

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 885 681**

51 Int. Cl.:

C12M 1/24 (2006.01)

C12M 1/34 (2006.01)

G01N 35/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2014 PCT/US2014/059132**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015 WO15051295**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014 E 14851065 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.06.2021 EP 3052609**

54 Título: **Conjunto para formar una microcámara para un sustrato invertido**

30 Prioridad:

04.10.2013 US 201361887066 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
15.12.2021

73 Titular/es:

**BIOGENEX LABORATORIES, INC. (100.0%)
4600 Norris Canyon Road
San Ramon, CA 94583, US**

72 Inventor/es:

KALRA, KRISHAN, L.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 885 681 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

Conjunto para formar una microcámara para un sustrato invertido

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 El campo se refiere a las microcámaras para el análisis de muestras y, en particular, a un conjunto para formar una microcámara para un sustrato invertido.

Descripción de la técnica relacionada

15 Las muestras de tejido a menudo se analizan al hacer reaccionar un reactivo químico con la muestra de tejido y luego analizar las reacciones resultantes para varias características de identificación. Por ejemplo, en algunas disposiciones, se coloca una muestra de tejido en un portaobjetos de vidrio y se suministra un reactivo químico sobre la muestra de tejido y el portaobjetos. En otras disposiciones, el cubreobjetos se usa a menudo para proteger los reactivos de la evaporación en los instrumentos de tinción de tejidos. El cubreobjetos puede tener muchas formas diferentes, como un cubreobjetos de vidrio, un cubreobjetos de aceite o líquido, o un cubreobjetos de gel que formará una capa sobre el reactivo para evitar la evaporación durante las incubaciones prolongadas o durante el tratamiento a alta temperatura en dependencia del protocolo de tinción.

20 La publicación de patente de Estados Unidos núm. US 2005/0270642 describe una tapa de portaobjetos de microscopio con depósito integrado. La tapa incluye un cuerpo que define una cavidad, para colocar sobre el sustrato para formar una cámara de reacción, y una proyección que se extiende desde el cuerpo para definir un depósito de fluido. Cuando la tapa se ajusta al sustrato, el depósito de fluido está en comunicación de fluidos con la cavidad.

25 La publicación de patente de Estados Unidos núm. US 2012/0201723 describe el intercambio de fluidos en una cámara en un portaobjetos de microscopio. Una cámara de muestra está formada por una carcasa sellada contra un portaobjetos de microscopio.

30 La carcasa tiene puertos de fluido, que incluyen un pocillo formado sobre al menos un puerto. El reactivo puede introducirse en la cámara a través de la alícuota de reactivo y liberar el reactivo para que sea extraído al interior de la cámara mediante vacío.

35 La publicación de patente internacional WO 2013/071352 describe un miembro de tapa, un método y un módulo de tratamiento para tratar una muestra biológica sobre un sustrato. El miembro de tapa puede colocarse sobre una muestra sobre un sustrato y comprende una entrada y una salida en una superficie del miembro de tapa opuesta al sustrato.

40 Resumen

45 En un primer aspecto, existe un conjunto para analizar una muestra de un sustrato, de acuerdo con la reivindicación 1. En un segundo aspecto, existe un método de análisis de una muestra, de acuerdo con la reivindicación 16.

50 En un ejemplo ilustrativo, se describe un conjunto para analizar una muestra sobre un sustrato. El conjunto puede incluir un cuerpo que tenga una cámara formada en el mismo. El conjunto también puede incluir una cavidad de dispensación para suministrar un reactivo a la cámara. Se puede configurar una estructura de soporte de sustrato para soportar el sustrato de manera que una superficie del sustrato al que se va a acoplar la muestra se oriente hacia la cámara cuando el sustrato se monta en la estructura de soporte del sustrato. La cámara y la estructura de soporte del sustrato se pueden dimensionar de manera que, cuando se suministre el reactivo a la cavidad de dispensación, el reactivo sea extraído al interior de la cámara por medio de fuerzas capilares que actúan sobre el reactivo.

55 En un ejemplo ilustrativo adicional, se describe un método para analizar una muestra. El método puede incluir acoplar la muestra a un sustrato. El método puede incluir montar el sustrato en una estructura de soporte del sustrato sobre una cámara formada en la estructura de soporte del sustrato de manera que la muestra se oriente hacia la cámara. El método puede incluir dispensar un reactivo entre el piso de la cámara y el sustrato para reaccionar con la muestra.

60 En aún otro ejemplo ilustrativo, se describe un conjunto para analizar una muestra sobre un sustrato. El conjunto puede incluir un cuerpo que tenga una cámara formada en el mismo. Una cavidad de dispensación puede suministrar un reactivo a la cámara. Se puede configurar una estructura de soporte de sustrato para soportar el sustrato de manera que una superficie del sustrato al que se va a acoplar la muestra se oriente hacia la cámara cuando el sustrato se monta en la estructura de soporte del sustrato. Se puede configurar un mecanismo de elevación para subir o bajar el sustrato con relación a la cámara de manera que, cuando el sustrato se eleva con respecto a la cámara, el reactivo fluya hacia el interior de la cámara.

65

Con el propósito de resumir la invención y las ventajas logradas sobre la técnica anterior, se han descrito anteriormente en la presente descripción ciertos objetos y ventajas de la descripción. Por supuesto, debe entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas pueden lograrse de acuerdo con cualquier modalidad particular. Así, por ejemplo, los expertos en la técnica reconocerán que la invención puede llevarse a la práctica o realizarse de una manera que logre u optimice una ventaja o grupo de ventajas como se enseña o sugiere en la presente descripción, sin lograr necesariamente otros objetivos o ventajas como se enseña o sugiere en la presente descripción.

Breve descripción de los dibujos

Estos aspectos y otros serán evidentes a partir de la siguiente descripción de modalidades preferidas y los dibujos adjuntos, que pretenden ilustrar y no limitar la invención, en donde:

La Figura 1 es una vista en sección transversal lateral esquemática de un flujo de fluido a lo largo de una pared límite antideslizante, que puede ser similar al flujo de fluido entre el piso de la microcámara y el portaobjetos invertido.

La Figura 2 es una vista esquemática en sección transversal lateral del flujo de fluido entre dos superficies que compara el flujo laminar con el flujo turbulento.

La Figura 3 es una vista esquemática en perspectiva de un conjunto para formar una microcámara para un sustrato invertido o portaobjetos.

La Figura 4 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto que incluye un mecanismo de calentamiento.

La Figura 5 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto que incluye un portaobjetos de vidrio montado sobre la microcámara en una orientación invertida.

La Figura 6 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto sin el portaobjetos.

La Figura 7 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto en el que se usa un dispositivo de suministro de reactivo para dispensar un reactivo en la cavidad de dispensación de reactivo.

La Figura 8 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto que muestra el reactivo que se esparce entre el portaobjetos y el piso de la microcámara por medio de la acción capilar.

La Figura 9 es una vista esquemática en perspectiva que muestra la cavidad de dispensación colocada a lo largo de un extremo lateral del conjunto.

Las Figuras 10-14 son vistas esquemáticas en perspectiva de diversas modalidades del conjunto, que se pueden fabricar de manera modular para tener una variedad de tamaños de microcámaras y características de dispensación.

La Figura 15 ilustra el conjunto con un conjunto superior desmontable que se puede unir y separar de la base del conjunto de calentamiento.

La Figura 16 es una vista esquemática en perspectiva de una modalidad del conjunto en el que se forma la microcámara mediante el uso de un proceso de grabado.

La Figura 17 es una vista esquemática en perspectiva de una modalidad del conjunto en el que se forma la microcámara mediante el uso de un proceso de micromecanizado.

La Figura 18 es una imagen de una modalidad del conjunto que incluye un revestimiento antiadherente aplicado al menos sobre el piso de la microcámara.

La Figura 19 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto, de acuerdo con diversas modalidades.

Descripción detallada

Varias modalidades descritas en la presente descripción se refieren a una microcámara (tal como una microcámara formada sobre o cerca de un portaobjetos u otro sustrato) que no usa o requiere cubreobjetos, tal como durante una incubación prolongada o un tratamiento a alta temperatura de un tejido en inmunohistoquímica. Esta microcámara puede usarse, por ejemplo, para teñir un tejido sin un vidrio, líquido o cualquier otro cubreobjetos. En varias modalidades, un sustrato, tal como un portaobjetos de microscopio, con tejido montado en el mismo, puede actuar él mismo como un protector de evaporación y dar tinción reproducible de una muestra de tejido. Por ejemplo, varias modalidades incluyen un mecanismo de sustrato invertido para formar una microcámara en un sistema para analizar una muestra (por ejemplo, una muestra de tejido) sobre un sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio). Las modalidades descritas pueden incluir un sistema para medir diversas propiedades de una muestra dispuesta en una microcámara.

