

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 871 925**

51 Int. Cl.:

B03C 5/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

B03C 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2019 E 19171783 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.04.2021 EP 3501658**

54 Título: **Dispositivo para clasificar biopartículas utilizando una fuerza generada a partir de dielectroforesis inducida por luz y su método de funcionamiento**

30 Prioridad:

19.03.2019 US 201962820817 P

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

02.11.2021

73 Titular/es:

**ACE MEDICAL TECHNOLOGY CO., LTD (100.0%)
12F., No.678, Sec. 4, Bade Rd., Songshan Dist.
Taipei City 105, TW**

72 Inventor/es:

**CHIU, TZU-KENG;
ZHU, YU-XIAN y
TSENG, HUAN-YI**

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

ES 2 871 925 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

Dispositivo para clasificar biopartículas utilizando una fuerza generada a partir de dielectroforesis inducida por luz y su método de funcionamiento

Campo de la invención

La presente invención se refiere, en general, al campo de clasificación de biopartículas y, más particularmente, al campo de clasificación de biopartículas a partir de mezclas heterogéneas mediante el uso de fuerza eléctrica manipulada por imágenes.

Antecedentes de la invención

Durante las últimas décadas, varias instituciones académicas o empresas han estudiado y divulgado varios enfoques para diagnosticar, detectar y/o tratar el cáncer de manera eficaz. Además, se han realizado varias investigaciones para tratar o eliminar el cáncer en vivo. Sin embargo, solamente son factibles limitadas soluciones debido a la incertidumbre y variabilidad del cáncer.

Una de las estrategias para diagnosticar y detectar el cáncer es clasificar y aislar células específicas relacionadas con el cáncer *in vitro*. Estas células pueden ser células tumorales circulantes (CTCs) que se generan durante la metástasis dentro del cuerpo del huésped. La solicitud de patente americana (US 2017/0297036) describe un método para detectar y clasificar CTCs en un dispositivo microfluídico utilizando dielectroforesis inducida por luz. El dispositivo microfluídico incluye un canal microfluídico en cuyo interior puede fluir el fluido. Durante el proceso de clasificación, en el canal microfluídico se inyecta un fluido que contiene células, y después se identifica y se coloca una célula a clasificar cuando la célula alcanza una región predeterminada. Después, se ilumina una zona de luz en forma de anillo en la célula identificada y posicionada. Posteriormente, se ilumina una zona de luz en forma de barra en el canal microfluídico y se mueve de un lado al otro lado del canal microfluídico. Durante el movimiento de la zona de luz en forma de barra, las células no deseadas en el canal microfluídico son barridas por el borde de la zona de luz en forma de barra debido al campo eléctrico no uniforme generado cerca del borde de la zona de luz en forma de barra. Por el contrario, durante el movimiento de la zona de luz en forma de barra, la célula a clasificar que se superpone a la zona de luz en forma de anillo no es barrida y, por lo tanto, puede permanecer en su posición original. Finalmente, después de que se han barrido todas las células no deseadas, la célula a clasificar puede moverse adicionalmente hacia una región de recogida moviendo la zona de luz en forma de anillo para completar un único proceso de clasificación. El proceso de clasificación puede repetirse varias veces hasta que todas las células a clasificar se han recogido completamente.

Aunque el proceso de clasificación descrito en US 2017/0297036 es capaz de clasificar células específicas, tales como CTCs, existen todavía algunos inconvenientes que deben superarse. Por ejemplo, el tiempo empleado para clasificar cada célula es relativamente largo. Además, es posible que la barra de luz no barra completamente las células no deseadas y, por lo tanto, algunas de las células no deseadas pueden fluir hacia la región de recogida junto con las células a clasificar.

Además, dado que el fluido que contiene mezclas heterogéneas se inyecta al canal microfluídico a través de una entrada, es inevitable que algunas de las células del fluido se adhieran o se acumulen en la superficie interna del canal microfluídico cerca de la entrada, lo que también afecta negativamente a la precisión del proceso de clasificación.

La solicitud de patente US2018/120255A1 describe un dispositivo para clasificar biopartículas de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación independiente 1.

Descripción de la invención

Para este fin, la presente invención tiene como objetivo proporcionar un dispositivo de clasificación mediante el uso de fuerza eléctrica manipulada por imágenes y un método de su funcionamiento que pueden aumentar la eficiencia del tiempo y la precisión de un proceso de clasificación.

Esto se consigue mediante un dispositivo tal como se indica en la reivindicación 1 y mediante un método tal como se indica en la reivindicación 13. Las reivindicaciones dependientes se refieren a correspondientes desarrollos y mejoras adicionales.

En algunas realizaciones, un dispositivo para clasificar biopartículas mediante fuerza eléctrica manipulada por imágenes incluye un primer sustrato, un segundo sustrato, un canal fluídico, una o más capas fotosensibles y un orificio de entrada. El primer sustrato tiene un primer electrodo conductor y el segundo sustrato tiene un segundo

electrodo conductor. El segundo electrodo conductor está dispuesto frente al primer electrodo conductor. El canal
 5 fluídico está dispuesto entre el primer electrodo conductor y el segundo electrodo conductor. La capa fotosensible
 está dispuesta de manera conformal sobre por lo menos una de las superficies del primer electrodo conductor y el
 segundo electrodo conductor. El orificio de entrada está dispuesto en el primer electrodo conductor, en el que el
 orificio de entrada incluye una primera abertura cerca del canal fluídico y una segunda abertura lejos del canal
 fluídico, y el área de superficie de la primera abertura es mayor que el área de superficie de la segunda abertura.

En algunas realizaciones, un método de funcionamiento de un aparato que incluye el dispositivo de clasificación
 10 mencionado anteriormente incluye las etapas de (a) proporcionar un líquido que incluye biopartículas a un canal
 fluídico a través de un orificio de entrada; (b) identificar las biopartículas cuando las biopartículas fluyen a una región
 de clasificación del canal fluídico; (c) reducir el caudal del líquido o detener el flujo del líquido después de que se
 hayan identificado las biopartículas; (d) colocar las biopartículas después de la etapa (c); (e) iluminar una zona de
 15 luz en la región de clasificación, en el que el área de la zona de luz es mayor que la mitad del área del canal
 principal; (f) iluminar un patrón de luz con una zona oscura en la región de clasificación cuando la región de
 clasificación es iluminada por la zona de luz, en el que el patrón de luz se superpone por lo menos a una de las
 biopartículas, y la zona oscura tiene una luminancia más oscura que una luminancia de una región adyacente a la
 zona oscura; y (g) mover la biopartícula superponiéndose al patrón de luz.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se ilustra adicionalmente a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos
 20 adjuntos, en los cuales:

La figura 1 es una vista superior esquemática de un dispositivo para clasificar biopartículas de una mezcla fluida
 25 heterogénea de acuerdo con una realización de la presente invención;

La figura 2 muestra unos diagramas en sección transversal respectivamente según la línea A-A' y la línea B-B' de
 la figura 1 de acuerdo con una realización de la invención;

La figura 3 es un diagrama esquemático de varios tipos de entradas y salidas de acuerdo con una realización de
 la presente invención;

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo de clasificación durante un proceso de
 30 transporte de una mezcla heterogénea fluida en un canal principal del dispositivo de acuerdo con una realización
 de la invención;

La figura 5 muestra un resultado de operar dispositivos de clasificación que tienen diferentes tipos de entradas y
 salidas;

La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene una salida opuesta a una entrada
 35 donde la salida y la entrada están dispuestas en dos extremos de un canal principal de acuerdo con otra
 realización de la presente invención;

La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene una capa fotosensible en la parte
 superior de un canal principal de acuerdo con otra realización de la presente invención;

La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene dos capas de material fotosensible
 40 de acuerdo con otra realización de la presente invención;

La figura 9 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene una capa intermedia de acuerdo
 con otra realización de la presente invención;

La figura 10 es un diagrama esquemático que muestra un método de manipulación de biopartículas en un
 45 dispositivo utilizando fuerza eléctrica manipulada por imágenes de acuerdo con una realización de la presente
 invención;

La figura 11 es un diagrama esquemático que muestra un método de manipulación de biopartículas en un
 dispositivo mediante el uso de fuerza eléctrica manipulada por imágenes de acuerdo con otra realización de la
 presente invención;

La figura 12 es un diagrama esquemático que muestra un método de manipulación de biopartículas en un
 50 dispositivo mediante el uso de fuerza eléctrica manipulada por imágenes de acuerdo con todavía otra realización
 de la presente invención;

La figura 13 muestra imágenes de microscopios ópticos y de fluorescencia de acuerdo con unos ejemplos
 comparativos y de ejemplo;

La figura 14 es una vista superior esquemática de un dispositivo que tiene varios canales fluídicos de acuerdo
 55 con una realización de la presente invención;

La figura 15A son datos experimentales que verifican un resultado operativo de un dispositivo de clasificación en
 el que la relación de anchura de un canal principal, un canal lateral y un canal de recogida es 1:1:1;

La figura 15B son datos experimentales que verifican un resultado operativo de un dispositivo de clasificación en
 60 el que la relación de anchura de un canal principal, un canal lateral y un canal de recogida es 2:1:2;

La figura 15C son datos experimentales que verifican un resultado operativo de un dispositivo de clasificación en
 la relación de anchura de un canal principal, un canal lateral y un canal de recogida es 10:1:10;

La figura 16 es una vista superior esquemática de un dispositivo que tiene un canal principal curvo de acuerdo con otra realización de la presente invención;

La figura 17 son datos experimentales que verifican los caudales en diferentes ubicaciones de un canal principal curvo; y

5 La figura 18 es una vista superior esquemática de un dispositivo que tiene un canal principal curvo y un canal de recogida curvo de acuerdo con todavía otra realización de la presente invención.

Descripción detallada

10 Esta memoria describe unos ejemplos de realizaciones y aplicaciones de la invención. Sin embargo, la invención no se limita a estos ejemplos de realizaciones y aplicaciones ni a la manera en que funcionan o se describen aquí los ejemplos de realizaciones y aplicaciones. Además, las figuras pueden mostrar vistas parciales o simplificadas, y las dimensiones de los elementos de las figuras pueden haberse exagerado o no estar en proporción para mayor claridad. Además, las direcciones (por ejemplo, por encima, por debajo, superior, inferior, lateral, arriba, abajo, horizontal, vertical, "x", "y", "z", etc.), si se proporcionan, son relativas y se dan únicamente a modo de ejemplo y para facilitar la ilustración y descripción y no a modo de limitación.

20 Cabe señalar que el término "fuerza eléctrica manipulada por imágenes" puede considerarse como una fuerza generada a partir de dielectroforesis inducida por luz. Es decir, el método de manipulación de biopartículas descrito en la presente solicitud puede considerarse como un tipo de método de manipulación de biopartículas mediante dielectroforesis inducida por luz.

25 La figura 1 es una vista superior esquemática de un dispositivo para clasificar biopartículas de una mezcla fluida heterogénea de acuerdo con una realización de la presente invención. Un dispositivo 100 incluye dos sustratos opuestos, tales como una cubierta superior 102 y una cubierta inferior (no mostrada). Entre las cubiertas se dispone un canal microfluídico, tal como un canal principal 112. En dos extremos distales del canal principal 112 se disponen dos accesos, tales como una entrada 120 y una salida 122. Durante el proceso de funcionamiento del dispositivo 100 puede inyectarse una mezcla líquida que contiene biopartículas, tales como células, y un medio líquido, en el canal principal 112 a través de la entrada 120 y drenarse desde el canal principal 112 a través de la salida 122. Aunque la cubierta superior 102 mostrada en la figura 1 es de un rectángulo, la forma de la cubierta superior 102 (o la cubierta inferior) puede modificarse adecuadamente para cumplir con diferentes requisitos. Por lo tanto, la cubierta superior 102 (o la cubierta inferior) puede ser de triángulo, cuadrado, círculo, rectángulo, de múltiples ángulos, pero sin limitarse a estos.

