente o puede incluir un sistema de accionamiento motorizado para la apertura y el cierre automáticos de las partes móviles y estáticas.

10 El conjunto de procesamiento de muestras 7 comprende además un sistema de flujo de fluido de reactivo para dirigir el flujo de reactivos y otros fluidos desde la fuente de reactivo externa al cartucho microfluídico 4. El sistema de flujo de fluido de reactivo comprende, por lo tanto, acoplamiento de entrada para conductos de reactivo tales como tubos de reactivo para la entrada y salida de reactivos, y una interfaz rodeada por un elemento de sellado que se acopla a la red de flujo de fluido 8 en el cartucho microfluídico 4.

15 El mecanismo de sujeción 15, al presionar el portaobjetos de tejido 34 contra el cartucho microfluídico 4 también puede servir para empujar el cartucho microfluídico contra el portaobjetos de tejido 11 para garantizar un sellado hermético en la interfaz entre la entrada y la salida en el cartucho microfluídico y las salidas y entradas correspondientes en el sistema de flujo de fluido reactivo dentro del soporte de cartucho microfluídico 9.

20 El conjunto de procesamiento de muestras puede comprender además un sistema de control de temperatura 24 para enfriar y/o calentar el portaobjetos de tejido 34 con el fin de calentar o enfriar los reactivos dentro de la cámara de reacción 29 durante el procesamiento de muestras de tejido, en particular para los fines de multiplexación. El sistema de control de temperatura 24 puede comprender ventajosamente un chip Peltier 31 colocado en o debajo de la base que forma el portaobjetos de tejido 11. En una variante, el sistema de control de temperatura puede comprender además elementos de calentamiento y/o enfriamiento colocados para calentar y/o enfriar alrededor del sistema de flujo de fluido reactivo dentro del conjunto de procesamiento de muestras, en particular para precalentar o preenfriar los reactivos que entran en la cámara de reacción 29.

30 El cartucho microfluídico según la realización de la invención comprende un sustrato 6, una red de flujo de fluido 8 formada dentro del sustrato 6, un sello 10 y una ventana de visualización 12. La red de flujo de fluido 8 comprende una entrada 26 para acoplarse al sistema de flujo de fluido de reactivo en la base del conjunto de procesamiento de muestras 7, una salida 32 para el flujo de salida de reactivos desde la cámara de reacción 29, y una red de canales de entrada 27 y una red de canales de salida 31 conectadas respectivamente a los orificios de entrada de la cámara 28 y los orificios de salida de la cámara 30. La red de flujo de fluido está configurada para proporcionar un flujo sustancialmente uniforme de reactivos a través de la cámara de reacción 29, destinado a garantizar un transporte sustancialmente adveectivo de reactivos hacia la muestra biológica 36 fijada en el soporte tisular 34.

40 El sello 10 está montado en una ranura en un sustrato 6 que rodea la cámara de reacción 29, así como los orificios de entrada y salida de la cámara 28, 30. La cámara de reacción 29 se forma entre el soporte de tejido 34 y la ventana de visualización 12 encerrada por el sello 10 intercalado entre el sustrato 6 y el soporte de tejido 34.

45 El cartucho microfluídico 4 puede comprender ventajosamente además elementos espaciadores 40, por ejemplo, ventajosamente en forma de un borde continuo o una pluralidad de protuberancias discretas dispuestas preferiblemente en un lado exterior del sello 10. Los elementos espaciadores aseguran que la altura de la cámara de reacción 29 se mantenga a una altura constante definida que no depende de la fuerza de compresión en el sello 10 suministrada por el accionador de presión 18. La fuerza del accionador de presión y el mecanismo de sujeción 15 está dispuesta para ser suficiente para comprimir el sello 10 hasta que los elementos espaciadores 40 estén en contacto con el soporte de tejido 34, por lo que el exceso de presión no comprime aún más el sello ni cambia la altura de la cámara de reacción debido a los elementos espaciadores rígidos. Los elementos espaciadores también aseguran ventajosamente que la ventana de visualización 12 permanezca en una relación paralela con el soporte de tejido 34 y no se incline con respecto a este.