En algunas modalidades, se puede colocar una muestra, tal como tejido u otro tipo de material biológico, sobre un sustrato. El sustrato se puede invertir con relación a la cámara de manera que la muestra de tejido se oriente hacia la cámara y la muestra de tejido se disponga entre el portaobjetos y la microcámara. Por lo tanto, en algunas modalidades, la microcámara puede disponerse entre el sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) y el soporte de portaobjetos (por ejemplo, una superficie inferior o piso de la microcámara). En algunas modalidades, la microcámara se puede colocar sobre un calentador, de manera que se forme una microcámara entre el sustrato y el calentador, y la muestra se ubique dentro de la microcámara. En algunas modalidades, una parte del soporte del sustrato interviene entre la microcámara y el calentador. Se pueden dispensar uno o más reactivos en la microcámara, por ejemplo, de manera secuencial y/o simultánea. Otros procedimientos de tratamiento (tal como fototratamientos u otros tipos de tratamientos) pueden usarse con la cámara descrita en la presente descripción. El reactivo y la muestra a analizar se pueden calentar, por ejemplo, mediante el uso de un calentador de ciclos térmicos, tal como un calentador de enfriador termoeléctrico (TEC). Pueden usarse varias técnicas de análisis ópticas, químicas u otras para analizar la muestra antes, durante y/o después del calentamiento.

Por lo tanto, en diversas modalidades descritas en la presente descripción, la microcámara descrita puede usarse para teñir o tratar de cualquier otra manera la muestra de tejido sin usar un portaobjetos de vidrio, un cubreobjetos líquido o cualquier otro tipo de cubreobjetos. En las modalidades descritas, el portaobjetos en sí mismo puede actuar como un protector de evaporación y puede proporcionar la tinción reproducible de muestras de tejido.

En algunas modalidades, el efecto capilar puede usarse para extraer un reactivo en la microcámara entre un piso de la microcámara y el portaobjetos (que puede estar invertido con respecto a la microcámara). Por ejemplo, el portaobjetos puede formar una parte superior de la microcámara de manera que la superficie a la que se adhiera la muestra de tejido (y, de hecho, el tejido en sí) se oriente hacia la microcámara y el piso de la misma. Los expertos entenderán que puede haber diferentes perfiles de velocidad para un fluido que fluye en un conducto, con la velocidad máxima que ocurre en o cerca del centro del conducto. Un límite antideslizante en la interfaz entre el fluido y la pared del conducto puede crear una resistencia que se oponga al movimiento del fluido. La tensión superficial puede tener un efecto significativo en el flujo de líquido en espacios delimitados (tal como un microconducto o el espacio entre un portaobjetos y la superficie inferior de una microcámara) ya que típicamente se aplica presión adicional para superar la tensión superficial del fluido, que se vuelve más dominante en el flujo a microescala.

La tensión superficial también da lugar a otro fenómeno, llamado efecto capilar, en el que la adhesión del líquido a las paredes del conducto es lo suficientemente fuerte como para extraer líquido entre las paredes. La Figura 1 es una vista esquemática en sección transversal lateral de un flujo de fluido a lo largo de una pared límite antideslizante, que puede ser similar al flujo de fluido entre el piso de la microcámara y el portaobjetos invertido. Debido al efecto capilar y la densidad del líquido, la microcámara puede provocar o permitir un flujo laminar del líquido dentro de la cámara, lo que puede distribuir eficazmente el reactivo por toda el área superficial del tejido. Debido al flujo laminar, el esparcimiento del reactivo puede ser uniforme y unidireccional debido a la manera en que se dispensa el reactivo en la microcámara.

La Figura 2 es una vista en sección transversal lateral esquemática del flujo de fluido entre dos superficies que compara el flujo laminar 102 con el flujo turbulento 103. El flujo laminar 102 ocurre cuando se usan superficies lisas (por ejemplo, entre el tejido en un portaobjetos de vidrio en la parte superior y un piso de microcámara maquinado o grabado en la parte inferior) y con regímenes de flujo relativamente bajos (microrreactivos que pueden tener un volumen inferior a 100 μ l). El flujo en la microcámara entre el piso y el sustrato (por ejemplo, un portaobjetos de vidrio) puede simplificarse y puede haber poca o ninguna turbulencia 103. El flujo puede ocurrir en capas paralelas, con una interrupción mínima entre estas capas. La velocidad del flujo puede ser mayor en el centro y disminuir hacia la periferia o límite. Esto puede provocar que el flujo laminar 102 defina un perfil de velocidad en forma de bala. Debido al flujo laminar 102 de reactivo en la microcámara, la tinción puede producir resultados más precisos, repetibles y reproducibles.

La Figura 3 es una vista esquemática en perspectiva de un conjunto 101 para formar una microcámara 1 para un sustrato invertido o portaobjetos. El portaobjetos o el sustrato no se ilustran en la Figura 3 para facilitar la ilustración. La microcámara 1 puede formarse en un cuerpo 200 y puede tener un piso en la superficie inferior de la microcámara y una pluralidad de paredes que se extienden hacia arriba desde el piso. La microcámara 1 puede cubrirse con el sustrato o el portaobjetos (no se muestra en la Figura 3). La microcámara 1 se puede construir de tal manera que pueda usar menos de aproximadamente 100 μ l para que pueda realizar cualquier tipo de procesos histológicos en portaobjetos, tal como inmunohistoquímica (IHC), hibridación in situ (ISH), hibridación cromogénica in situ (CISH), hibridación fluorescente in situ (FISH), etc. Dimensionalmente, la microcámara 1 se puede construir con unas dimensiones de aproximadamente 25 mm x 60 mm, que pueden contener o retener aproximadamente 80 μ l. En algunas modalidades, la microcámara 1 puede dimensionarse para contener un volumen de reactivo en un intervalo de aproximadamente 60 μ l a aproximadamente 95 μ l. Sin embargo, los expertos apreciarán que las dimensiones y el volumen pueden ser menores o mayores que estas dimensiones. En algunas modalidades, el grosor o profundidad de la microcámara 1 puede estar en un intervalo de aproximadamente 40 micras a aproximadamente 85 micras, por ejemplo, aproximadamente 70 micras en una modalidad. En algunas modalidades, el grosor o profundidad de la microcámara 1 puede estar en un rango de aproximadamente 40 micras a aproximadamente 150 micras. La

microcámara 1 se puede fabricar de cualquier material adecuado, que incluye, por ejemplo, aluminio y/o acero inoxidable (grado médico) con una capa de revestimiento no contaminante.

En la Figura 3, la cámara 1 tiene un ancho de aproximadamente 25 mm y una longitud de aproximadamente 60 mm, que puede acomodar reactivos químicos en un rango de aproximadamente 15 µl a aproximadamente 200 µl, en un rango de aproximadamente 60 µl a aproximadamente 95 µl, en un intervalo de aproximadamente 70 µl a aproximadamente 90 µl, en un intervalo de aproximadamente 75 µl a aproximadamente 85 µl, por ejemplo, menos de o igual a aproximadamente 80 µl de microrreactivo en cada modalidad descrita en la presente descripción. En términos dimensionales, el ancho, la longitud y el grosor o la profundidad de la cámara se pueden aumentar y/o disminuir para adaptarse a cualquier volumen adecuado de reactivo.

La microcámara 1 puede tener una capa de protección contra la contaminación, que puede tener menos de aproximadamente 10 micras de grosor, o en un intervalo de aproximadamente 1 micra a aproximadamente 10 micras, que comprende un material química y térmicamente resistente. La capa de protección contra la contaminación puede proporcionar una vida útil más larga para la microcámara y puede evitar resultados inexactos debido a la contaminación cruzada de reactivos o tejidos. Esta capa de no contaminación puede evitar que los reactivos se contaminen de forma cruzada debido a sus propiedades antiadherentes.

Como se muestra en la Figura 3, el conjunto 103 puede comprender una pasarela de evacuación 4 que puede evacuar materiales no deseados, solución de lavado y otros líquidos residuales, que pueden obstruir el flujo laminar de reactivo en la cámara. El conjunto 101 también puede comprender una puerta de burbujas 3. La puerta de burbujas 3 puede evacuar las burbujas creadas debido a la dispensación del reactivo. Por ejemplo, la puerta de burbujas 3 puede permitir que las burbujas salgan del aparato 101 a través de la pasarela de evacuación 4. El conjunto 101 y la microcámara 1 se pueden construir de tal manera que cuando el reactivo se dispensa en una cavidad de dispensación de reactivo 2 (que puede comprender un puerto o abertura), el reactivo puede fluir en un perfil laminar a través de la microcámara 1 en lugar de en un perfil turbulento, que de cualquier otra manera puede crear burbujas y/o formaciones no deseadas o ruido que provoque una dispersión desigual del reactivo.