35 La figura 2 muestra dos diagramas en sección transversal según la línea A-A' y la línea B-B' respectivamente de la figura 1 de acuerdo con una realización de la invención. El dispositivo 100 incluye la cubierta superior 102, la cubierta inferior 104 dispuesta frente a la cubierta superior 102 y un material fotosensible 110 dispuesto entre la cubierta superior 102 y la cubierta inferior 104. Por lo menos dos electrodos conductores transparentes, tales como un primer electrodo conductor transparente 106 y un segundo electrodo conductor transparente 108, se depositan o se recubren respectivamente sobre las superficies internas 102-1 de la cubierta superior 102 y la superficie interna 104-1 de la cubierta inferior 104. El primer electrodo conductor transparente 106 y el segundo electrodo conductor transparente 108 pueden estar realizados en un material conductor transparente, tal como óxido de indio y estaño (ITO) u óxido de indio y zinc (IZO), pero sin limitarse a ellos, y pueden estar conectados eléctricamente a un generador de CA, de modo que puede generarse un campo eléctrico alterno en el canal principal 112 entre los dos electrodos opuestos 106 y 108 al activarse el generador de CA. El grosor del primer electrodo conductor transparente 106 y el grosor del segundo electrodo conductor transparente 108 pueden estar en un intervalo de 0,05-0,4 μm , respectivamente.

50 El primer electrodo conductor transparente 106 y el segundo electrodo conductor transparente 108 pueden estar separados entre sí por el material fotosensible 110, que puede estar realizado en silicio amorfo hidrogenado (a-Si:H), pero sin limitarse a éste. La fuente de luz 20, que puede iluminar luz de una longitud de onda requerida sobre el material fotosensible 110, puede estar dispuesta encima o debajo del dispositivo 100. Cuando se ilumina luz sobre el material fotosensible 110, pueden generarse y acumularse cargas en la región que se está iluminando. Por tanto, la conductividad eléctrica del material fotosensible 110 puede variarse iluminando con luz sobre el mismo. El grosor del material fotosensible 110 puede estar en un intervalo de 0,1-2 μm , y preferiblemente en un intervalo de 0,5-1 μm . Cabe señalar que, aunque el primer electrodo conductor transparente 106 está en contacto directo con el material fotosensible 110, el primer electrodo conductor transparente 106 puede quedar separado del material fotosensible 110 disponiendo otra capa aislada eléctricamente de acuerdo con otras realizaciones de la presente invención.

60 Como alternativa, la cubierta superior 102 y la cubierta inferior 104 mencionadas anteriormente pueden estar realizadas en vidrio, polimetilmetacrilato (PMMA), polidimetilsiloxano (PDMS), metal, copolímero de olefina cíclica, y polímeros de olefina cíclica, pero sin limitarse a ellos. Además, el primer electrodo conductor transparente 106 y el segundo electrodo conductor transparente 108 pueden estar realizados de películas conductoras transparentes,

óxido de indio y estaño, óxidos conductores transparentes, polímeros conductores, rejillas metálicas y redes metálicas aleatorias, nanotubos de carbono, grafeno, mallas de nanocables, y películas de metal ultrafino, pero sin limitarse a estos. El material fotosensible 110 puede realizado en nanopartículas metálicas, grafeno, silicio amorfo, disulfuro de molibdeno, nanocables de arseniuro de indio, pero sin limitarse a ellos.

El canal principal 112 está dispuesto entre la cubierta superior 102 y la cubierta inferior 104, y el contorno de partes del canal principal 112 (incluyendo las paredes laterales y la superficie inferior del canal principal 112) puede estar definido por la superficie del material fotosensible 110. Preferiblemente, la relación entre la anchura del canal principal 112 y el diámetro medio de las biopartículas que fluyen en el canal principal 112 puede ser de entre 1:1 y 200:1, pero sin limitarse a ello. En una entrada 120 del dispositivo 100 hay conectado un tubo de entrada 124, y en una salida 122 del dispositivo 100 hay conectado un tubo de salida 126. La entrada 120 puede incluir dos partes: un orificio de entrada 120-1 y un orificio pasante 120-2. También, la salida 122 puede incluir dos partes: un orificio de salida 122-1 y un orificio pasante 122-2. Tanto el orificio de entrada 120-1 como el orificio de salida 122-1 pueden estar dispuestos en el primer electrodo conductor transparente 106, y ambos orificios pasantes 120-2 y 122-2 pueden estar dispuestos en la cubierta superior 102. Para el orificio de entrada 120-1 y el orificio de salida 122-1, cada uno de los orificios puede incluir dos aberturas con diferentes áreas de abertura. Cabe señalar que, aunque el orificio de entrada 120-1 y el orificio de salida 122-1 están dispuestos en el primer electrodo conductor transparente 106 de acuerdo con esta realización, cada uno del orificio de entrada 120-1 y el orificio de salida 122-1 puede extenderse también hacia la cubierta superior 102. Como resultado, cada uno del orificio de entrada 120-1 y el orificio de salida 122-1 pueden estar dispuesto parcialmente en la cubierta superior 102.

La figura 3 es un diagrama esquemático de varios tipos de entradas y salidas de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención. Para cada una de la entrada 120 y la salida 122 (tal como los tipos (a) a (d)), el orificio de entrada 120-1 (o el orificio de salida 122-1) incluye una primera abertura O1 cerca del canal principal 112 y una segunda abertura O2 alejada del canal principal 112. El área de superficie A1 de la primera abertura O1 es mayor que el área de superficie A2 de la segunda abertura O2. La característica común de las entradas 120 y salidas 122 mostradas en la figura 3 es que el área de la sección transversal aumenta gradualmente desde la segunda abertura O2 hasta la primera abertura O1. Debido a la característica de "el área de la sección transversal gradualmente aumentada", cuando la mezcla líquida que contiene las biopartículas fluye hacia adentro o hacia afuera del canal principal 112, es menos probable que las biopartículas se adhieran o se acumulen en la superficie de la abertura de la entrada 120 y la salida 122 cerca del canal principal 112. La segunda abertura O2 puede estar dispuesta en el primer electrodo conductor o en la cubierta superior dependiendo de los diferentes requisitos.

La figura 4 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo de clasificación durante un proceso de transporte de una mezcla fluida heterogénea a través de un canal principal de acuerdo con una realización de la invención. Una mezcla fluida heterogénea 130 que se inyecta en el canal principal 112 puede incluir diferentes tipos de biopartículas, tales como células tumorales circulantes 132 y células sanguíneas 134. Debido a la característica de que el área de la sección transversal A1 de la abertura O1 cerca del canal principal 112 es mayor que el área de la sección de la transversal A2 de la abertura O2 alejada del canal principal 112, estas células 132 y 134 pueden fluir fácilmente hacia adentro o hacia afuera de la entrada 120 y la salida 122, y no se adherirían ni se acumularían cerca de las aberturas O1. Como resultado, la precisión y la eficiencia del proceso de clasificación pueden incrementarse ya que todas las células 132 y 134 en la mezcla fluida heterogénea 130 pueden fluir de manera satisfactoria a través del canal principal 112 y ser descargadas por el tubo de salida 126. Dado que el grosor del primer electrodo conductor transparente 106 es relativamente pequeño, por ejemplo 0,05-0,4 μm , las aberturas O2 del orificio de entrada 120-1 y el orificio de salida 122-1 están dispuestas preferiblemente en la cubierta superior 102 de acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención.

La figura 5 muestra el resultado de operar unos dispositivos de clasificación que tienen diferentes tipos de entradas y salidas. Se toman fotografías (a-1) y (a-2) en una abertura de una entrada (o salida) de un dispositivo de clasificación convencional durante el proceso de hacer fluir una mezcla heterogénea de fluidos hacia adentro o hacia afuera del dispositivo. Los puntos brillantes en las fotografías representan células, y estas células obviamente se encuentran adheridas o almacenadas en la entrada o salida. En cambio, se toman fotografías (b-1) y (b-2) en una abertura de una entrada (o salida) de un dispositivo de clasificación de acuerdo con una realización de la presente invención. En las fotografías (b-1) y (b-2) no se muestra ninguno de los puntos brillantes, lo que significa que ninguna de las células se encuentra adherida o almacenada en la entrada o salida.

Como alternativa, los tipos de biopartículas descritos aquí no se limitan a células y también pueden reemplazarse por células tumorales, células madre, células sanguíneas, células neuronales, células epiteliales, células inmunes, células madre pluripotentes inducidas (iPS), bacteria que comprende bacteria gram positiva, bacteria gram negativa, virus, exosoma, liposomas con ARN, ADN o proteína, parásito, o cualquier otra partícula relacionada biológicamente, pero sin limitarse a éstos.

La figura 6 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene una salida opuesta a una entrada en el que la salida y la entrada están dispuestas en dos extremos de un canal principal de acuerdo con otra realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 6 también incluye la cubierta superior 102, la cubierta inferior 104, dos electrodos conductores 106 y 108 y el material fotosensible 110. La principal diferencia entre las estructuras mostradas en la figura 6 y la figura 2 es que el orificio de salida 122-1 de la figura 6 está dispuesto en el segundo electrodo conductor 108 y puede extenderse más hacia el material fotosensible en lugar de hacia el primer electrodo conductor 106. Es decir, la mezcla de fluido que entra en el dispositivo 100 puede fluir hacia afuera del dispositivo 100 a través del extremo del canal principal 112. Por lo tanto, la disposición del espacio del dispositivo puede configurarse correctamente. Además, el orificio de salida 122-1 puede extenderse más hacia la cubierta inferior 104 dependiendo de diferentes requisitos.

La figura 7 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene una capa fotosensible en la parte superior de un canal principal de acuerdo con otra realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 7 es similar al mostrado en la figura 2, con la principal diferencia de que el material fotosensible 110 mostrado en la figura 7 está dispuesto de manera conformal sobre el primer electrodo conductor transparente 106 en lugar de sobre el segundo electrodo conductor transparente 108. Por lo tanto, la superficie inferior del canal principal 112 no está en contacto directo con el material fotosensible 110. Por el contrario, la superficie superior del canal principal 112 está en contacto directo con el material fotosensible 110 de acuerdo con esta realización.

La figura 8 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene dos capas de material fotosensible de acuerdo con otra realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 8 es similar al mostrado en la figura 2, con la principal diferencia entre estas dos realizaciones de que dos capas de material fotosensible 110-1 y 110-2 están dispuestas respectivamente de manera conformal sobre el primer electrodo conductor transparente 106 y el segundo electrodo conductor transparente 108. Por lo tanto, la superficie inferior y la superior superficie del canal principal 112 están en contacto directo con el material fotosensible 110.

La figura 9 es un diagrama esquemático que muestra un dispositivo que tiene una capa intermedia de acuerdo con otra realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 9 es similar al mostrado en la figura 2, con la principal diferencia entre estas dos realizaciones de que una capa intermedia 128 está dispuesta, además, entre la cubierta superior 102 y la cubierta inferior 104 y, más preferiblemente, dispuesta entre el primer electrodo conductor transparente 106 y el material fotosensible 110. En una realización, el canal principal 112 queda dispuesto en la capa intermedia 128 y puede considerarse como una cavidad fabricada en la capa intermedia 128. Pueden colocarse unos adhesivos adicionales entre la capa intermedia 128 y la cubierta superior e inferior 102 y 104 de modo que la capa intermedia 128 puede adherirse a la cubierta superior 102 y la cubierta inferior 104. La capa intermedia 128 puede estar realizada en un material aislante eléctrico utilizado para separar la cubierta superior 102 y la cubierta inferior 104. Además, la capa intermedia 128 puede ser una membrana semipermeable que permita la difusión de iones adicionales dentro de la mezcla de fluido heterogénea 130 hacia afuera del canal principal 112. Durante el proceso de transporte de la mezcla heterogénea de fluido 130 en el canal principal 112, algunas de las células débiles de la mezcla de fluido heterogénea 130 pueden romperse. Pueden liberarse iones adicionales de las células rotas o muertas a la mezcla de fluido heterogénea 130, lo cual afecta negativamente a la conductividad eléctrica de la mezcla de fluido heterogénea 130 y, por lo tanto, afecta a la fuerza eléctrica manipulada por imágenes para células en movimiento. Por lo tanto, al disponer la capa intermedia 128 realizada en un material semipermeable, los iones adicionales pueden fluir fuera del canal principal 112 a través del material semipermeable para mantener en un cierto nivel la conductividad eléctrica de la mezcla fluida heterogénea 130.