55 La ventana de visualización 12 comprende una cubierta transparente 33 que tiene un espesor de menos de 1 mm, preferiblemente menos de 0,5 mm, por ejemplo, alrededor de 0,2 mm (por ejemplo, 0,17 mm). La cubierta transparente 33 puede estar hecha ventajosamente de vidrio o de zafiro. La cubierta transparente 33 puede formarse por separado del sustrato 6 y ensamblarse al mismo mediante unión adhesiva, mediante soldadura o mediante sobremoldeo con un material del sustrato 6. La ventana de visualización 12 comprende un rebaje con respecto a una superficie externa del sustrato 6, configurado para permitir que una lente de un microscopio se inserte parcialmente en dicho rebaje de la ventana de visualización para estar muy cerca de la superficie de la cubierta transparente 33 y de la muestra de tejido debajo de la misma, como se analiza más adelante.

60 El sustrato 6 puede estar formado ventajosamente por un polímero moldeado, por ejemplo, un polímero moldeado por inyección tal como COP, COC, PC, PSU y PEEK que puede ser transparente u opaco.

65 La cubierta transparente delgada 33 y el rebaje de la ventana de visualización 12 permiten que una cara de

5 visualización 41 de una lente de microscopio 14 se coloque a una distancia de la cámara de reacción 29 de menos de 1 mm, en particular de menos de 0,5 mm, de modo que la distancia de la muestra de tejido a la lente de microscopio sea típicamente menor que 1 mm considerando que la altura de la cámara de reacción está en un intervalo de 0,05 a 0,5 mm. La altura de los elementos espaciadores está ventajosamente en un intervalo de 0,05 a 0,3 mm, preferentemente en un intervalo de 0,05 a 0,2 mm, con el fin de tener un flujo óptimo de reactivos a través de la cámara de reacción y el transporte advectivo de reactivos al soporte de tejido.

10 Por lo tanto, se puede utilizar una lente de microscopio de apertura numérica alta para capturar una gran área superficial de la muestra de tejido a través de etapas de formación de imágenes sucesivas, por ejemplo, en un intervalo de 80 mm² a 120 mm², típicamente en un intervalo de 80 mm² a 100 mm², permitiendo así una buena captura de imágenes y análisis de una sección de muestra de tejido que supera los 50 mm². La cubierta transparente muy delgada que puede estar hecha ventajosamente de un material tal como vidrio reduce los artefactos y las aberraciones en la imagen capturada por la lente del microscopio 14 para el análisis de muestras de alto rendimiento.

15 Una pluralidad de conjuntos de procesamiento de muestras montadas en la plataforma de manipulación permite ventajosamente el procesamiento de muestras de tejido con reactivos mientras se realiza simultáneamente la captura de imágenes y el análisis de otras muestras colocadas bajo el microscopio para aumentar la rapidez del análisis de las muestras, especialmente durante la multiplexación.

20 Por ejemplo, cada una de la pluralidad de conjuntos de procesamiento de muestras 7 puede estar en una etapa diferente de un procedimiento múltiplex, en otras palabras, con diferentes reactivos, los conjuntos de procesamiento de muestras se hacen avanzar secuencialmente a la lente del conjunto de formación de imágenes. También se puede realizar la carga y descarga de muestras de tejido 36 en ciertos conjuntos de procesamiento de muestras 7, mientras que otras son analizadas por el conjunto de formación de imágenes 2 o se inyectan reactivos en la cámara de reacción para su posterior análisis.

25 La pluralidad de conjuntos de procesamiento de muestras comprende preferiblemente tres o más conjuntos de procesamiento de muestras, preferiblemente cuatro o más conjuntos de procesamiento de muestras en la plataforma de manejo común 5.

30 Cabe señalar que para el análisis de una muestra de tejido de biopsia, la muestra de tejido de un mismo paciente puede distribuirse en una pluralidad de portaobjetos de tejido colocados en las diversas conjuntos de procesamiento de muestras correspondientes 7 de modo que se puedan realizar diversos reactivos y análisis diferentes en las muestras de tejido simultáneamente. Alternativamente, se pueden realizar los mismos reactivos y análisis para proporcionar una pluralidad de resultados de prueba que se pueden comparar para aumentar la fiabilidad del diagnóstico. Alternativamente, la pluralidad de estaciones de muestra también se puede usar para realizar análisis de diferentes muestras de tejido de un mismo paciente o de diferentes pacientes.