La Figura 4 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 que incluye un mecanismo de calentamiento; en algunas modalidades, el conjunto 101 incluye un mecanismo de enfriamiento, que puede ser el mismo o diferente del mecanismo de calentamiento. La temperatura de la microcámara 1 se puede controlar con calentamiento y enfriamiento independientes con el mecanismo de calentamiento. El mecanismo de calentamiento puede incluir un módulo de ciclo térmico 6 configurado para calentar y/o enfriar de manera controlable la microcámara 1. El mecanismo de calentamiento puede incluir además una base 7a y un dissipador de calor (que puede incluir aletas de dissipador de calor 7b) para conducir el calor lejos del conjunto 101. Como se muestra en la Figura 4, el mecanismo de calentamiento se puede montar en una superficie trasera del cuerpo 200, por ejemplo, opuesta a la abertura definida por la microcámara 1.

La Figura 5 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 que incluye un sustrato, aquí un portaobjetos de vidrio 8 montado sobre la microcámara 1 en una orientación invertida. Por ejemplo, en la Figura 5, la muestra de tejido u otro elemento a analizar se puede acoplar o aplicar sobre la superficie del portaobjetos 8 que se orienta hacia la microcámara 1, de manera que la muestra de tejido se disponga entre el portaobjetos 8 o sustrato y la microcámara 1. El conjunto 101 puede incluir una estructura de soporte del sustrato 205 configurada para soportar el portaobjetos de manera que la muestra de tejido se oriente hacia la microcámara 1 cuando el portaobjetos 8 está montado en la estructura de soporte del sustrato 205. La cámara 1 y la estructura de soporte del sustrato 205 se pueden dimensionar de manera que, cuando se suministre el reactivo a la cavidad de dispensación 2, el reactivo sea extraído a la cámara 1 por medio de fuerzas capilares que actúan sobre el reactivo. La Figura 6 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 sin el portaobjetos 8. El portaobjetos 8 puede incluir una muestra de tejido en un lado del portaobjetos 8 que se orienta hacia la microcámara 1. Por ejemplo, el portaobjetos 8 puede colocarse sobre la microcámara 1 de manera que la muestra de tejido se oriente hacia el piso o la parte inferior de la microcámara 1. Puede usarse una palanca de sujeción del portaobjetos 9 para guiar el portaobjetos 8 sobre la microcámara 1. Como se explica en la presente descripción, el portaobjetos 8 se puede colocar en una posición invertida para procesar la muestra cuando el reactivo entra en la microcámara 1. Durante la tinción u otro procesamiento, el tejido puede orientarse hacia la microcámara 1 como se muestra en la Figura 5. Para evitar el desacoplamiento del portaobjetos 8, el portaobjetos 8 se puede bloquear con un clip del portaobjetos 11 y con un tope de guía del portaobjetos 5. Como se muestra en la Figura 6, por ejemplo, una lengüeta de soporte 12 puede soportar el extremo del portaobjetos 8 cerca del tope de guía del portaobjetos 5. El clip del portaobjetos 11 puede permitir al usuario cargar el portaobjetos 8 y sujetar portaobjetos 8 en su posición. El tope 5 puede evitar que el portaobjetos 8 se levante del cuerpo 200 más que la altura deseada durante la eliminación de residuos. La lengüeta de soporte 12 puede apoyarse contra el portaobjetos 8 con una fuerza opuesta dirigida hacia la microcámara 1 para asegurar que el portaobjetos 8 descansa sobre el cuerpo 200 sobre la microcámara 1 sin espacios de aire. Además, se pueden proporcionar uno o más ganchos o proyecciones 26 en una porción de extremo de la estructura de soporte del sustrato 205 para ayudar a asegurar el portaobjetos 8 a la estructura de soporte del sustrato 205. En algunas modalidades, puede usarse un adhesivo para adherir el portaobjetos 8 o sustrato a la superficie superior del cuerpo 200, por ejemplo, alrededor de los bordes superiores de la cámara 1.

Como se muestra en la Figura 5, la estructura de soporte del sustrato 205 puede incluir un mecanismo deslizante 30 configurado para acoplarse de manera deslizante con el cuerpo 200. Por ejemplo, un usuario puede insertar un portaobjetos 8 en el mecanismo deslizante 30 y puede deslizar o trasladar el mecanismo deslizante hacia la cavidad de dispensación 2 para colocar el portaobjetos 8 u otro sustrato sobre la cámara 1. En algunas modalidades, la estructura de soporte del sustrato 205 también puede comprender un mecanismo giratorio 29 configurado para hacer girar o rotar con relación al cuerpo 200 y la cámara 1. Por ejemplo, en algunas disposiciones, el mecanismo giratorio 29 puede usarse para colocar el portaobjetos 8 sobre la cámara 1. En algunas disposiciones, el mecanismo giratorio 29 puede usarse para levantar el portaobjetos 8 con relación a la cámara 1, de manera que el reactivo pueda distribuirse de manera fácil y/o uniforme por la cámara 1.

Cuando el portaobjetos 8 se coloca sobre la cámara 1, el portaobjetos 8 y el piso de la microcámara 1 pueden crear un canal capilar que hace que un reactivo fluya hacia la microcámara por medio de fuerzas capilares, lo que puede causar un volumen de flujo en el orden de microlitros. Como se explica en la presente descripción, el piso de la microcámara 1 puede comprender la superficie inferior de la cámara 1 y puede comprender una superficie micromecanizada, grabada u otra. En algunas modalidades, el piso o la superficie inferior de la cámara 1 puede comprender un material transparente, mientras que en otras modalidades, el piso o la superficie inferior de la cámara 1 puede comprender un material opaco o translúcido. El piso o la superficie inferior de la microcámara 1 puede ser parte del conjunto 101 y no un cubreobjetos separado. Cuando un reactivo líquido pasa a través de la cavidad de dispensación de reactivo 2, el reactivo puede fluir en un perfil laminar y el reactivo puede extenderse sobre el tejido de manera uniforme. Además, cualquier burbuja de aire se puede evacuar a través de la compuerta de burbujas 3 que se muestra en la Figura 3.

La Figura 7 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 en el que se usa un dispositivo de suministro de reactivo 13 para dispensar un reactivo 14 en la cavidad de dispensación de reactivo 2. La Figura 8 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 que muestra el reactivo 14 que se esparce entre el portaobjetos 8 y el piso de la microcámara 1 por medio de acción capilar. Como se muestra en la Figura 7, un usuario puede insertar el extremo distal del dispositivo 13 en una abertura de la cavidad 2 y puede dispensar el reactivo 14 en la cavidad 2. El reactivo 14 puede introducirse en la microcámara 1 por medio de acción capilar. Una vez que se dispensa el reactivo 14, el tejido sobre el portaobjetos 8 puede sumergirse directamente en el reactivo 14 con la temperatura deseada para la reacción. Esto puede mejorar la velocidad de reacción ya que el tratamiento térmico durante la reacción se aplica directamente sobre el tejido y el reactivo.

Mediante el uso de la microcámara 1 descrita puede usarse ventajosamente para acelerar las reacciones en todas las direcciones, por ejemplo, al calentar la microcámara 1, etc. En algunos procedimientos de tinción de tejidos, por ejemplo, el portaobjetos de vidrio 8 con tejido se puede colocar en el conjunto de calentamiento para incubar y se puede tratar con temperatura según el protocolo deseado. En estos otros tipos de procesos, primero se puede transferir calor al portaobjetos de vidrio con el propósito de alcanzar la muestra de tejido y el reactivo. Ventajosamente, en las modalidades descritas, el microrreactivo 14 se puede calentar y el calor se puede transferir posteriormente al tejido, lo que puede mejorar la eficiencia de la reacción química. El conjunto 101 y la microcámara 1 descritos también pueden prevenir o reducir la evaporación de los reactivos.

El volumen de la microcámara 1 y los patrones de dispensación se pueden cambiar de acuerdo con el uso deseado. Por ejemplo, se puede dispensar reactivo a través de la cavidad de dispensación 2 en un extremo superior del conjunto 101 a lo largo de una dimensión estrecha del conjunto 101 como se muestra en las Figuras 2-8. En otras modalidades, la cavidad de dispensación 2 puede colocarse cerca del centro de un extremo lateral del conjunto. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 9, la cavidad de dispensación 2 puede colocarse a lo largo del extremo lateral del conjunto 101 que se extiende a lo largo de una dirección longitudinal, por ejemplo, una dimensión más ancha del conjunto 101.