Aún así, la capa intermedia 128 mostrada en la figura 9 puede estar realizada en un material biocompatible que no reaccione ni disuelva materiales nocivos con las células o el medio líquido de la mezcla de fluido heterogénea 130. Por lo tanto, las células que fluyen en el canal principal 112 no pueden ser contaminadas por el canal principal 112. Por ejemplo, el material biocompatible puede disponerse, además, de manera conformal a lo largo de la pared lateral. Además, la capa intermedia 128 o el canal principal 112 pueden estar fabricados de un material biocompatible si es necesario.

La figura 10 es un diagrama esquemático que muestra un método de manipulación de biopartículas en un dispositivo utilizando fuerza eléctrica manipulada por imágenes de acuerdo con una realización de la presente invención. Durante el funcionamiento del dispositivo, se aplica un campo eléctrico alterno entre los dos electrodos transparentes opuestos para polarizar la célula 132 que fluye en el canal principal 112. Cuando la célula polarizada 132 fluye a una región predeterminada del canal principal 112, la fuente de luz puede proyectar luz sobre el material fotosensible en la región predeterminada para generar una zona de luz 140 en el canal principal 112. La región predeterminada puede ser cualquier región que pueda observarse con un microscopio óptico o un microscopio de fluorescencia, pero sin limitarse a éstos. Además, sobre el material fotosensible donde existe la célula 132 se ilumina un patrón de luz 142 que incluye una zona interior de luz 142-1 y una zona exterior oscura 142-2. La zona interior de luz 142-1 puede ser una zona de luz circular, y la zona exterior oscura 142-2 puede ser una zona oscura en forma de anillo, pero sin limitarse a éstas. Dado que existe un gradiente de campo eléctrico en el borde 144b de la zona

interior de luz 142-1 y la zona exterior oscura 142-2, la célula 132 puede quedar confinada en la zona interior de luz 142-1 y moverse junto con la zona de luz 140 durante el proceso de mover el patrón de luz 142. Además, el área de superficie 140A de la zona de luz 140 (definida por la longitud 140-1 y la anchura 140-2 de la zona de luz 140) es preferiblemente mayor que la mitad del área 112A del canal principal 112 (definido por la pared lateral 112S del canal principal 112). Cabe señalar que también puede generarse un gradiente de campo eléctrico en el borde 140E de la zona de luz 140 de modo que en la zona de luz 140 puedan mantenerse otras células que no se superpongan al patrón de luz 142. El término "zona oscura" que se describe aquí puede referirse a una región cuya luminancia sea menor que la luminancia de las regiones adyacentes, mientras que el término "zona de luz" que se describe aquí puede referirse a una región cuya luminancia sea mayor que la luminancia de las regiones adyacentes. Por lo tanto, la zona exterior oscura 142-2 también puede iluminarse con luz siempre que la zona exterior oscura 142-2 se mantenga más oscura que las regiones adyacentes.

La figura 11 es un diagrama esquemático que muestra un método de manipulación de biopartículas en un dispositivo mediante el uso de fuerza eléctrica manipulada por imágenes de acuerdo con otra realización de la presente invención. En la etapa (a), la célula 132 puede identificarse y ubicarse mediante un microscopio cuando fluye a una región predeterminada. Para identificar la célula 132, la célula a clasificar 132 y las células no deseadas 134 pueden teñirse con diferentes tintes fluorescentes antes de que entren en el canal principal. Por lo tanto, la fluorescencia que emite la célula 132 puede ser diferente de la fluorescencia que emite la célula 134. La célula 132 puede distinguirse de otras células 134 mediante el uso de un microscopio de fluorescencia que detecte la fluorescencia que emite de las células 132 y 134. Una vez que se ha identificado y localizado la célula 132, puede aplicarse un campo eléctrico alterno a través de dos electrodos conductores transparentes opuestos, y puede proyectarse luz sobre el material fotosensible para generar una zona de luz 140 en el canal principal 112. Además, el patrón de luz 142 que incluye la zona interior de luz 142-1 y una zona exterior oscura 142-2 se iluminan sobre el material fotosensible donde existe la célula 132. Después, en la etapa (b), la zona exterior oscura 142-2 del patrón de luz 142 puede expandirse. Debido al gradiente de campo eléctrico generado en el borde exterior 144a de la zona exterior oscura 142-2, las células 134 cerca del borde exterior 144a del patrón de luz 142 pueden avanzar adicionalmente para alejarse del centro del patrón de luz 142 durante el proceso de expansión de la zona exterior oscura 142-2. Posteriormente, en la etapa (c), la célula 132 puede moverse hacia un canal lateral moviendo el patrón de luz 142. Durante el movimiento del patrón de luz, el patrón de luz 142 puede repeler todas las células 134 que se encuentren con el borde exterior 144a del patrón de luz en movimiento 142. Por lo tanto, las células 134 fuera del patrón de luz 142 pueden no ser capaces de moverse hacia el canal lateral 114. Finalmente, en la etapa (d), la célula 132 puede penetrar en el borde 140E de la zona de luz 140 y entrar en el lado canal 114. Cabe señalar que, dado que existe un gradiente de campo eléctrico en el borde 140E de la zona de luz 140, las células 134 también pueden ser repelidas por el gradiente de campo eléctrico en el borde 140E y, por lo tanto, no entrar en el canal lateral junto con la célula 132.

La figura 12 es un diagrama esquemático que muestra un método de manipulación de biopartículas en un dispositivo mediante el uso de fuerza eléctrica manipulada por imágenes de acuerdo con todavía otra realización de la presente invención. El método que se describe en la figura 12 es similar al descrito en la figura 11, con la principal diferencia de que la zona exterior oscura 142-2 del patrón de luz 142 es de un anillo incompleto. Es decir, la célula 132 que se superpone al patrón de luz 142 no queda encerrada completamente por la zona exterior oscura 142-2. Durante el movimiento del patrón de luz 142, en la etapa (b), la zona exterior oscura 142-2 puede girar adecuadamente para evitar que las células 134 vayan hacia la zona interior de luz 142-1 a través de la abertura de la zona exterior oscura 142-2 en el proceso de mover el patrón de luz 142. Dado que otras etapas de esta realización son similares a las descritas en la realización de la figura 11, se omite, por lo tanto, la descripción detallada de estas etapas por motivos de brevedad. Cabe señalar que la secuencia de las etapas de mover el patrón de luz 142, girar la zona exterior oscura 142-2, y expandir la zona exterior oscura 142-2 pueden modificarse para cumplir con diferentes requisitos. Además, estas tres etapas también pueden realizarse simultáneamente como alternativa.

En comparación con el método de clasificación descrito en la patente americana nº 2017/0297036, el método de clasificación descrito en la figura 11 y 12 de la presente solicitud es mucho más eficiente y preciso. Se hace referencia a la siguiente Tabla 1 y la figura 13. Las fotografías (a-1) a (a-3) de la figura 13 corresponden al método de clasificación descrito en US 2017/0297036. Las fotografías (a-1) y (a-2) son imágenes tomadas por un microscopio óptico, que muestran que las biopartículas (véase los "puntos") se clasifican en un canal de recogida. Sin embargo, tal como se muestra en la fotografía (a-3) que se observa a través de un microscopio de fluorescencia, muchas biopartículas no deseadas (véase los "puntos brillantes rodeados por un círculo") también se clasifican en el canal de recogida. Las fotografías (b-1) a (b-3) de la figura 13 corresponden al método de clasificación descrito en la presente solicitud. Las fotografías (b-1) y (b-2) son imágenes tomadas por un microscopio óptico que muestran que las biopartículas (véase los "puntos") se clasifican en un canal de recogida. Además, tal como se muestra en la fotografía (b-3) que se observa a través de un microscopio de fluorescencia, ninguna de las biopartículas no deseadas se clasifica en el canal de recogida. Por tanto, las fotografías muestran que la precisión de clasificación de la presente solicitud es mucho mejor que la de las técnicas convencionales.

Además, de acuerdo con los resultados mostrados en la Tabla 1, para el método descrito en US 2017/0297036, el tiempo de clasificación por célula es de aproximadamente 139,2 (s) y la precisión es de aproximadamente sólo un 60,4%. La baja precisión significa que las células no deseadas no son barridas completamente por la barra de luz y, por lo tanto, algunas de las células no deseadas pueden fluir hacia la región de recogida junto con las células que se van a clasificar. Por el contrario, de acuerdo con el método de clasificación descrito en la presente invención, el tiempo de clasificación por célula se reduce a aproximadamente 72,1 (s) y la precisión aumenta hasta el 100%.

TABLA 1

	Ejemplos comparativos			Ejemplos ejemplares		
	1	2	3	1	2	3
Biopartículas identificadas (n°)	10	10	10	10	10	10
Biopartículas no deseadas (n°)	5	8	7	0	0	0
Pureza med. (%)		60,4 ± 5,7			100	
Tiempo med. de separación por biopartícula (seg)		139,2 ± 32.			72,1 ± 12,2	

La figura 14 es una vista superior esquemática de un dispositivo que tiene varios canales fluidicos de acuerdo con una realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 14 es similar al mostrado en la figura 1, con la principal diferencia de que el dispositivo mostrado en la figura 14 incluye, además, otros canales microfluidicos, tales como un canal lateral 114 y un canal de recogida 116. Dos extremos del canal lateral 114 pueden estar conectados al canal principal 112 y al canal de recogida 116, respectivamente. Durante el funcionamiento del dispositivo 100, las células a clasificar pueden clasificarse desde el canal principal 112 a través del canal lateral 114 hasta el canal de recogida 116 y almacenarse temporalmente en el canal de recogida 116. Si el número de células que se almacenan en el canal de recogida 116 supera un valor determinado o en cualquier momento por propia voluntad del usuario, estas células pueden salir, además, por tampón desde un orificio de entrada del tampón 150-1 al canal de recogida 116 y drenarse a través de un orificio de recogida 150-2 hasta un tubo de ensayo. Además, la relación de la anchura del canal principal, el canal lateral y el canal de recogida se encuentra en un rango de entre 1:1:1 y 10:1:10, tal como 1:1:1, 2:1:2 y 10:1:10, pero sin limitarse a estos. La ventaja de la presente realización es que la célula a clasificar puede almacenarse en el canal de recogida 116 temporalmente de modo que el proceso de clasificación realizado en el canal principal 112 puede llevarse a cabo consecutivamente sin ser interrumpido. Además, el dispositivo 100 puede utilizarse para clasificar diferentes tipos de células. Por ejemplo, en una primera ronda del proceso de clasificación, puede recogerse un grupo de células del mismo tipo en el canal de recogida 116 y después fluir hacia el tubo de ensayo. Después, en una segunda ronda del proceso de clasificación, puede recogerse un grupo de células de otro tipo en el canal de recogida 116 y después fluir hacia el tubo de ensayo. La figura 15 muestra un resultado operativo de los dispositivos de clasificación que tienen una relación de anchura diferente del canal principal, el canal lateral y el canal de recogida. El resultado mostrado en la figura 15 muestra que, si las relaciones de anchura se diseñan dentro del rango anterior de acuerdo con el experimento, el fluido en el canal principal 112 y el canal de recogida 116 pueden no fluir hacia el canal lateral 114 cuando el fluido fluye en el canal principal 112 y/o el canal de recogida 116, para evitar así que las células no deseadas fluyan hacia el canal de recogida 116 desde el canal principal 112, y viceversa.