Lista de referencias utilizadas

| | |
|----|---|
| 5 | sistema de procesamiento de muestras biológicas 1 |
| | conjunto de formación de imágenes 2 |
| | microscopio |
| | lente 14 |
| | cara de visión 41 |
| 10 | sistema de procesamiento de imágenes |
| | estación de procesamiento de muestras 3 |
| | plataforma de manipulación 5 |
| | soporte 17 |
| 15 | mecanismo de desplazamiento (no se muestra) |
| | conjunto de procesamiento de muestras 7 |
| | soporte de cartucho microfluídico 9 |
| | (tapa) |
| | ventana de visualización 19 |
| 20 | rebaje biselado 43 |
| | portaobjetos de tejido 11 |
| | base |
| | acoplamiento 13 |
| | bisagra |
| 25 | mecanismo de sujeción 15 |
| | mecanismo de bloqueo 16 |
| | pasador de bloqueo |
| | actuador de presión 18 |
| | pistón |
| 30 | pistón de aire comprimido |
| | sistema de flujo de fluido reactivo |
| | conductos de entrada 20 |
| | conductos de salida 22 |
| 35 | sistema de control de temperatura 24 |
| | sistema de refrigeración / calefacción |
| | chip peltier 41 |
| | sensor de temperatura (no se muestra) |
| 40 | cartucho microfluídico 4 |
| | sustrato 6 |
| | red de flujo de fluido 8 |
| | entrada de cartucho 26 |
| | canales de entrada 27 |
| 45 | orificios de entrada a la cámara 28 |
| | cámara de reacción 29 |
| | orificios de salida de la cámara 30 |
| | canales de salida 31 |
| 50 | salida del cartucho 32 |
| | sello 10 |
| | ventana de visualización 12 |
| | cubierta transparente 33 |
| | capa de vidrio |
| | elementos espaciadores 40 |
| 55 | soporte de ejido 34 |
| | muestra de tejido 36 |
| 60 | fuentes externas de reactivos |
| | tubos de reactivos |
| | Espesor de la cubierta transparente T |

65

REIVINDICACIONES

1. El sistema de procesamiento de muestras biológicas que comprende un conjunto de formación de imágenes (2) que comprende un sistema de procesamiento de imágenes digitales y al menos un microscopio que incluye al menos una lente (14), una estación de procesamiento de muestras (3) que comprende una plataforma de manipulación (5) que incluye un soporte (17), y un conjunto de procesamiento de muestras (7) montado en la plataforma de manipulación (5), comprendiendo el conjunto de procesamiento de muestras (7) un soporte de portaobjetos de tejido (11) para montar sobre el mismo un portaobjetos de tejido (34) con una muestra biológica (36) fijada sobre el mismo y un soporte de cartucho microfluídico (9) para montar un cartucho microfluídico (4) en el mismo, el soporte de portaobjetos de tejido (11) acoplado al soporte de cartucho microfluídico (9) a través de un acoplamiento (13) que permite que el cartucho microfluídico y el portaobjetos de tejido se monten y retiren del conjunto de procesamiento de muestras en una posición abierta y para que el portaobjetos de tejido (34) esté en contacto hermético con el cartucho microfluídico (4) en una posición cerrada, **caracterizado porque** la plataforma de manipulación (5) incluye un mecanismo de desplazamiento para mover el soporte (17) y porque la estación de procesamiento de muestras comprende una pluralidad de dichos conjuntos de procesamiento de muestras montadas en la plataforma de manipulación (5), cada uno de la pluralidad de conjuntos de procesamiento de muestras es móvil al mover el soporte mediante el mecanismo de desplazamiento desde una posición que permite el montaje del portaobjetos de tejido, respectivamente el cartucho microfluídico, o la extracción del mismo, a una posición donde una ventana de visualización (19) en el soporte del cartucho microfluídico (9) está colocada en alineación con la lente de dicho al menos un microscopio, donde cada conjunto de procesamiento de muestras (7) está acoplada a al menos un tubo de suministro de reactivo y al menos un tubo de salida de reactivo.
2. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según la reivindicación anterior, donde la ventana de visualización del soporte del cartucho microfluídico (19) comprende un rebaje (43) dentro del cual la lente (14) se inserta parcialmente en la posición de formación de imágenes.
3. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la estación de procesamiento de muestras (3) comprende al menos tres, preferentemente cuatro o más conjuntos de procesamiento de muestras (7).
4. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la plataforma de manipulación (5) comprende un mecanismo de desplazamiento giratorio para girar el soporte (17) entre posiciones.
5. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada conjunto de procesamiento de muestras comprende un mecanismo de sujeción (15) que incluye un mecanismo de bloqueo (16) y un accionador de presión (18) configurado para aplicar presión sobre el soporte de tejido (34) contra el cartucho microfluídico (5) en una posición cerrada, donde el mecanismo de sujeción comprende un pistón de gas comprimido.
6. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde cada conjunto de procesamiento de muestras comprende un sistema de control de temperatura que incluye un sistema de enfriamiento y calentamiento acoplado al portaobjetos de tejido (11).
7. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el soporte del cartucho microfluídico (9) y el soporte del tejido (11) están acoplados entre sí de forma giratoria a través de un acoplamiento de bisagra (13).
8. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el soporte de cartucho microfluídico está en forma de una tapa móvil y el soporte portaobjetos de tejido (11) en forma de una base estáticamente fija al soporte (17) de una plataforma de manipulación (5).
9. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquier reivindicación anterior, donde cada una de la pluralidad de conjuntos de procesamiento de muestras incluye el cartucho microfluídico montado en el soporte del cartucho microfluídico, donde cada cartucho microfluídico comprende un sustrato (6), una red de flujo de fluidos (8) formada dentro del sustrato (6), un sello (10) montado en el sustrato, una cavidad (29a) de una cámara de reacción (29) formada en el sustrato y una ventana de visualización (12), donde el cartucho microfluídico está configurado para colocarse contra el soporte de tejido (34), para cubrir dicha cavidad y constituir un lado de la cámara de reacción (29), estando formada la cámara de reacción entre el soporte de tejido y el cartucho microfluídico, comprendiendo la red de flujo de fluido una entrada (26), una red de canales de entrada (27) y una pluralidad de orificios de entrada de cámara (28), y comprendiendo la red de flujo de fluido además una salida (32), una red de canales de salida (31) y una pluralidad de orificios de salida de cámara (30), estando dispuestos los orificios de entrada de cámara y los orificios de salida de cámara en lados opuestos de la cavidad de la cámara de reacción para el flujo de reactivos a través de la cámara de reacción, rodeando el sello (10) la cavidad de la cámara de reacción (29) y los orificios de entrada y salida de la cámara (28, 30), donde la ventana de visualización (12) comprende una cubierta transparente de menos de 1 mm de espesor y que tiene una superficie externa dentro de un rebaje formado en el