La microcámara 1 y el conjunto 101 se pueden configurar de manera que el conjunto 101 sea suficientemente flexible para adaptarse a varios volúmenes deseados y clones realizados en los portaobjetos. Los tejidos se pueden procesar con un volumen muy pequeño de reactivos (del orden de microlitros). La microcámara 1 se puede reemplazar con una construcción modular que tiene un mecanismo de ciclo térmico 6 y otros mecanismos, tal como el tope de guía del portaobjetos 5, etc. Las Figuras 10-14 son vistas esquemáticas en perspectiva del conjunto 101 que se puede fabricar de manera modular para tener una variedad de tamaños de microcámara 1 y características de dispensación.

Por ejemplo, como se muestra en las Figuras 10-14, pueden usarse varios tamaños de microcámaras 1 de acuerdo con los parámetros deseados por el usuario. Por ejemplo, la microcámara 1 de la Figura 30 es más pequeña que la microcámara mostrada en las Figuras 13-14. La pasarela de evacuación 4 también puede tener diferentes tamaños, por ejemplo, más grande en la Figura 10 y más pequeña en la Figura 14. La estructura de la microcámara 1 puede ser un componente modular que puede ser una parte reemplazable del conjunto 101. Por ejemplo, el usuario puede reemplazar la microcámara 1 con diferentes patrones y/o tamaños sin la ayuda de ninguna herramienta. Por lo tanto, la modularidad del conjunto 101 puede permitir al usuario crear cualquier microcámara 1 y patrón de dispensación adecuados.

Además, como se muestra en las Figuras 11-12 y 14, el conjunto 101 puede incluir un canal de distribución 15 que conecta de manera fluida la cavidad de dispensación 2 y la microcámara 1. El reactivo se puede dispensar en la

cavidad de dispensación 2. Como se explicó anteriormente, las fuerzas capilares cn tiran del reactivo desde la cavidad de dispensación 2 a través del canal de dispensación 15 y dentro de la microcámara 1. Como se muestra en las Figuras 11-12 y 14, el canal de dispensación 15 puede tener varias longitudes para acomodar los tamaños correspondientes de la microcámara 1 y/o la pasarela de evacuación 4.

La modularidad del conjunto 101 se puede mejorar aún más mediante el uso de un conjunto superior desmontable. Por ejemplo, la Figura 15 ilustra el conjunto 101 con un conjunto superior desmontable 28 que se puede unir y separar de la base 7a del conjunto de calentamiento. El conjunto desmontable 28 puede incluir la microcámara 1 y la cavidad de dispensación 2. En algunas modalidades, el conjunto desmontable 28 puede incluir el mecanismo de ciclo térmico 6 u otros componentes. Ventajosamente, el conjunto desmontable 28 puede retirarse de la base 7a del conjunto de calentamiento y sustituirse por un módulo diferente si lo desea el usuario.

La microcámara 1 se puede formar mediante el uso de cualquier técnica adecuada, que puede depender al menos en parte del uso del conjunto 101. Además, el conjunto 101 (por ejemplo, que incluye el cuerpo 200 con la cámara 301) se puede formar de cualquier material adecuado. Por ejemplo, el cuerpo 200 se puede formar de un metal en algunas modalidades. En otras modalidades, el cuerpo 200 puede estar formado por una cerámica o cualquier otro material conductor térmico y/o químicamente resistente adecuado (que puede ser de calidad médica). La Figura 16 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 en el que se forma la microcámara 1 mediante el uso un proceso de grabado. En algunas modalidades, el conjunto 101 se puede grabar mediante el uso de cualquier tipo de proceso de grabado adecuado, tal como grabado en húmedo, grabado en seco, etc. El proceso de grabado puede definir un piso grabado 19 de la microcámara 1.

La Figura 17 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101 en el que se forma la microcámara 1 mediante el uso de un proceso de micromecanizado. En varias modalidades, el conjunto 101 se puede mecanizar mediante el uso de cualquier herramienta adecuada, como una fresadora, taladro, etc. El proceso de mecanizado puede definir un piso micromecanizado 20 de la microcámara 1. Aunque las modalidades de las Figuras 16-17 describen procesos de grabado y mecanizado, pueden usarse otros procesos, tal como el corte por láser, para definir la microcámara 1.

En algunas modalidades, la microcámara 1 puede revestirse con un revestimiento antiadherente 21. La Figura 18 es una imagen del conjunto 101 que incluye el revestimiento antiadherente 21 aplicado al menos sobre el suelo de la microcámara 1. En algunas modalidades, el revestimiento antiadherente 21 se puede aplicar sobre la cavidad de dispensación 2 y cualquier otra superficie adecuada del conjunto 101. El revestimiento antiadherente 21 puede ser un revestimiento hidrófobo para evitar que el reactivo se pegue al conjunto 101 y para reducir la contaminación. El revestimiento 21 se puede fabricar de acuerdo con los reactivos y el producto químico usados en un proceso particular. Por ejemplo, el revestimiento 21 puede comprender Teflon® microcapas, cerámica, revestimiento hidrófobo ultratech, revestimiento de azafrán, etc.

Este revestimiento 21 se puede adaptar para conseguir una microcámara 1 antiadherente, hidrófoba y sin contaminación sin influir en la funcionalidad de la microcámara 1. El revestimiento 21 como se muestra en la Figura 18 puede tener un grosor de menos de aproximadamente 10 micras. En algunas modalidades, el revestimiento 21 puede tener un grosor en un intervalo de aproximadamente 2 micras a aproximadamente 10 micras. De acuerdo con el grosor del revestimiento 21 usado, la microcámara 1 puede diseñarse de modo que se use y mantenga el volumen deseado de reactivo para realizar la reacción. Esto se puede lograr con varios materiales y técnicas, que incluyen los materiales descritos en la presente descripción.

La aspiración y dispensación de reactivo se puede automatizar en la microcámara 1 con una estructura robótica. Se pueden proporcionar sensores de nivel de líquido adecuados, que pueden evitar la contaminación cruzada y el desperdicio de líquido debido a la inmersión no deseada de la punta de la pipeta o la sonda.

La Figura 19 es una vista esquemática en perspectiva del conjunto 101, de acuerdo con varias modalidades. Pueden usarse varias técnicas para aplicar reactivos y/o para lavar y soplar el portaobjetos 8. Por ejemplo, se puede sujetar un portaobjetos 8 sobre la microcámara 1 con una guía del portaobjetos, y un robot puede empujar, tirar, sujetar y/o levantar el portaobjetos 8. En algunas modalidades, el portaobjetos 8 se puede levantar con presión 25. El microrreactivo puede extenderse a la cámara 1 por acción capilar a través de un respiradero 24 o una cavidad perforada que puede guiar al microrreactivo para que fluya hacia la microcámara 1. El conjunto 101 mostrado en la Figura 19 también puede incluir una ranura 27 que puede recibir el portaobjetos 8 u otro sustrato en acoplamiento deslizante. Aparte del microrreactivo, el portaobjetos 8 se puede lavar y soplar para eliminar el reactivo reaccionado y aplicar el nuevo reactivo según el protocolo deseado. Para las operaciones, el portaobjetos 8 se puede levantar con una cierta presión 25 de aire o líquido que puede levantar el portaobjetos 8.

La dispensación del reactivo puede variar en dependencia de la viscosidad del líquido. En dependencia de la densidad del reactivo, el flujo laminar del líquido puede variar. Para asegurarse de que el líquido se extienda por todo el tejido en la microcámara 1, la presión de dispensación se puede ajustar en consecuencia.

En algunas modalidades, como se explicó anteriormente, el reactivo se puede esparcir uniformemente a través o sobre la cámara 1 por medio de la acción capilar. En algunas modalidades, el reactivo se puede esparcir a través de la

cámara 1 al levantar el portaobjetos para permitir que el reactivo u otro líquido fluya hacia la cámara 1. Por ejemplo, se puede introducir reactivo en la cavidad de dispensación 2 y el portaobjetos 8 se puede levantar temporalmente una pequeña cantidad. El reactivo u otro líquido puede fluir en el espacio entre el piso de la cámara 1 y el portaobjetos levantado 8. Una vez que el reactivo se esparce uniformemente en la cámara 1, el portaobjetos 8 se puede bajar sobre la cámara 1 y el reactivo.

El portaobjetos 8 u otro sustrato se puede levantar de cualquier manera adecuada. Por ejemplo, en algunas modalidades, puede usarse una fuente de presión para subir el portaobjetos 8. Se puede introducir aire u otro fluido en la microcámara 1 y la presión puede hacer que el portaobjetos 8 se eleve en una cantidad adecuada. En otras modalidades, puede usarse un mecanismo mecánico o electromecánico (tal como un mecanismo de giratorio 29) para levantar mecánicamente el portaobjetos 8 o el sustrato. En algunas modalidades, puede usarse un actuador piezoeléctrico para levantar el portaobjetos 8. En otras modalidades más, se puede suministrar un líquido no reactivo (el cabrestante puede ser hidrófobo) a la microcámara 1. El líquido nanorreactivo puede configurarse de manera que no reaccione con el reactivo. Cuando se introduce en la cámara 1, el líquido no reactivo puede hacer que el portaobjetos 8 se eleve en una cantidad suficiente. El reactivo se puede dispensar en la cámara 1 entre el piso de la cámara 1 y el portaobjetos levantado 8. En algunas modalidades, el reactivo puede impulsar el líquido no reactivo de la cámara 1 y el aparato 101. En algunas modalidades, se puede aplicar una fuente de vacío a la cámara 1 para succionar el líquido no reactivo de la cámara 1.