La figura 16 es una vista superior esquemática de un dispositivo que tiene un canal principal curvo de acuerdo con otra realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 16 es similar al mostrado en la figura 1, con la principal diferencia de que el dispositivo mostrado en la figura 16 incluye, además, un canal principal curvo 112 y un canal lateral 114. Un extremo del canal lateral 114 está conectado a un ápice del canal principal curvo 112. De acuerdo con esta realización, los datos del experimento muestran que el caudal R1 en la curva exterior del canal principal curvo 112 menor que el caudal R2 en la curva interior del canal principal curvo 112. Por ejemplo, para que el fluido tenga un caudal lineal de 9×10^{-9} mm/min, el caudal R1 puede ser $1,7 \times 10^{-12}$ mm/min y el caudal R2 puede ser $4,7 \times 10^{-9}$ mm/min. Por lo tanto, si las células se clasifican en la intersección del canal principal curvo 112, el proceso de clasificación puede ser más efectivo debido al menor caudal en esta región y es más probable que se evite que el fluido del canal principal curvo 112 fluya hacia el canal lateral 114. En la figura 17 se muestran los datos del experimento, que muestra que el caudal cerca de la curva exterior del canal principal curvo es menor que el caudal cerca de la curva interior del canal principal curvo.

La figura 18 es una vista superior esquemática de un dispositivo que tiene un canal principal curvo y un canal de recogida curvo de acuerdo con todavía otra realización de la presente invención. El dispositivo 100 mostrado en la figura 18 puede considerarse como una integración de las estructuras mostradas en la figura 14 y la figura 16. La ventaja de la realización mostrada en la figura 18 es que la célula a clasificar puede almacenarse temporalmente en el canal de recogida curvo de modo que el proceso de clasificación realizado en el canal principal 112 puede llevarse a cabo consecutivamente sin ser interrumpido. Además, el dispositivo 100 puede utilizarse para clasificar diferentes tipos de células. Además, el flujo en el canal principal 112 y el canal de recogida 116 puede ser un flujo laminar, lo que significa que el fluido en el canal principal 112 y el canal de recogida 116 puede no fluir hacia el canal lateral 114 durante el flujo del fluido, para evitar, de este modo, que las células no deseadas fluyan hacia el canal de recogida

116 desde el canal principal 112, y viceversa. Además, dado que el caudal R1 en la curva exterior del canal principal curvo 112 es menor que el caudal R2 en la curva interior del canal principal curvo 112, el proceso de clasificación puede ser más eficaz cuando las células se clasifican en la intersección del canal principal curvo 112 y el canal lateral 114.

5 Aunque en esta memoria se han descrito realizaciones y aplicaciones específicas de la invención, estas realizaciones y aplicaciones se dan sólo a modo de ejemplo y son posibles muchas variaciones. El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (100) para clasificar biopartículas mediante fuerza eléctrica manipulada por imágenes, que comprende:

- 5 un primer sustrato (102) que comprende un primer electrodo conductor (106);
 un segundo sustrato (104) que comprende un segundo electrodo conductor (108), en el que el segundo electrodo conductor está dispuesto frente al primer electrodo conductor;
 un canal fluídico (112) dispuesto entre el primer electrodo conductor y el segundo electrodo conductor;
 una o más capas fotosensibles (110) dispuestas de manera conformal sobre por lo menos una de las superficies
 10 del primer electrodo conductor y el segundo electrodo conductor; y
 un orificio de entrada (120-1) dispuesto en el primer electrodo conductor y en el primer sustrato, en el que el orificio de entrada comprende una primera abertura (O1) cerca del canal fluídico y una segunda abertura (O2) alejada del canal fluídico;
 caracterizado por el hecho de que:
 15 un área de superficie (A1) de la primera abertura es mayor que un área de superficie (A2) de la segunda abertura.

2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado, además, por un orificio de salida (122-1) dispuesto en el primer electrodo conductor y en el primer sustrato, en el que el orificio de salida comprende una tercera
 20 abertura (O1) cerca del canal fluídico y una cuarta abertura (O2) alejada del canal fluídico, y un área de superficie (A1) de la tercera abertura es mayor que un área de superficie (A2) de la cuarta abertura.

3. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado, además, por al menos dos orificios pasantes de forma cilíndrica (120-2, 122-2) dispuestos en el primer sustrato y conectados respectivamente a la segunda abertura
 25 del orificio de entrada y la cuarta abertura del orificio de salida.

4. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado, además, por un orificio de salida (122-1) dispuesto en el segundo electrodo conductor y en el segundo sustrato, en el que el orificio de salida comprende una tercera
 30 abertura (O1) cerca del canal fluídico y una cuarta abertura (O2) alejada del canal fluídico, y un área de superficie (A1) de la tercera abertura es mayor que un área de superficie (A2) de la cuarta abertura.

5. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado por el hecho de que el orificio de entrada comprende unas áreas de sección transversal variable que se reducen gradualmente desde la primera
 35 abertura hasta la segunda abertura, y el orificio de salida comprende unas áreas de sección transversal variable que se reducen gradualmente desde la tercera abertura hasta la cuarta abertura.

6. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por el hecho de que el primer sustrato y el segundo sustrato comprenden respectivamente una superficie interior (102-1, 104-1), y el primer
 40 electrodo conductor y el segundo electrodo conductor están soportados respectivamente por las superficies interiores.

7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado por el hecho de que una de las capas fotosensibles (110-1) está dispuesta de manera conformal sobre la superficie del primer electrodo conductor, y otra
 45 de las capas fotosensibles (110-2) está dispuesta de manera conformal sobre la superficie del segundo electrodo conductor.

8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por el hecho de que el canal fluídico comprende un canal principal (112) y un canal lateral (114), y un extremo del canal lateral está conectado al canal
 50 principal.

9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por el hecho de que el canal fluídico comprende un canal principal curvo (112) y un canal lateral (114), y un extremo del canal lateral está conectado a un
 ápice del canal principal curvo.

10. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 y 9, caracterizado por el hecho de que el canal fluídico comprende, además, un canal de recogida (116) conectado a otro extremo del canal lateral, en el que una
 55 relación entre la anchura de canal del canal principal y la anchura de canal del canal lateral es entre 1:1 y 10:1, en el que una relación entre la anchura de canal del canal lateral y la anchura de canal del canal de recogida es entre 1:1 y 1:10.

11. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizado por el hecho de que el canal fluídico es un canal semipermeable configurado para permitir la difusión de iones del interior del canal fluídico fuera
 60 del canal fluídico.

12. Dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-11, caracterizado, además, por una capa intermedia (128) dispuesta entre el primer sustrato y el segundo sustrato, en el que el canal fluídico está dispuesto en la capa intermedia, y la capa intermedia está realizada en un material biocompatible.
- 5 13. Método de funcionamiento del dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado por el hecho de que el canal fluídico comprende un canal principal (112) y un canal lateral (114) conectado al canal principal, y el método comprende las etapas de:
- 10 (a) proporcionar un líquido (130) que comprende una pluralidad de biopartículas (132, 134) al canal principal a través del orificio de entrada;
- (b) identificar las biopartículas cuando las biopartículas fluyen a una región de clasificación del canal principal;
- (c) reducir el caudal del líquido o detener el flujo del líquido después de que se han identificado las biopartículas;
- (d) colocar las biopartículas después de la etapa (c);
- 15 (e) iluminar una zona de luz (140) en la región de clasificación;
- (f) iluminar un patrón de luz (142) que tiene una zona oscura (142-2) en la región de clasificación, en el que el patrón de luz se superpone a por lo menos a una de las biopartículas, y la zona oscura tiene una luminancia más oscura que una luminancia de una región adyacente a la zona oscura; y
- 20 (g) mover el patrón de luz para mover la biopartícula superponiéndose al patrón de luz.
14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizado por el hecho de que, en la etapa (e), un área de la zona de luz es mayor que la mitad de un área del canal principal, y el método comprende, además, la etapa de:
- (h) expandir un área de la zona oscura cuando la zona de luz es iluminada sobre la región de clasificación.
- 25 15. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 y 14, caracterizado, además, por la etapa de:
- (i) expandir el área de la zona oscura hasta que un borde exterior de la zona oscura alcanza un borde de la zona de luz.
- 30 16. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13-15, caracterizado por el hecho de que el canal fluídico comprende, además, un canal de recogida (116) conectado al canal lateral, y el método comprende, además, la etapa de:
- (j) mover la biopartícula superponiéndose al patrón de luz al canal de recogida.