sustrato de la ventana de visualización (12) con respecto a una superficie externa del sustrato (6), configurada para permitir que una lente (14) de un microscopio se inserte parcialmente en dicho rebaje de la ventana de visualización.

5 10. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según la reivindicación 9, donde la cubierta transparente (33) está fabricada de vidrio o zafiro.

10 11. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, donde la cubierta transparente tiene un espesor de menos de 0,5 mm, preferentemente de menos de 0,3 mm de espesor.

12. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, que comprende además elementos espaciadores que definen una altura de la cámara de reacción (29) cuando se coloca un soporte de tejido (34) y se presiona contra el mismo.

15 13. El sistema de procesamiento de muestras biológicas según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, donde los elementos espaciadores están dispuestos en un lado exterior del sello con respecto a la cámara de reacción.

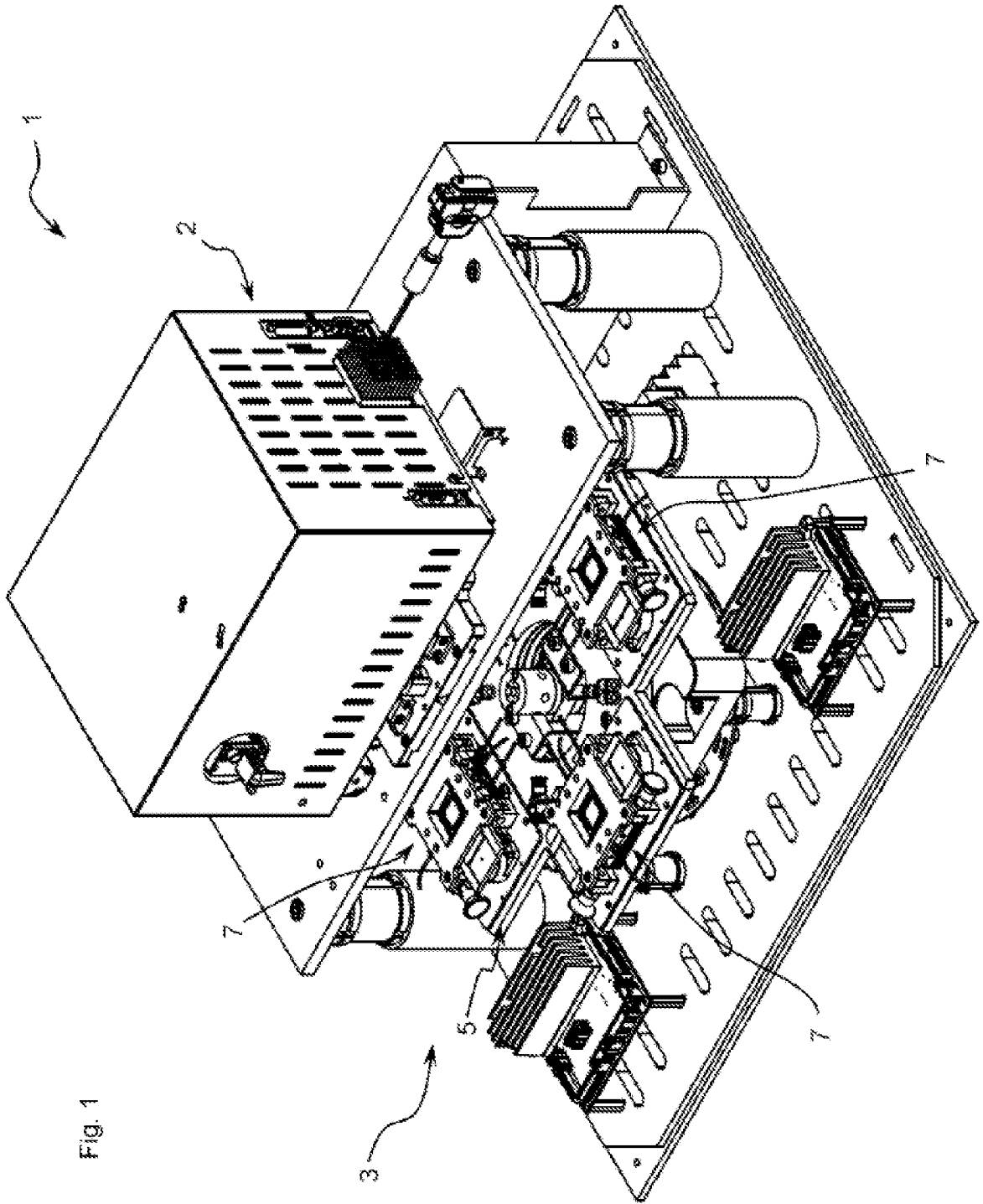


Fig. 1

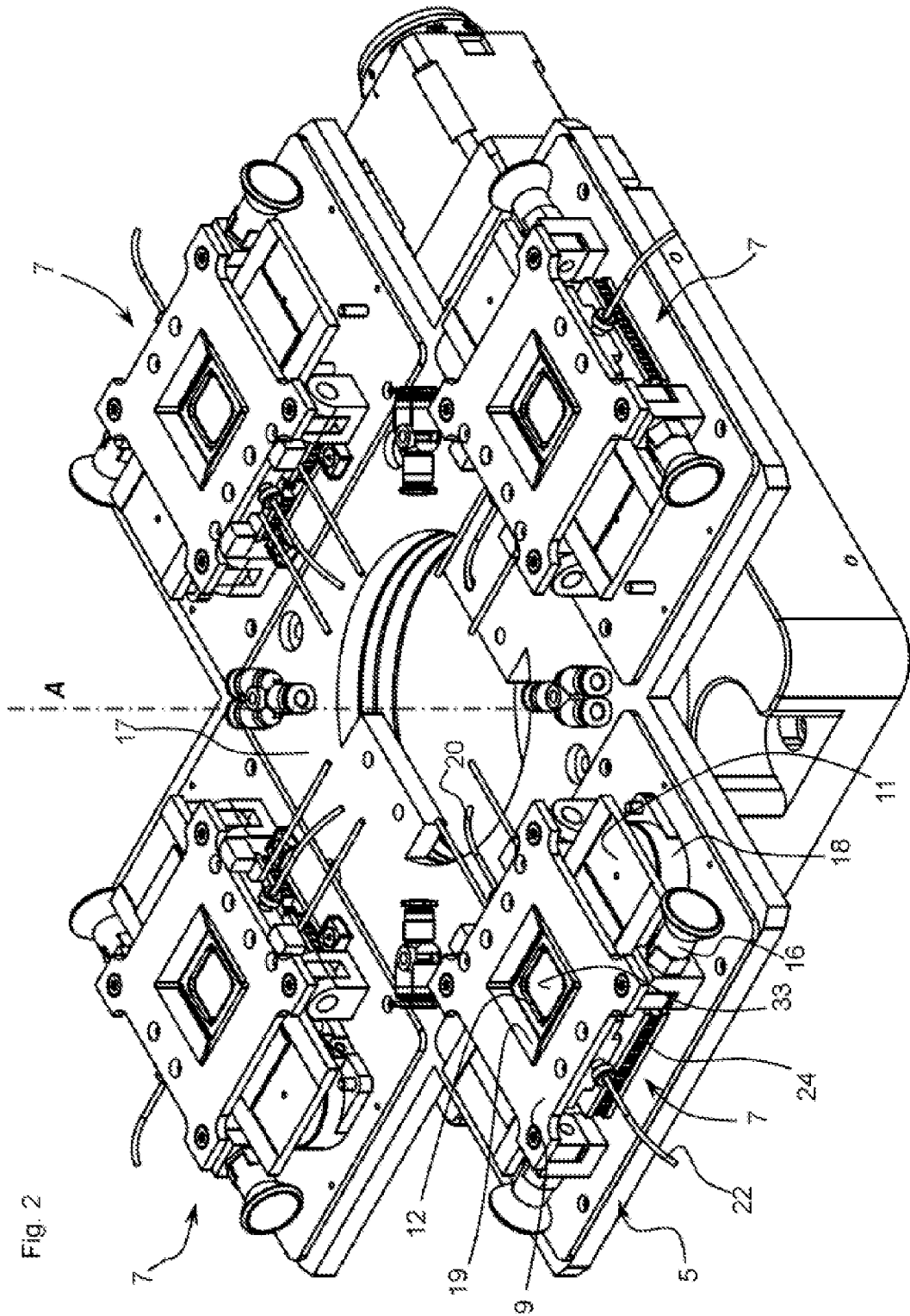


Fig. 2

Fig. 3a

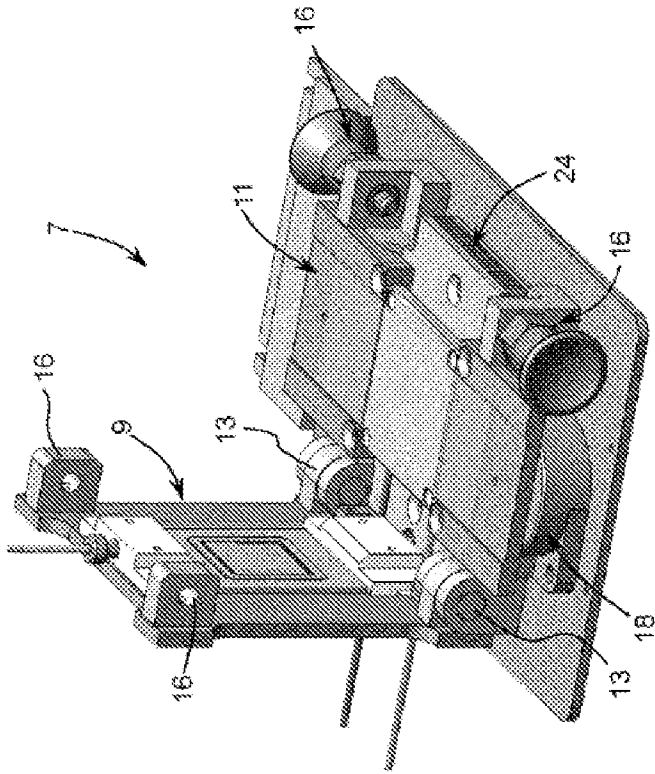
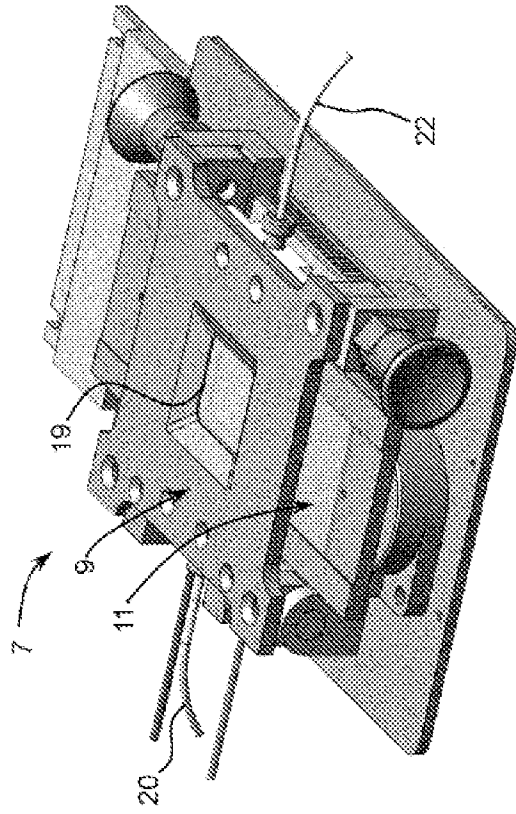
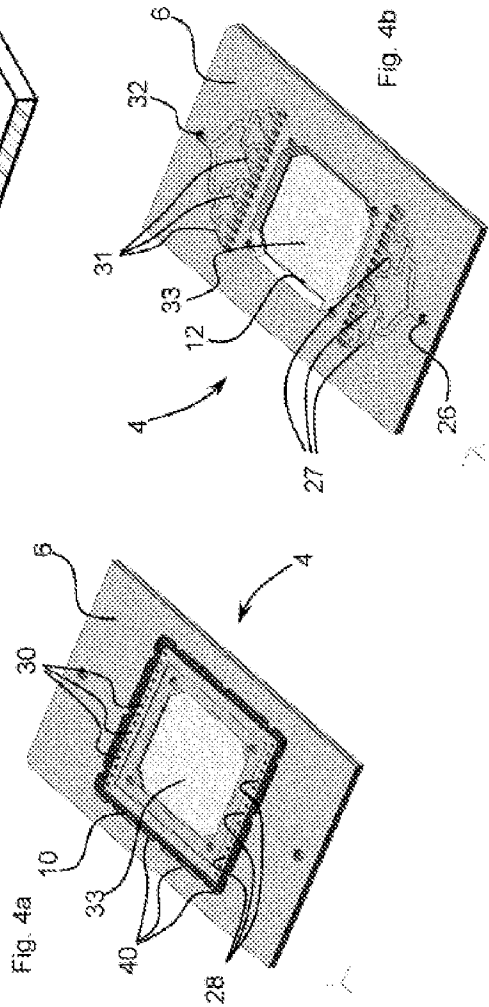
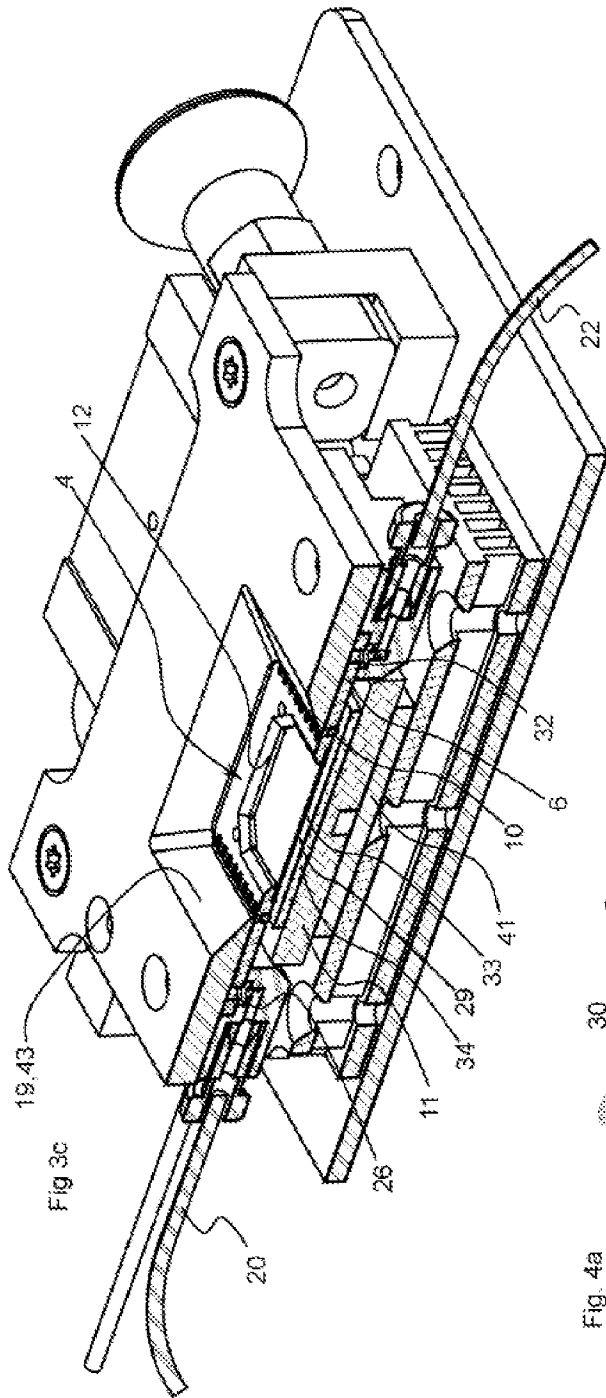