Por tanto, en algunas modalidades, el portaobjetos 8 u otro tipo de sustrato se puede levantar para permitir que el reactante o reactivo se extienda uniformemente en la cámara 1 entre el suelo y el portaobjetos levantado 8. En algunas disposiciones, el portaobjetos 8 se puede levantar una altura en un intervalo de aproximadamente 0,5 mm a aproximadamente 1 mm.

Aunque esta invención ha sido descrita en el contexto de ciertas modalidades preferidas y ejemplos, los expertos en la técnica entenderán que la presente invención se extiende más allá de las modalidades descritas específicamente a otras modalidades alternativas y/o usos de la invención y sus modificaciones obvias. Además, aunque se han mostrado y descrito en detalle varias variaciones de la invención, otras modificaciones, que están dentro del alcance de esta invención, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica con base en esta descripción. Por lo tanto, se pretende que el alcance de la presente invención descrito en la presente descripción no debe estar limitado por las modalidades particulares descritas anteriormente, sino deben determinarse solo mediante una lectura justa de las reivindicaciones que siguen

REIVINDICACIONES

1. Un conjunto (101) para analizar una muestra sobre un sustrato plano, el conjunto que comprende:
 5 una estructura de soporte de sustrato (205) que tiene una cámara (1) formada en ella, la cámara que tiene una
 abertura definida en una primera superficie de la estructura de soporte;
 una cavidad de dispensación (2) para suministrar un reactivo a la cámara (1), la cavidad de dispensación (2)
 que tiene una abertura definida en la primera superficie de la estructura de soporte para recibir reactivo a través
 de ella; y
 10 un canal de dispensación (15), que se extiende entre la cavidad de dispensación (2) y la cámara (1) para
 transportar el reactivo desde la cavidad de dispensación (2) a la cámara (1);
 en donde la estructura de soporte del sustrato (205) se configura para soportar el sustrato de manera que una
 superficie del sustrato a la que se va a acoplar la muestra se orienta hacia a la cámara (1) cuando el sustrato
 se monta en la primera superficie de la estructura de soporte del sustrato (205), para que la cámara (1) forme
 15 una microcámara dispuesta entre el sustrato y la estructura de soporte del sustrato (205);
 en donde la cavidad de dispensación (2) está formada en la estructura de soporte del sustrato (205) adyacente
 a la cámara (1) en una dirección paralela al plano del sustrato cuando está soportada por la estructura de
 soporte del sustrato (205); y
 en donde la cámara (1) y la estructura de soporte del sustrato (205) están dimensionadas de manera que,
 20 cuando el reactivo se suministra a la cavidad de dispensación (2), el reactivo se extrae de la cavidad de
 dispensación (2), a través del canal de dispensación (15) y en la cámara (1) por medio de fuerzas capilares
 que actúan sobre el reactivo.
2. El conjunto (101) de la reivindicación 1, en donde el sustrato comprende un portaobjetos de vidrio (8), el
 25 conjunto que comprende además el portaobjetos (8), la muestra que se orienta hacia la cámara (1) cuando la
 muestra se monta en el portaobjetos.
3. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la profundidad de la cámara (1) está en
 un intervalo de aproximadamente 40 micras a aproximadamente 85 micras.
- 30 4. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la cámara (1) está dimensionada para
 contener de aproximadamente 15 μ l a aproximadamente 200 μ l de reactivo.
5. El conjunto (101) de la reivindicación 4, en donde la cámara (101) está dimensionada para contener menos de
 35 o igual a aproximadamente 80 μ l de reactivo.
6. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el conjunto comprende una longitud a
 lo largo de una dirección longitudinal y un ancho a lo largo de una dirección lateral, la longitud mayor que el
 ancho, en donde la cavidad de dispensación (2) comprende un orificio formado a lo largo de una primera porción
 40 de extremo que se extiende a lo largo de la dirección lateral
7. El conjunto (101) de la reivindicación 6, que comprende además una pasarela de evacuación (4) a lo largo de
 una segunda porción de extremo opuesta a la primera porción de extremo, la pasarela de evacuación (4)
 configurada para evacuar materiales no deseados, solución de lavado o líquidos residuales;
- 45 8. El conjunto (101) de la reivindicación 7, que comprende además una puerta (3) entre la cámara y la pasarela
 de evacuación (4), la puerta (3) configurada para permitir que las burbujas salgan del conjunto (101) a través
 de la pasarela de evacuación (4).
9. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende además un mecanismo de
 50 calentamiento montado en una superficie trasera del cuerpo.
10. El conjunto (101) de la reivindicación 9, en donde el mecanismo de calentamiento comprende un módulo de
 ciclos térmicos (6) configurado para calentar el cuerpo (200) y un disipador de calor (7b).
- 55 11. El conjunto (101) de la reivindicación 9, en donde el mecanismo de calentamiento comprende un calentador de
 enfriador termoeléctrico (TEC) u otra forma de calentador.
12. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la estructura de soporte del sustrato
 60 (205) comprende un clip (11) y un tope (5) para evitar el desacoplamiento y levantamiento del sustrato.
13. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde la estructura de soporte del sustrato
 (205) comprende uno o más ganchos o proyecciones (26) para asegurar el sustrato al cuerpo (200).
- 65 14. El conjunto (101) de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende además un revestimiento
 antiadherente (21) sobre al menos un piso de la cámara (1).

15. Un método para analizar una muestra, el método que comprende:
proporcionar un conjunto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14; acoplar la muestra al sustrato;
montar el sustrato en la estructura de soporte del sustrato (205) sobre la cámara (1) de manera que la muestra se oriente hacia la cámara (1); y
dispensar un reactivo en la cavidad de dispensación, para extraer el reactivo entre un piso de la cámara (1) y el sustrato por medio de fuerzas capilares que actúan sobre el reactivo, para que el reactivo reaccione con la muestra
- 5