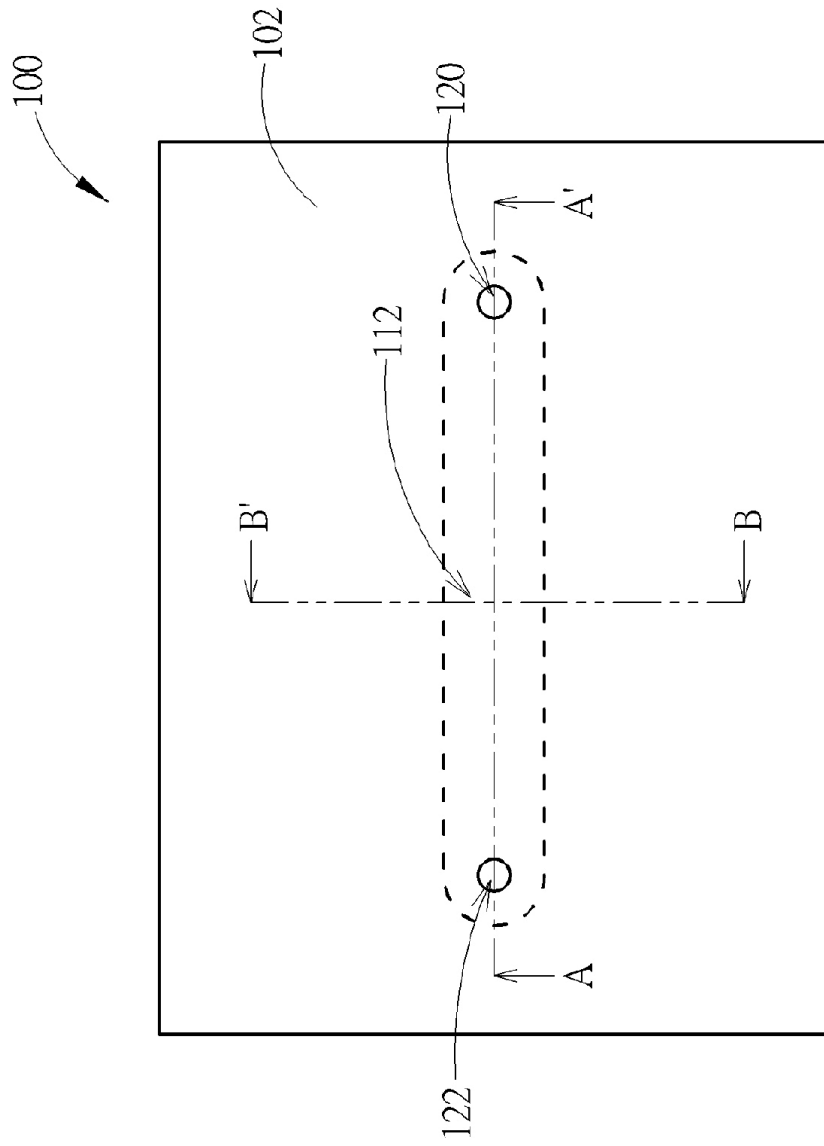


FIG. 1

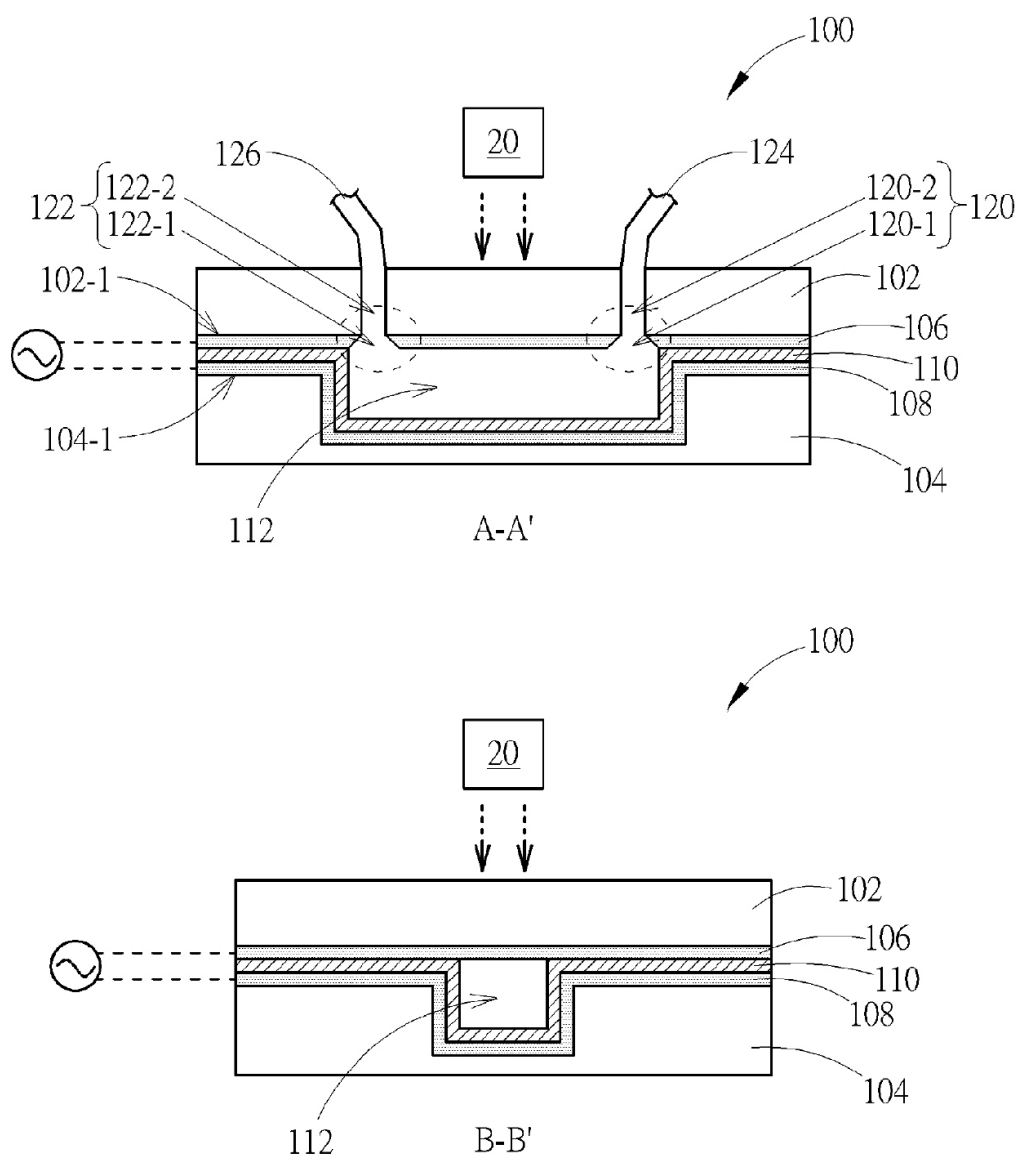


FIG. 2

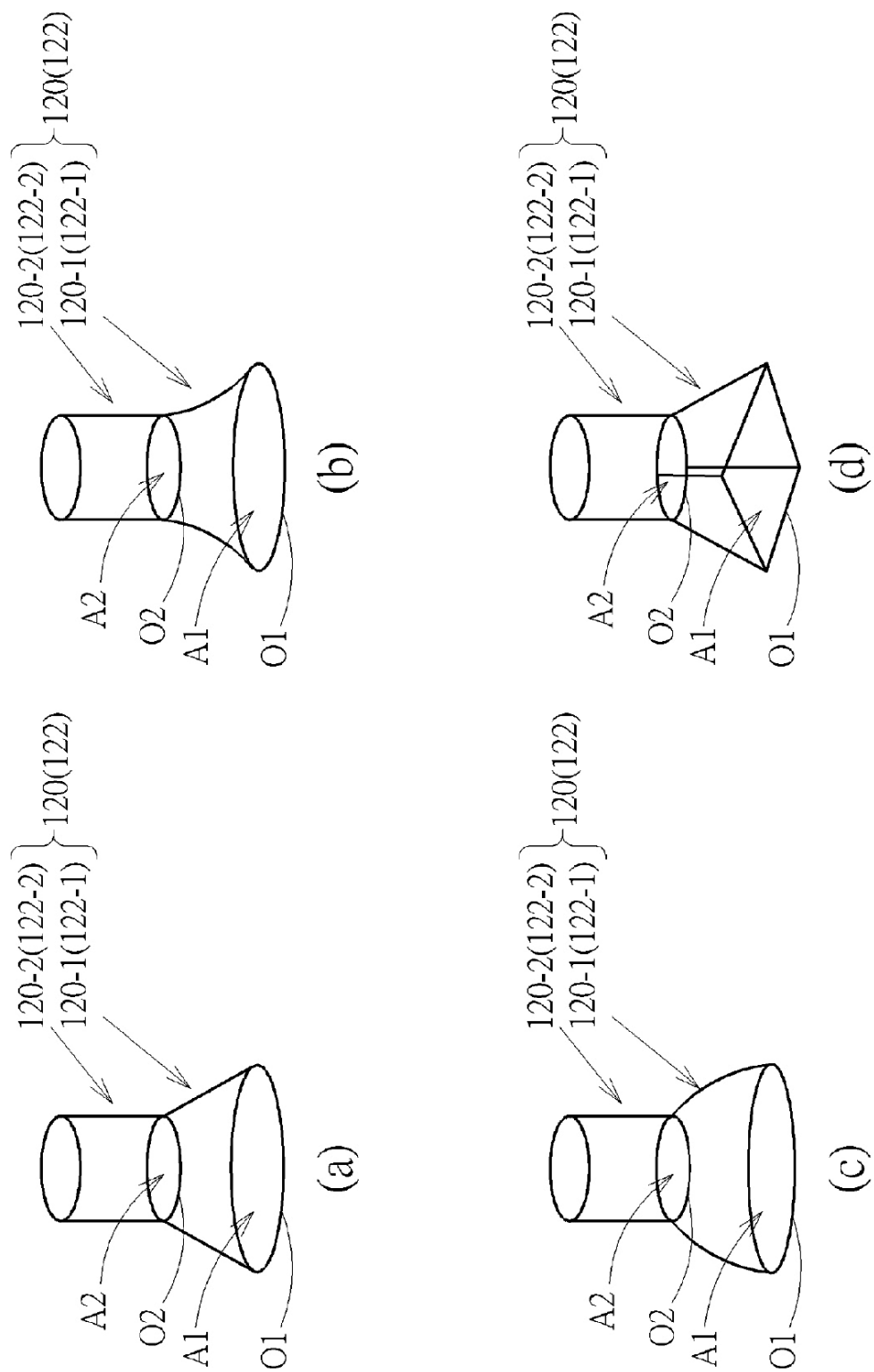


FIG. 3

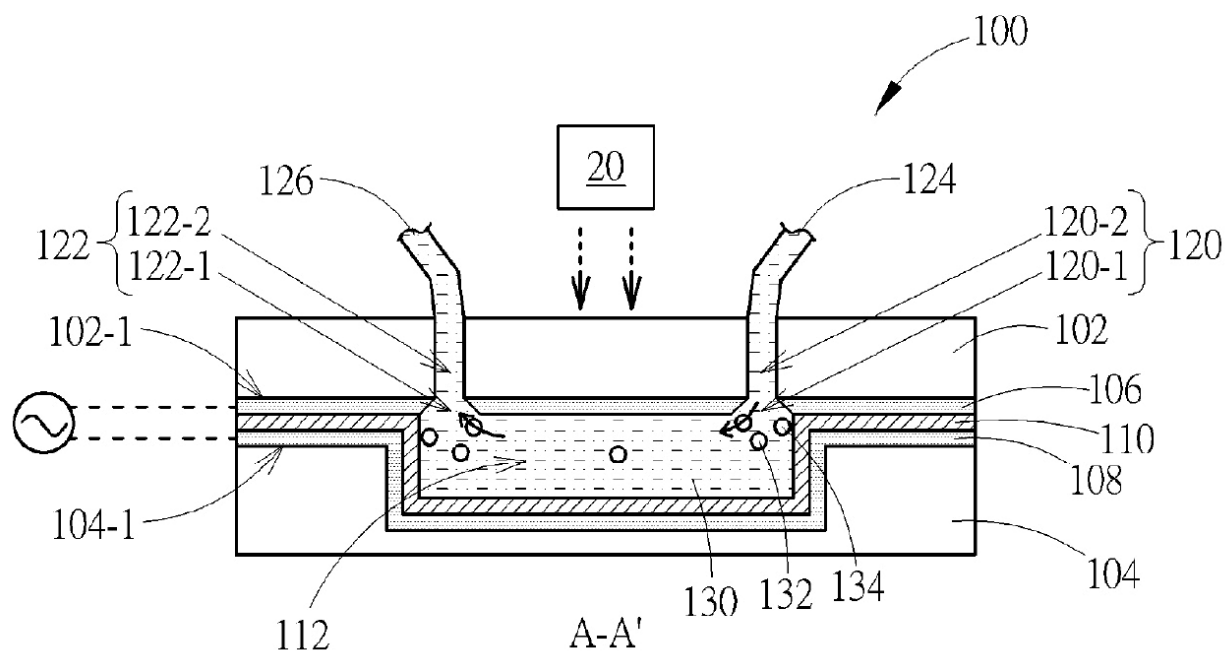