Fig. 3b





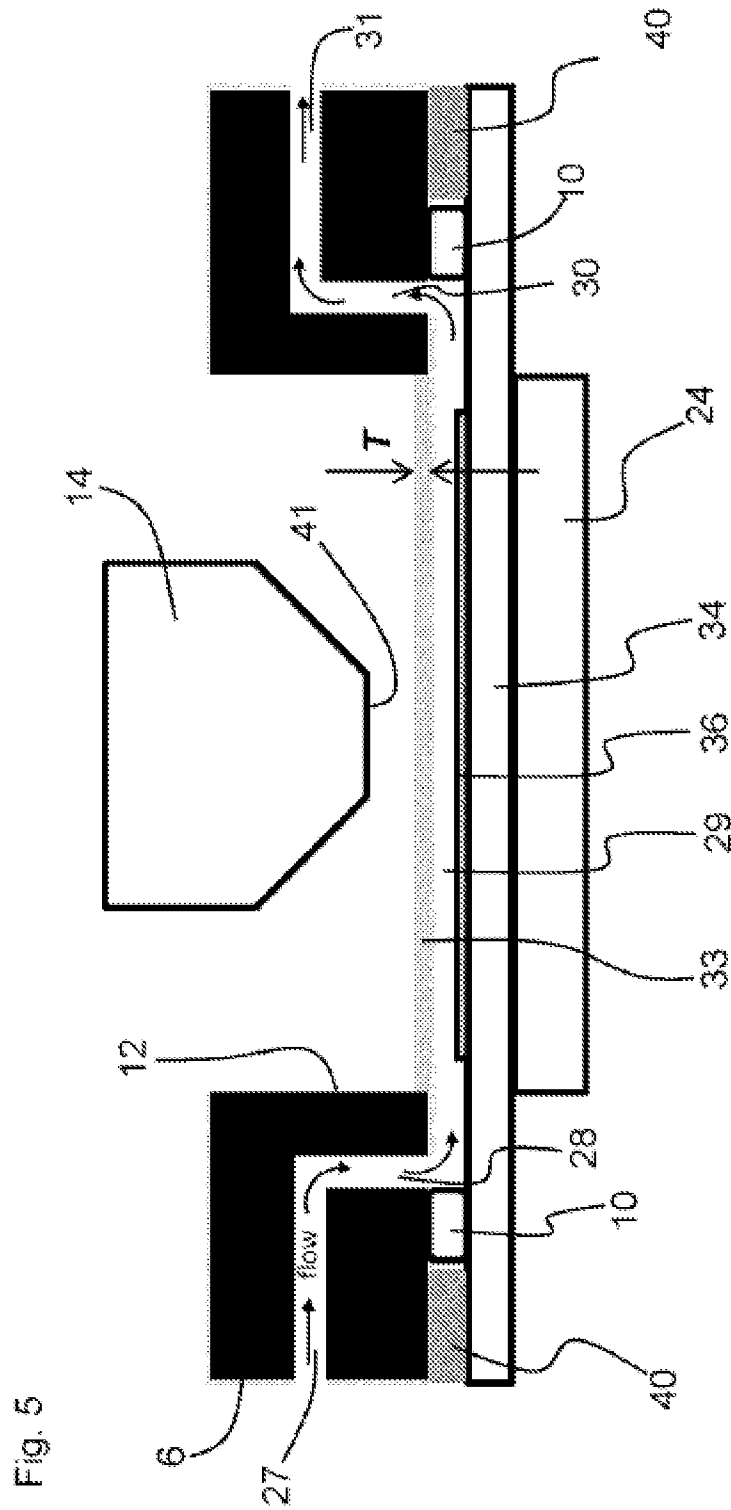


Fig. 5