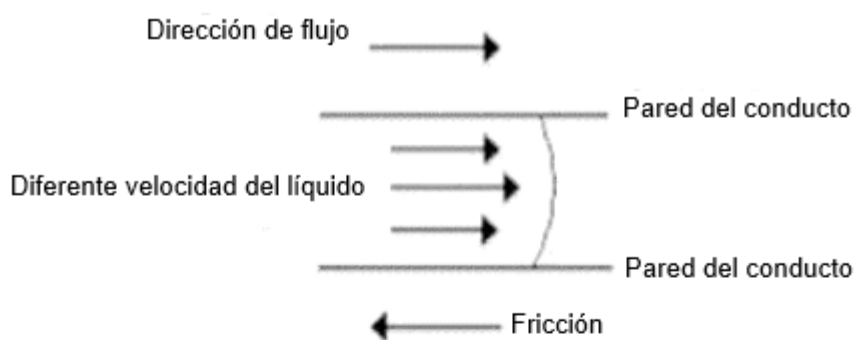


Figura 1

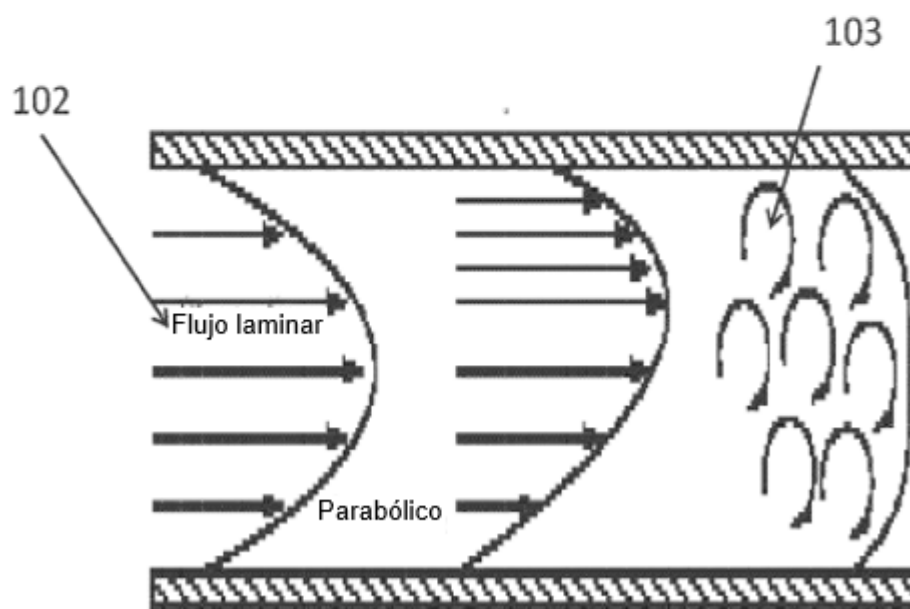
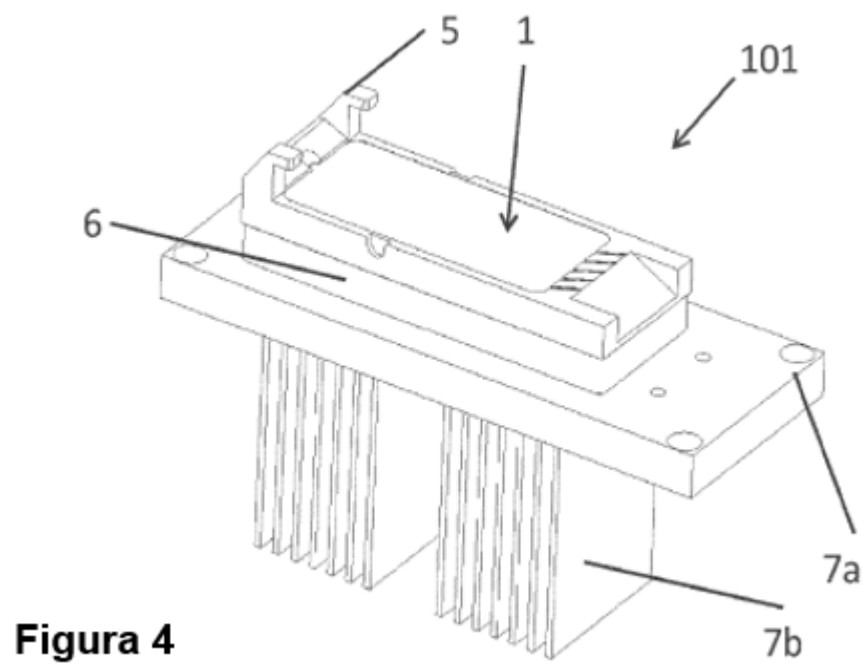
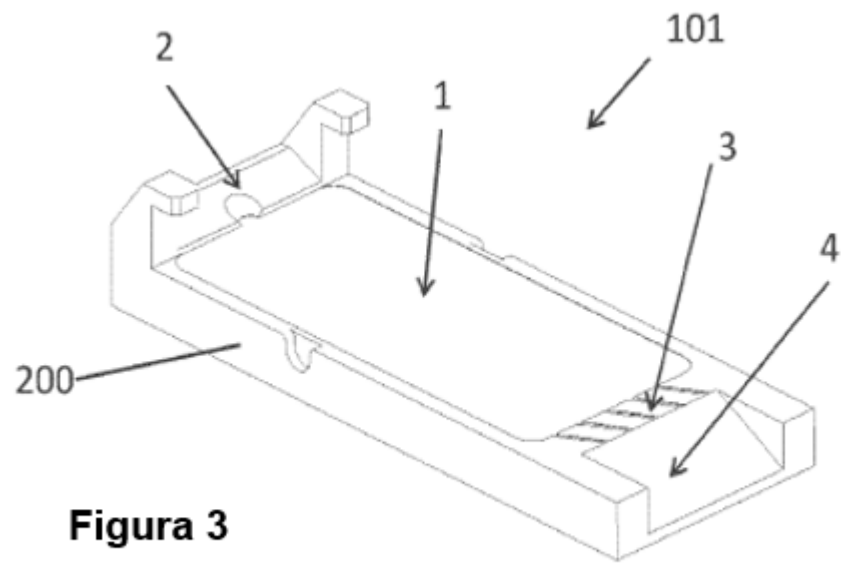
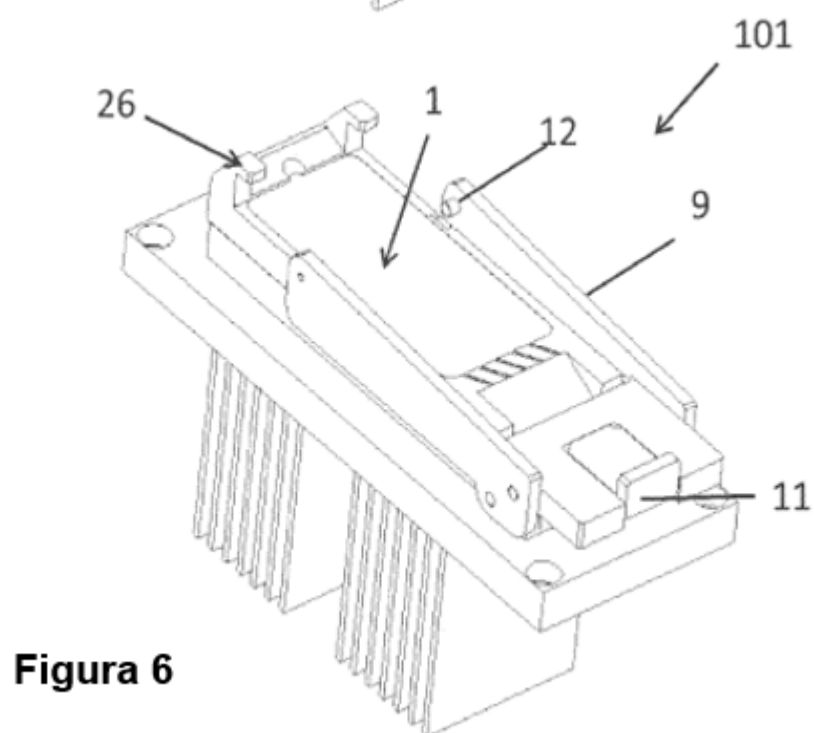
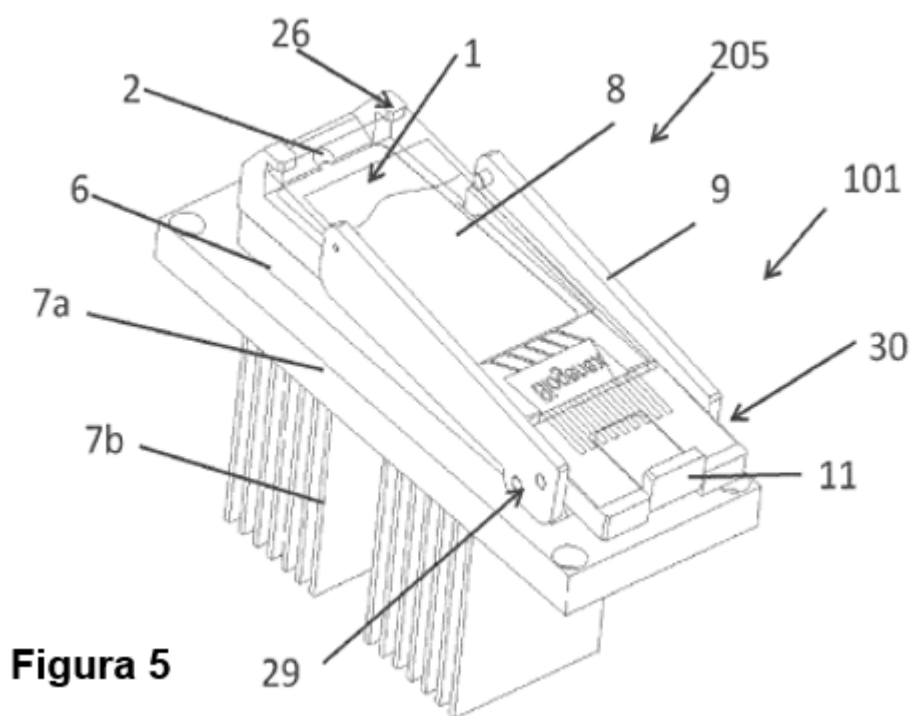