FIG. 4

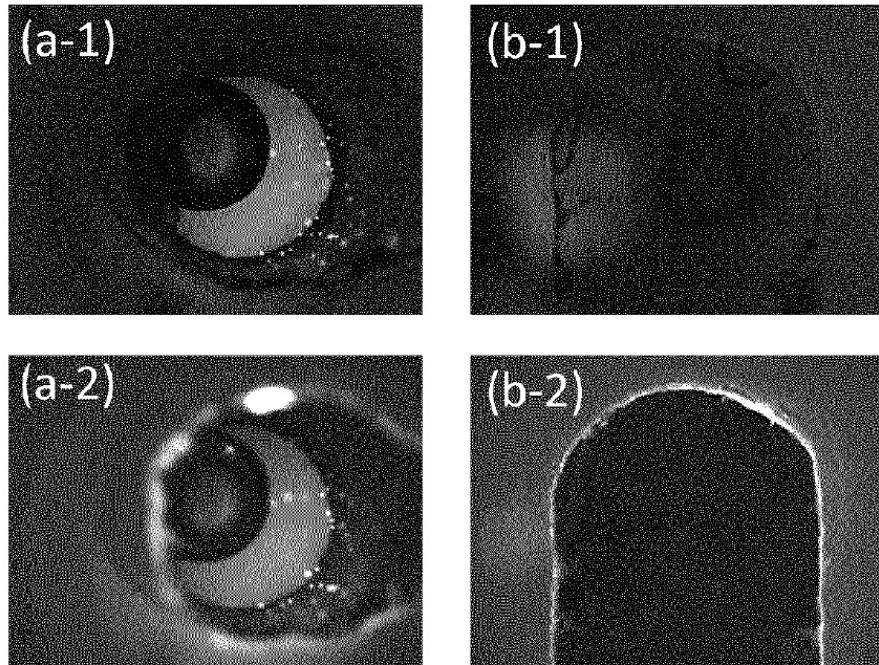


FIG. 5

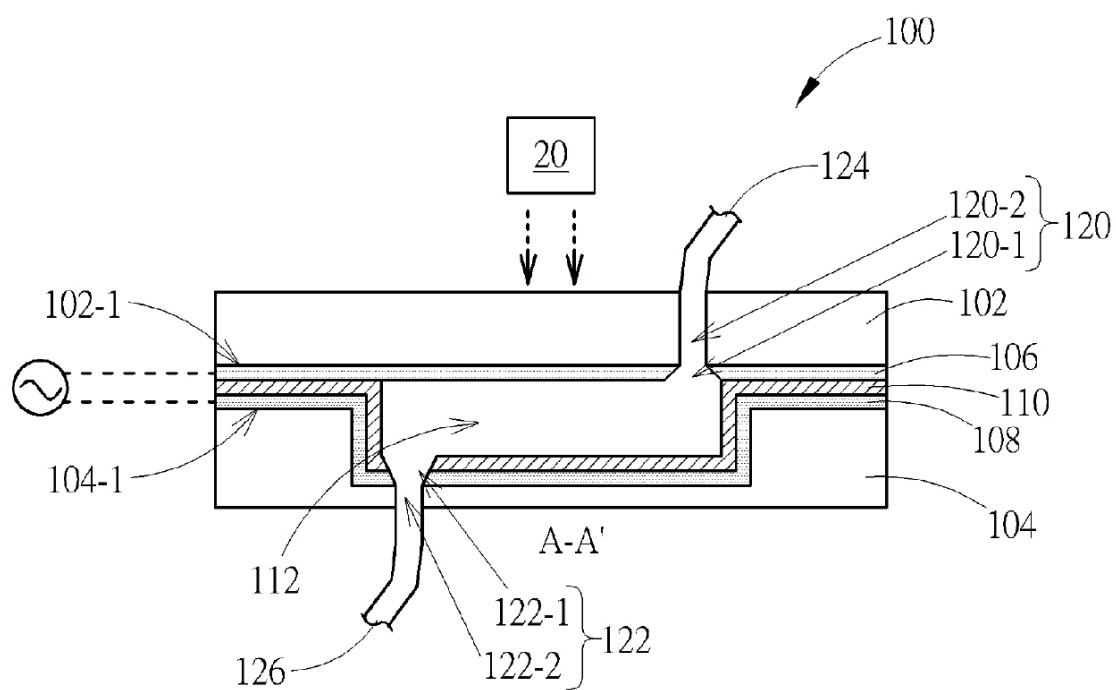


FIG. 6

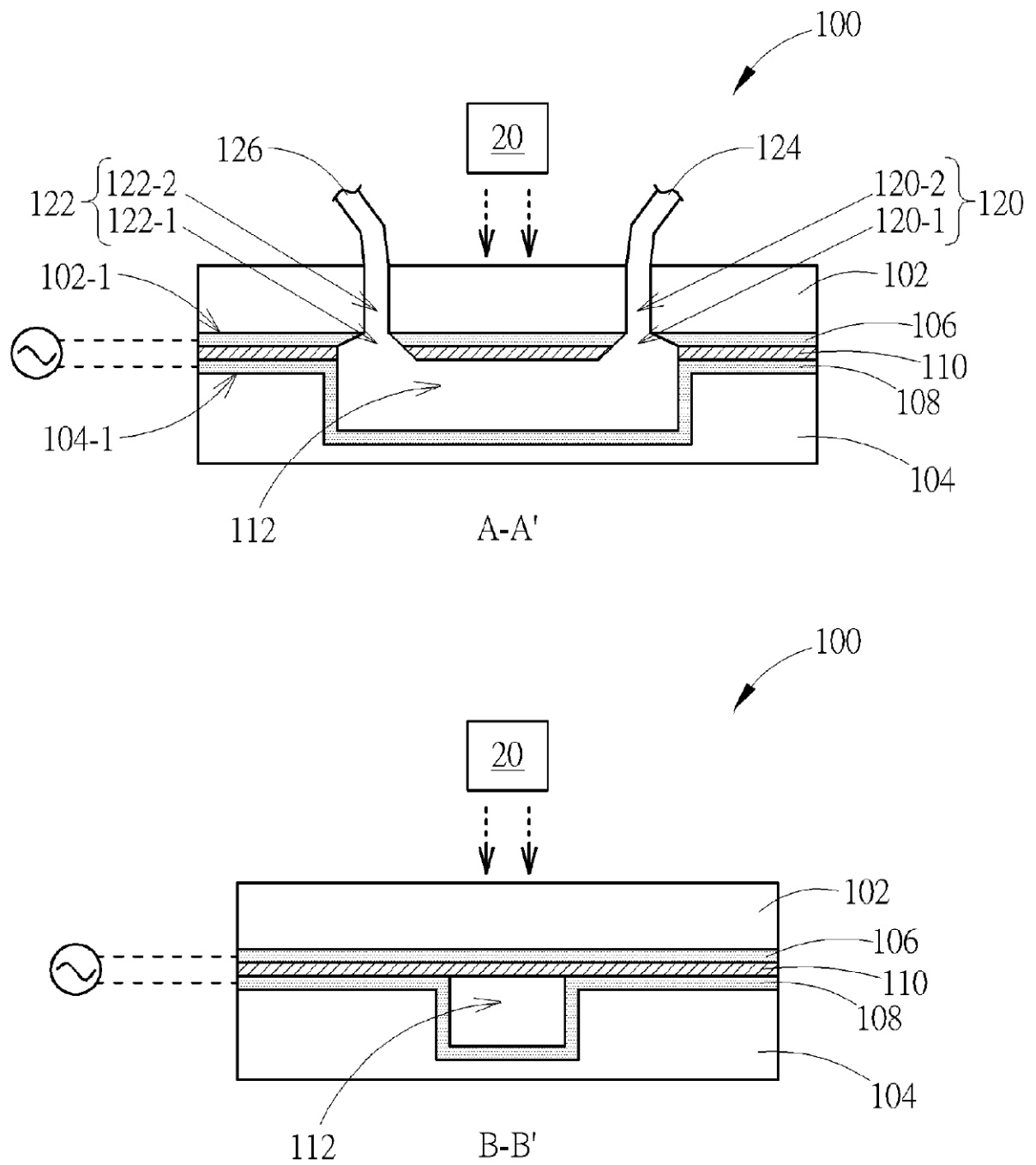


FIG. 7