Figura 2





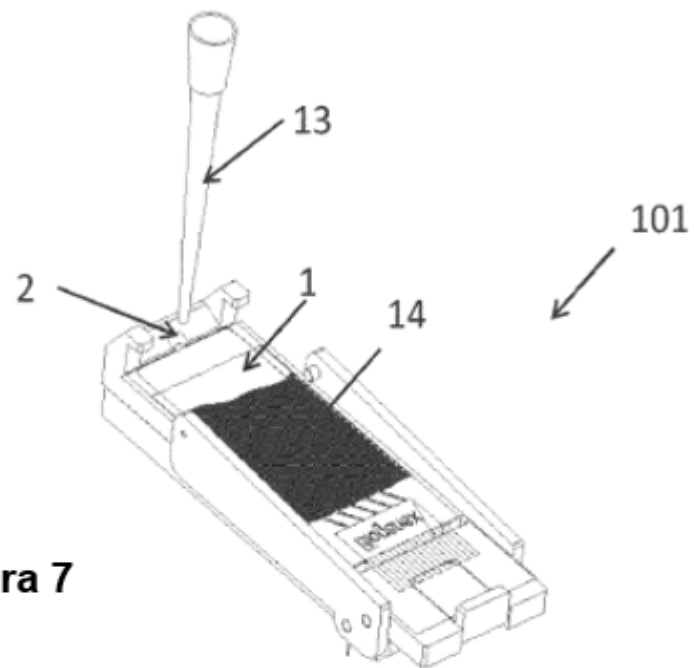


Figura 7

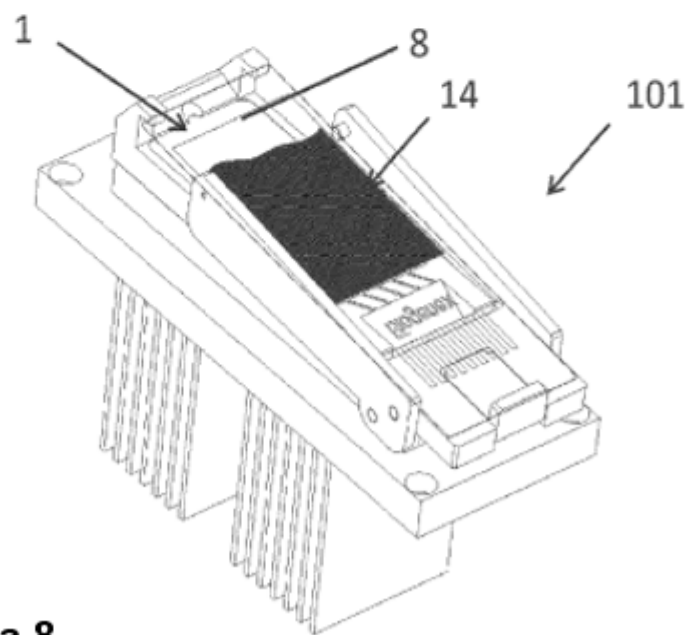
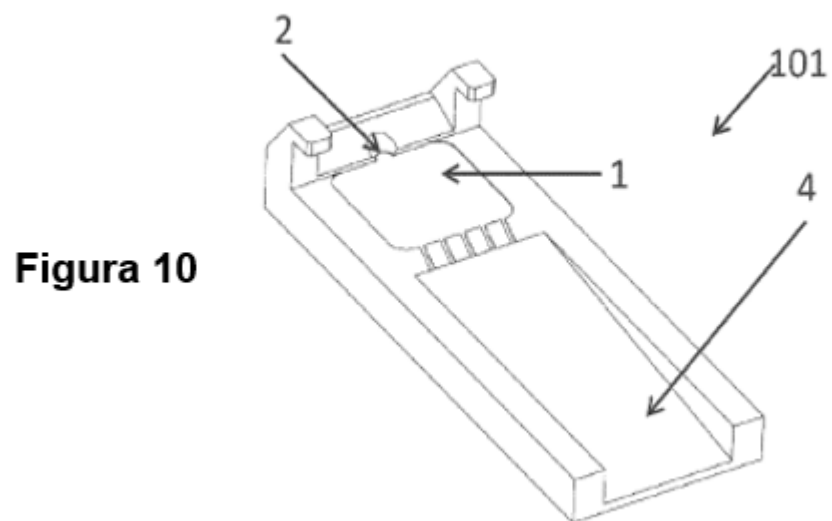
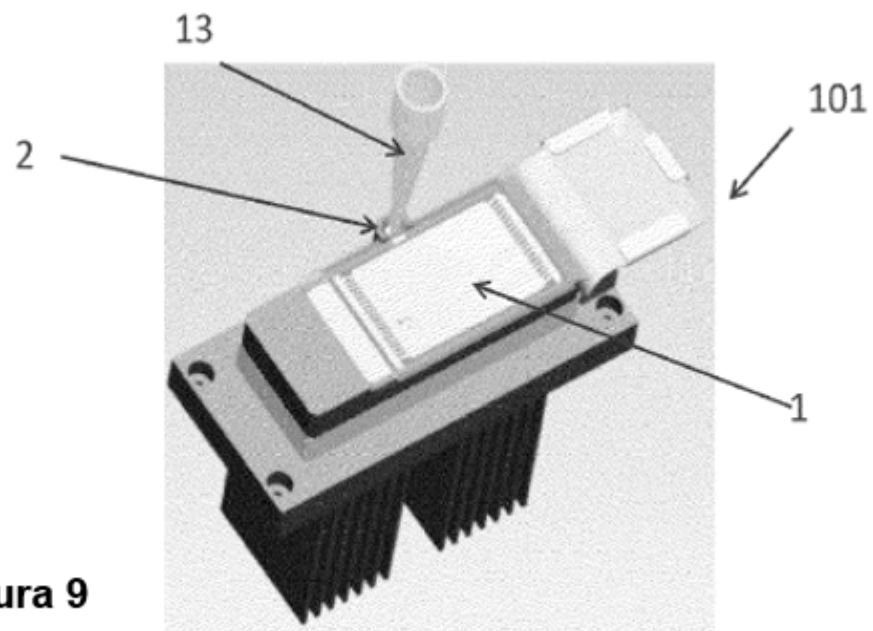
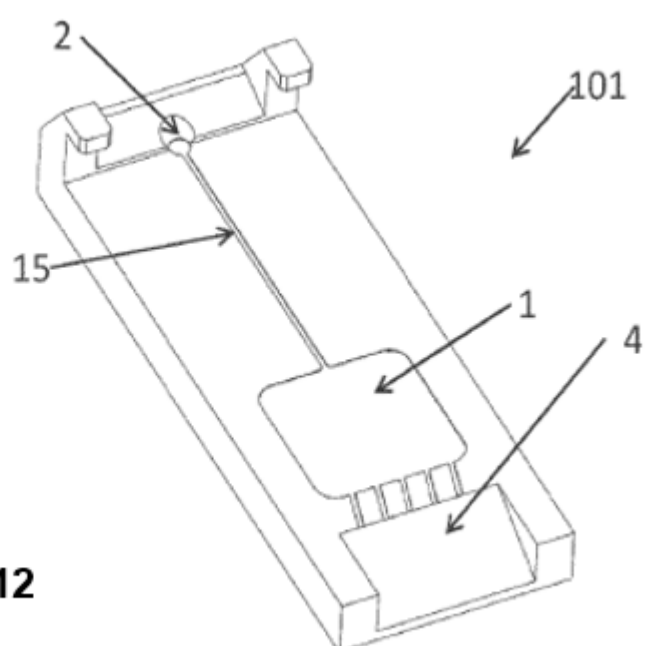
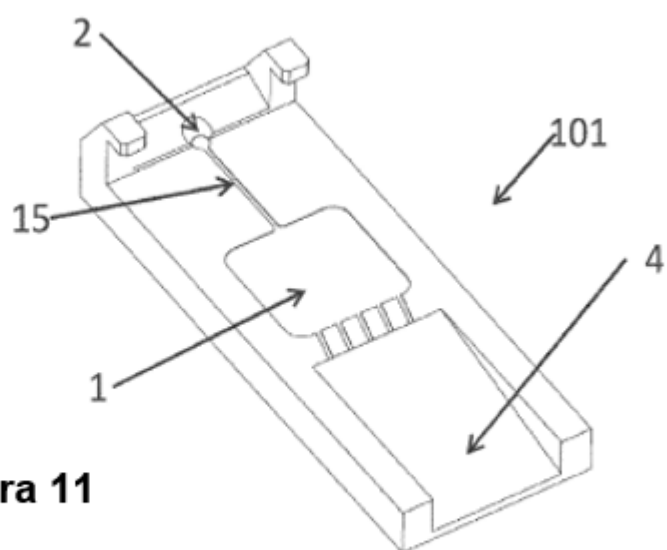


Figura 8





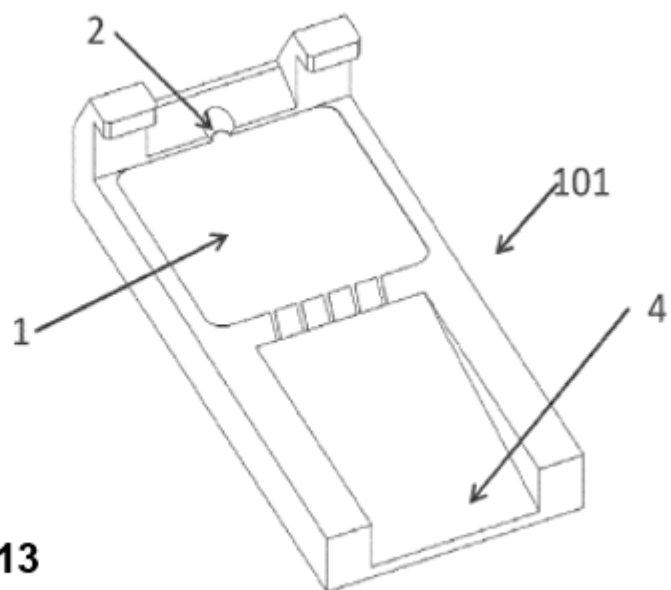


Figura 13

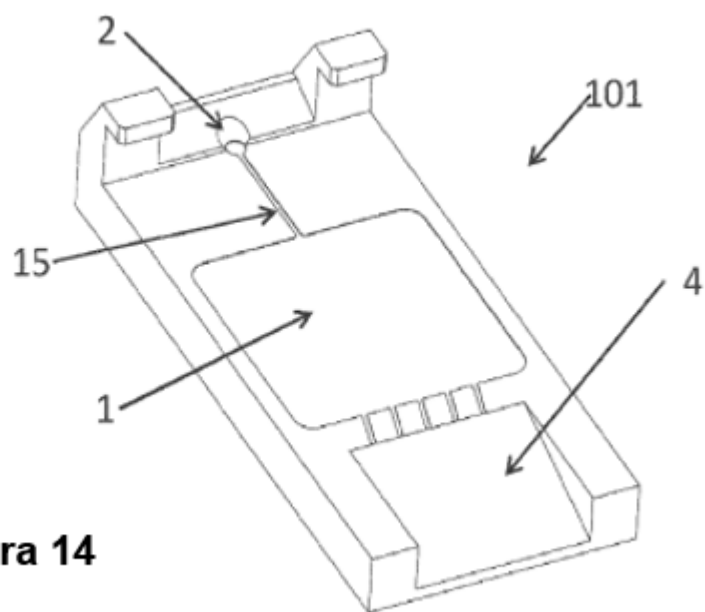


Figura 14

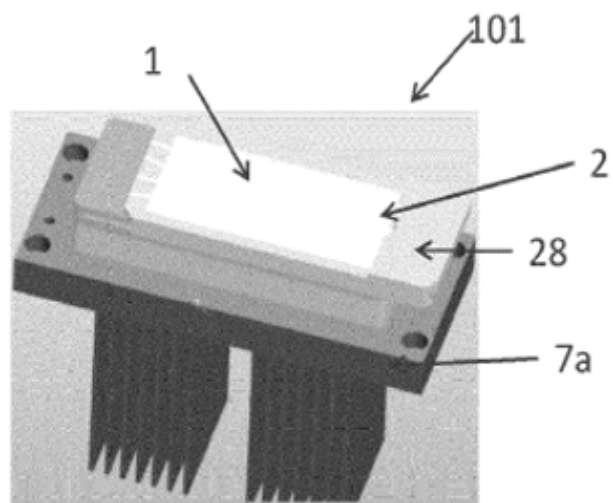


Figura 15

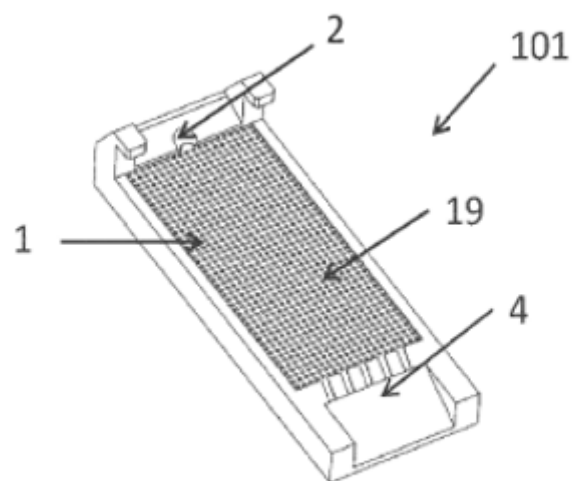


Figura 16

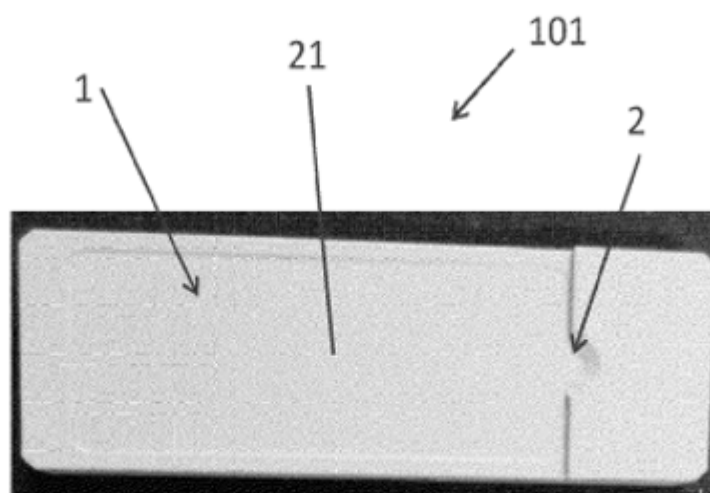
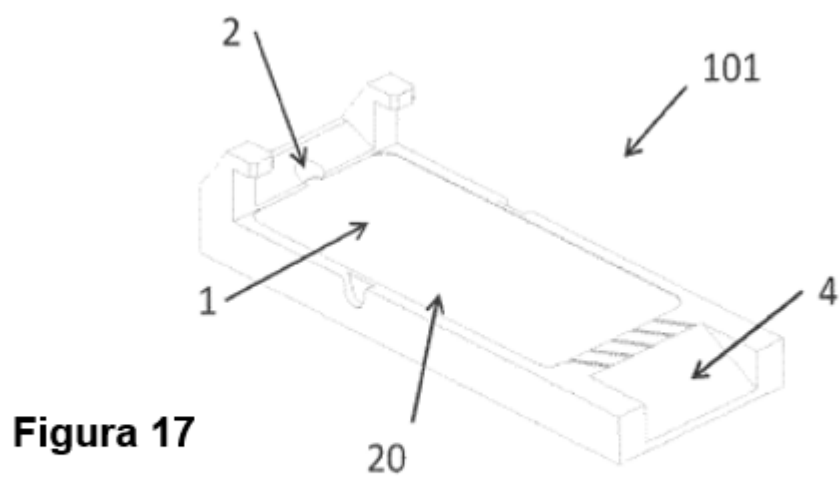


Figura 18

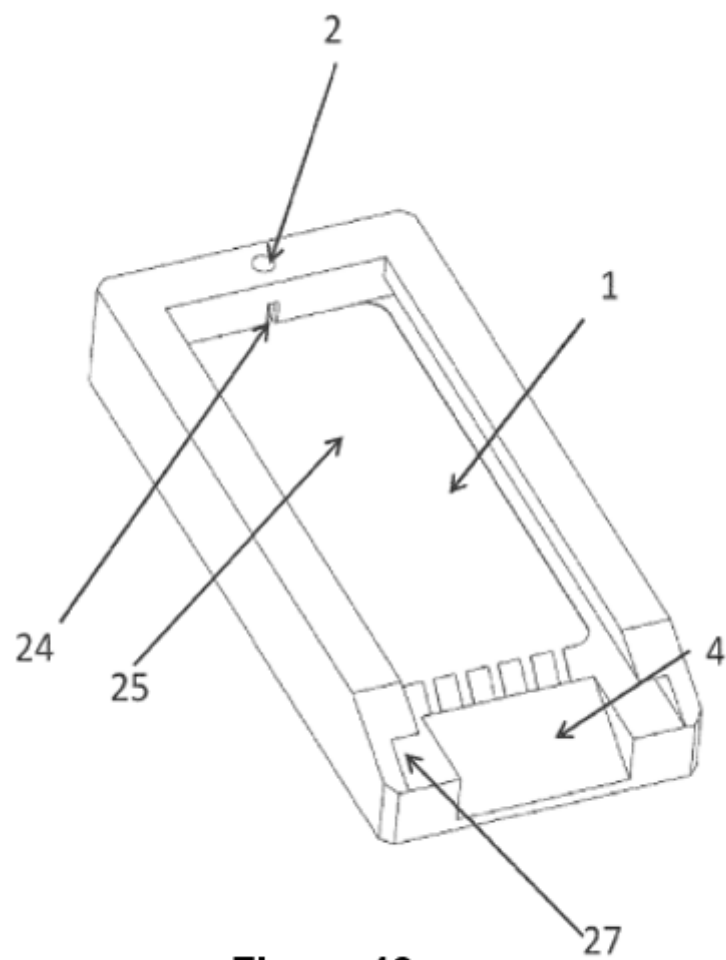


Figura 19