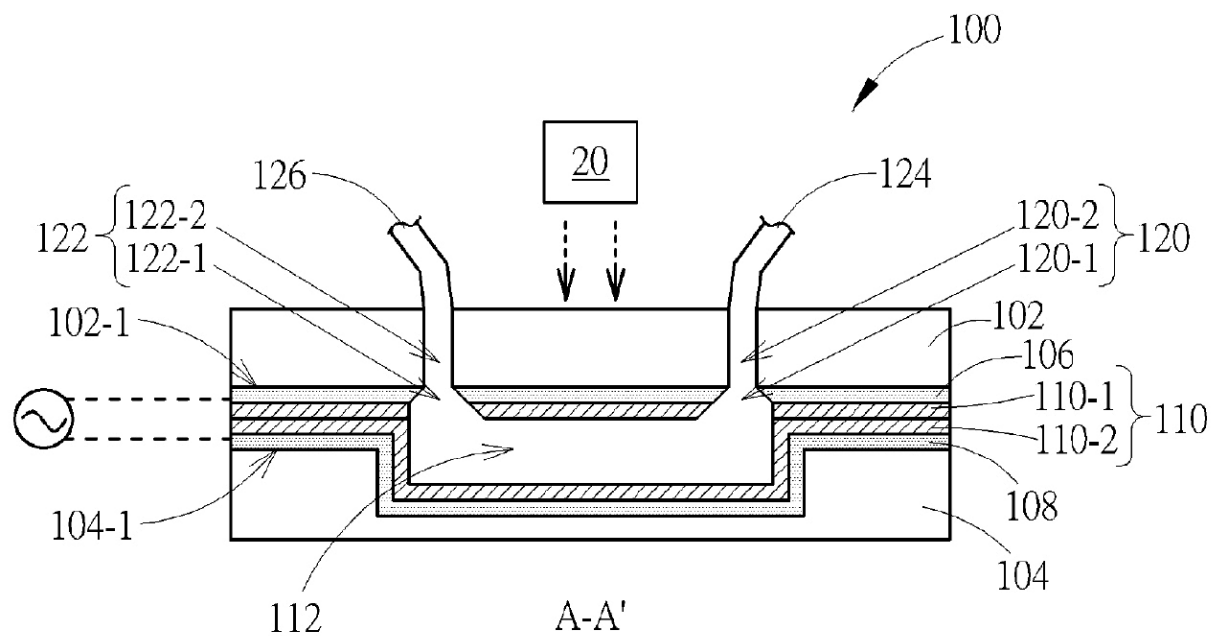


FIG. 8

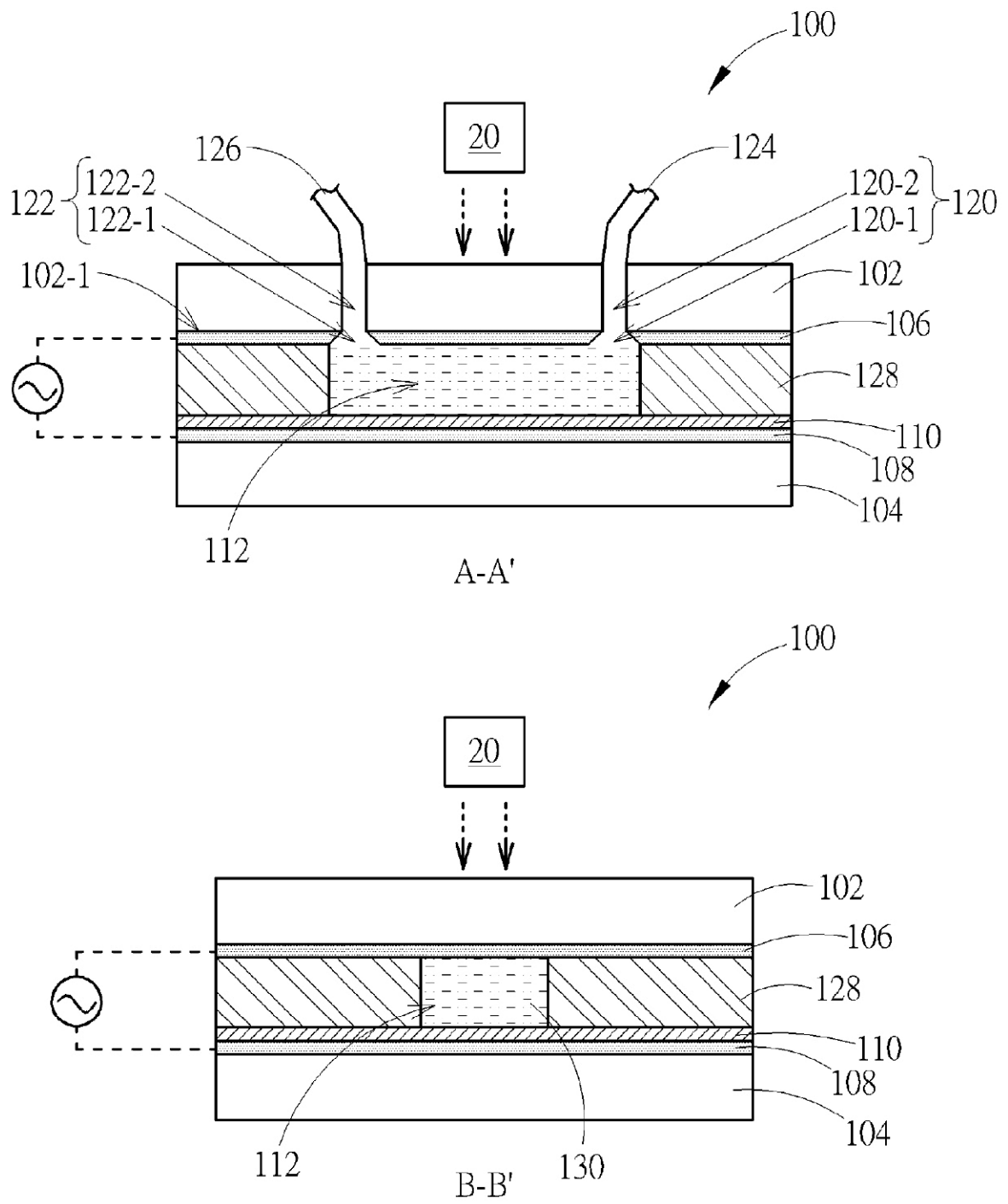


FIG. 9

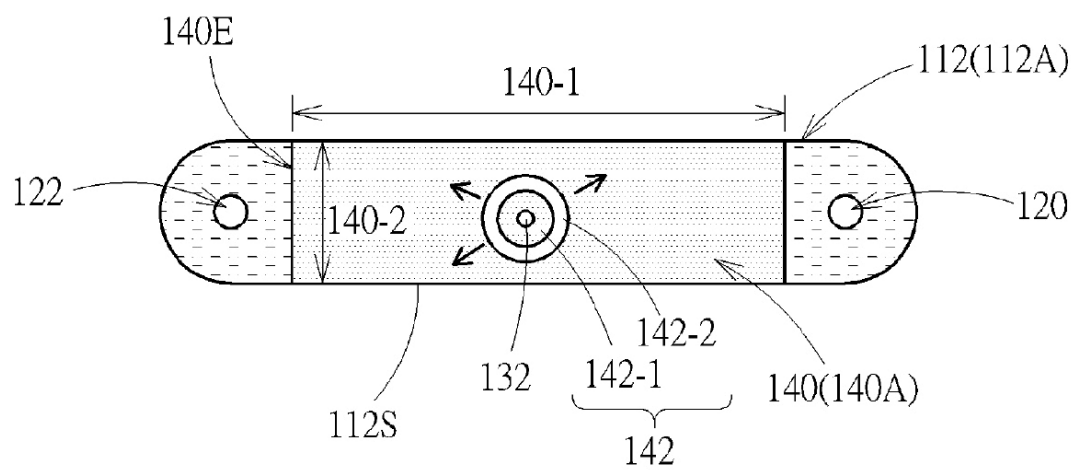
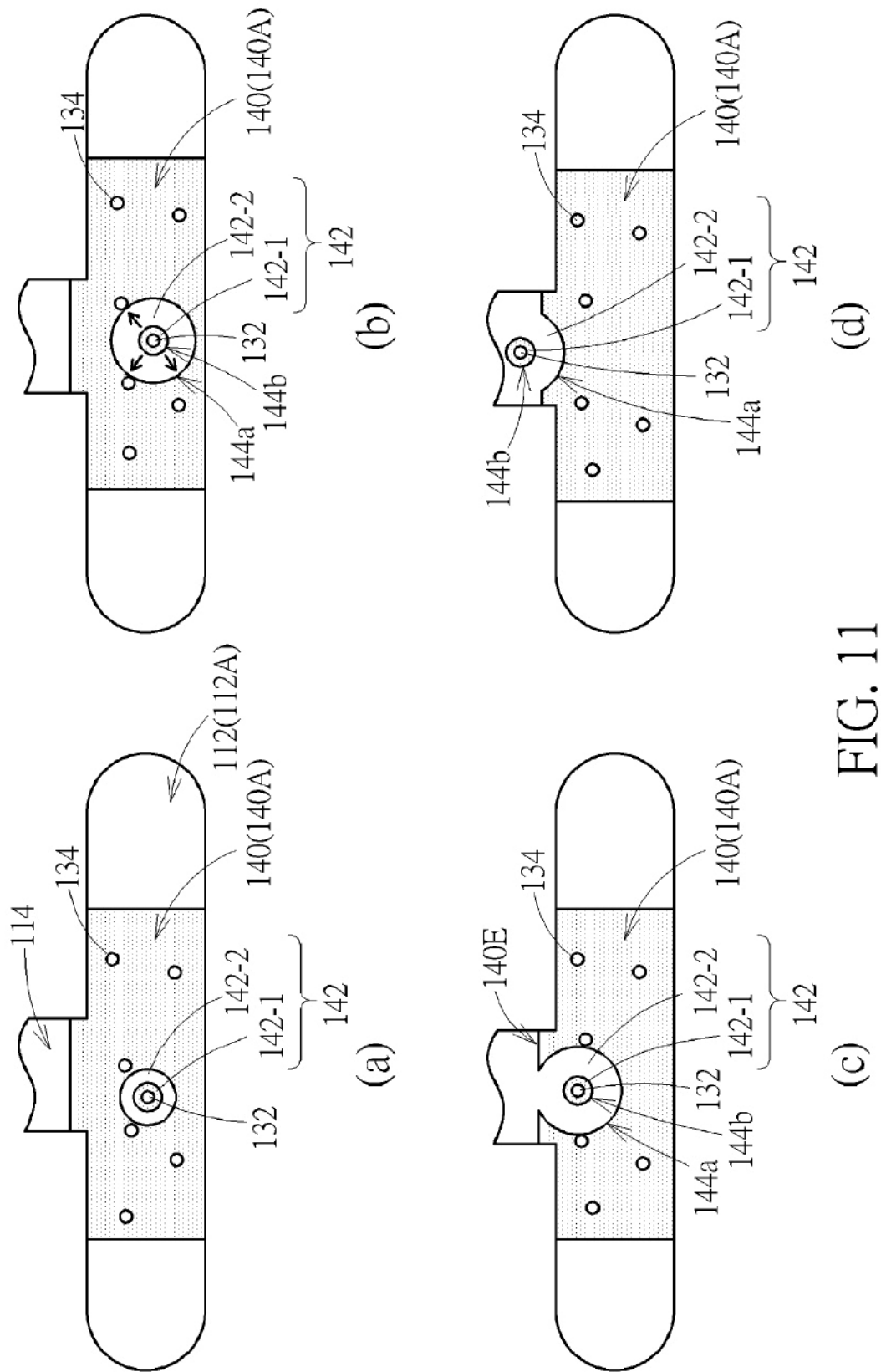


FIG. 10



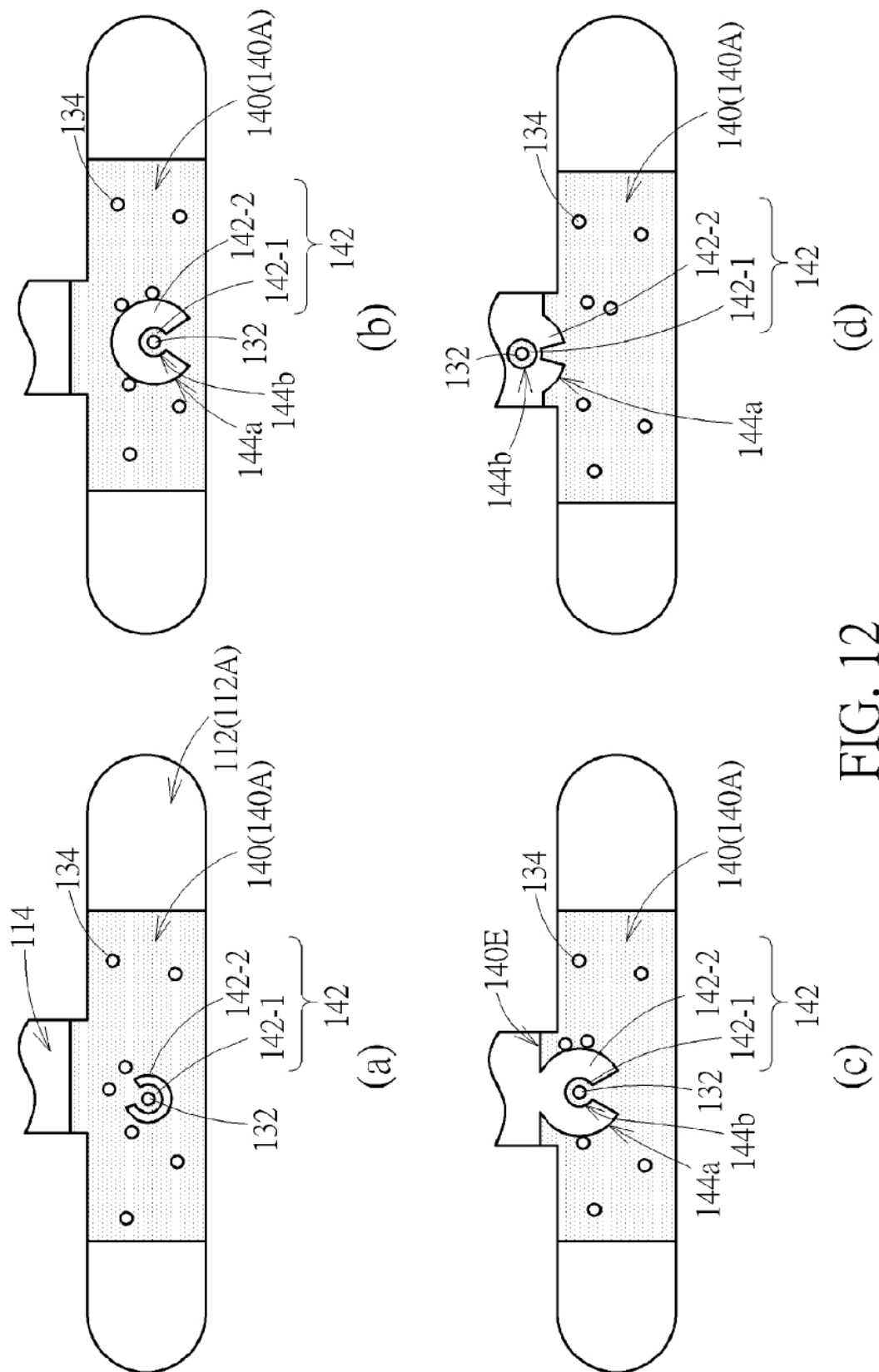


FIG. 12

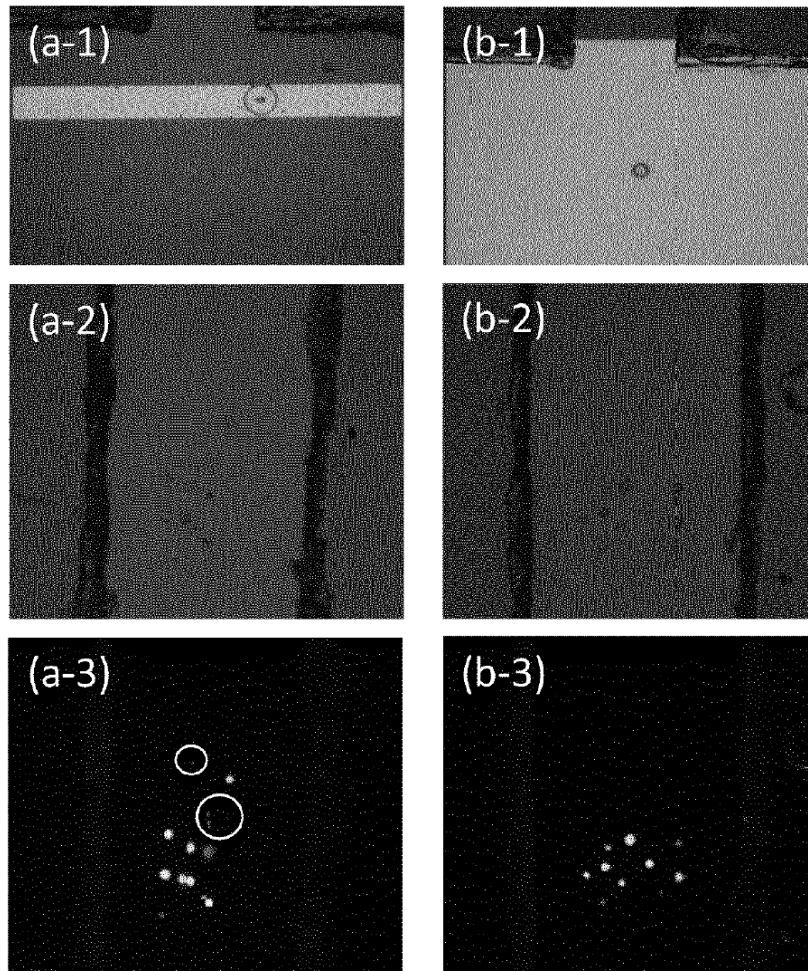


FIG. 13

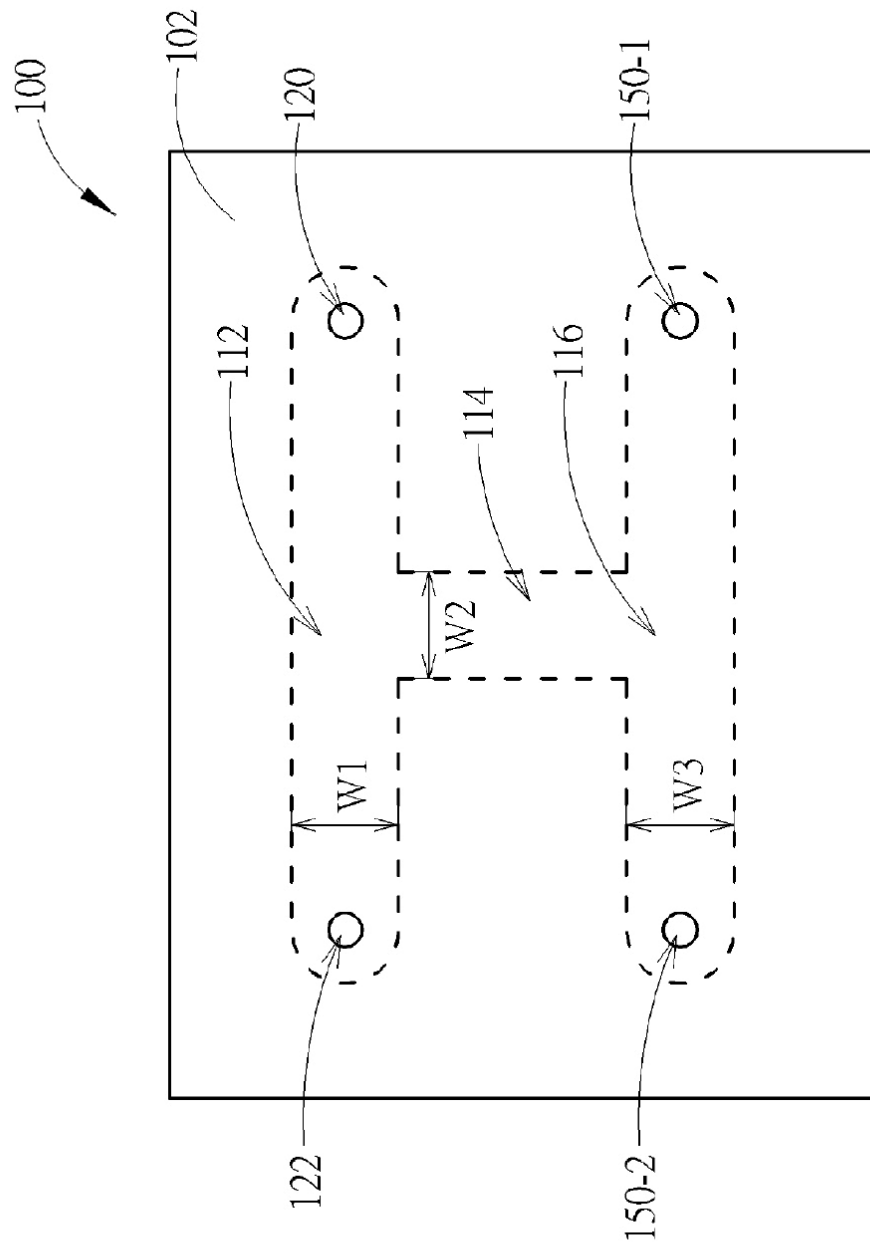


FIG. 14

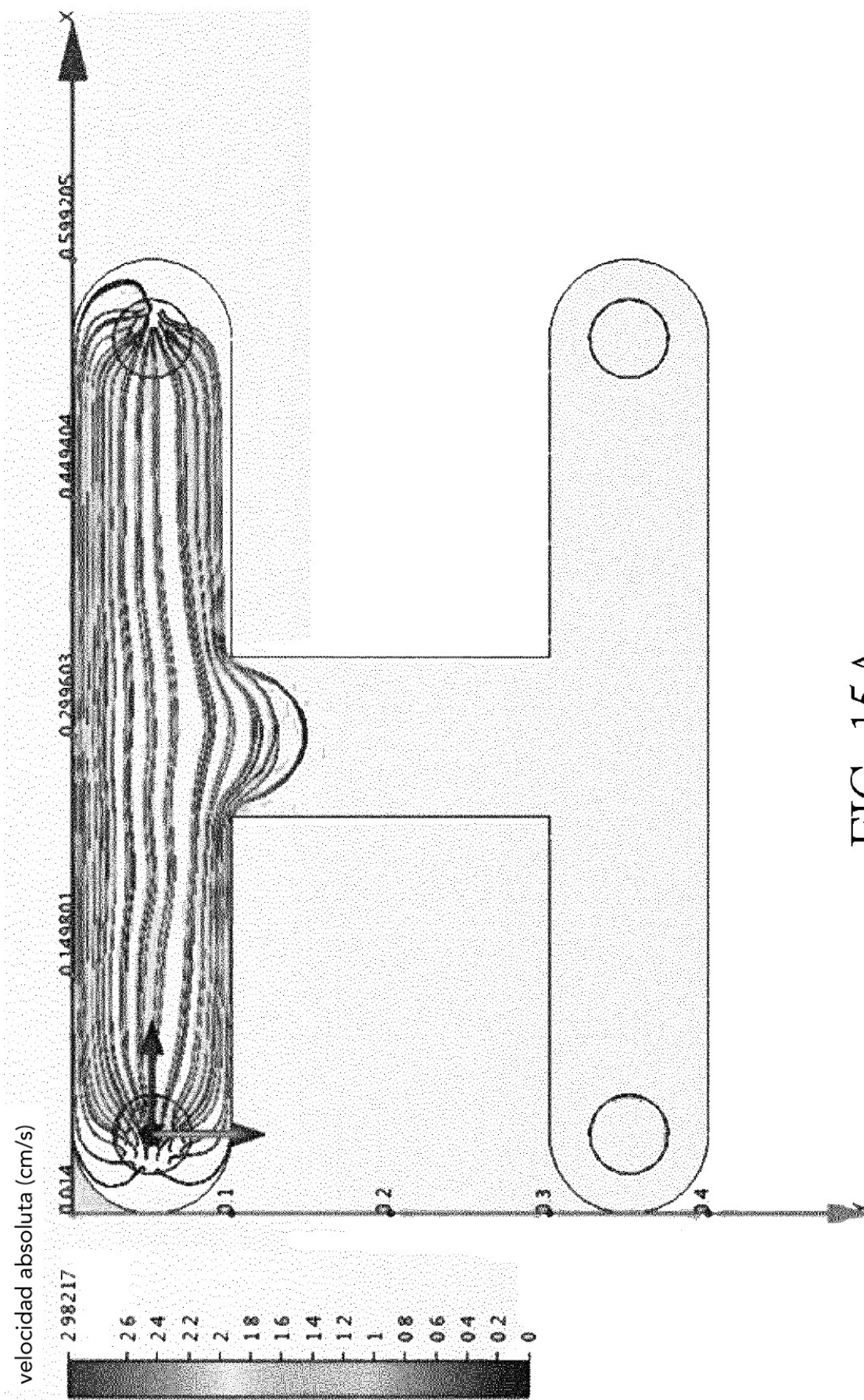


FIG. 15A

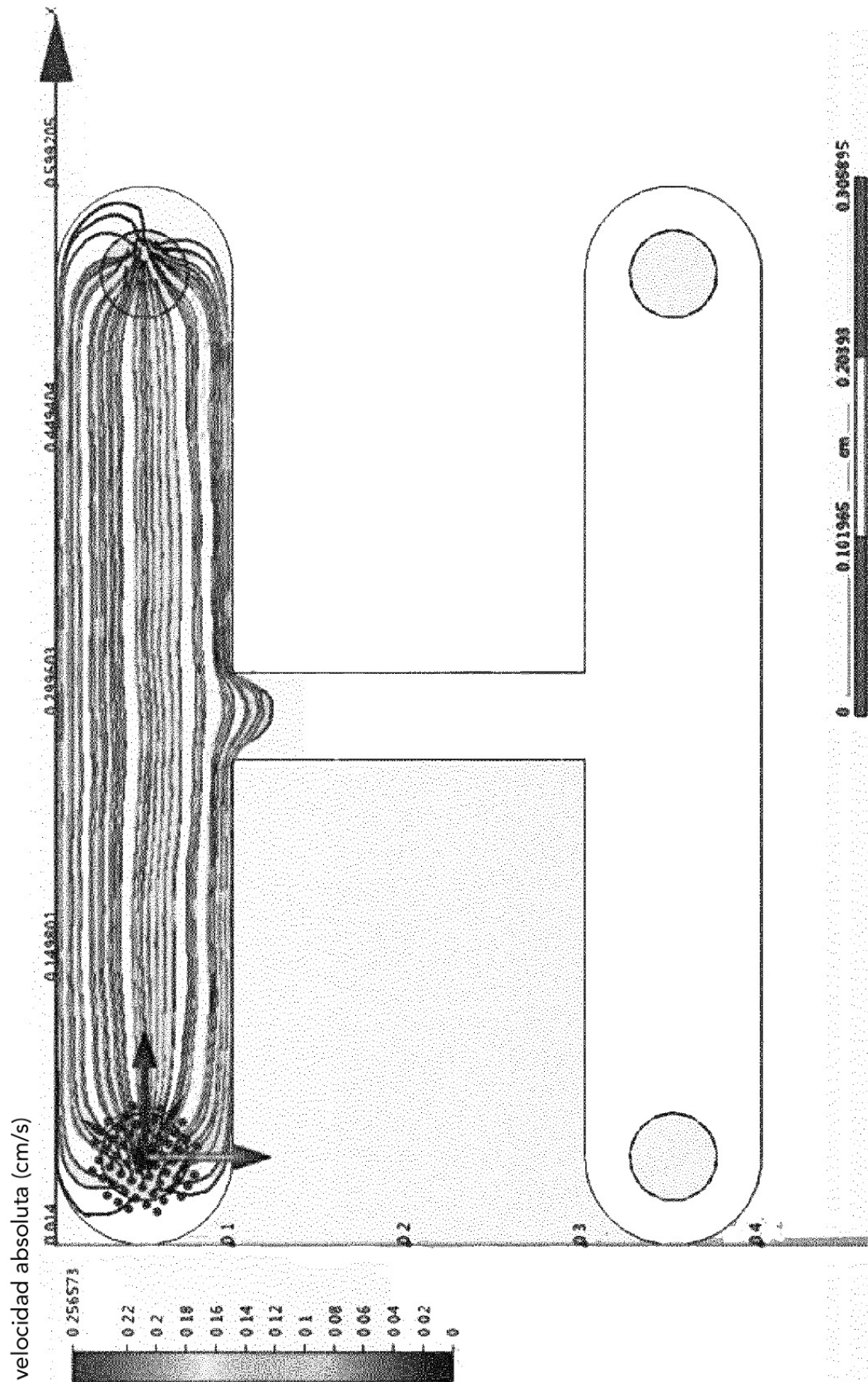


FIG. 15B

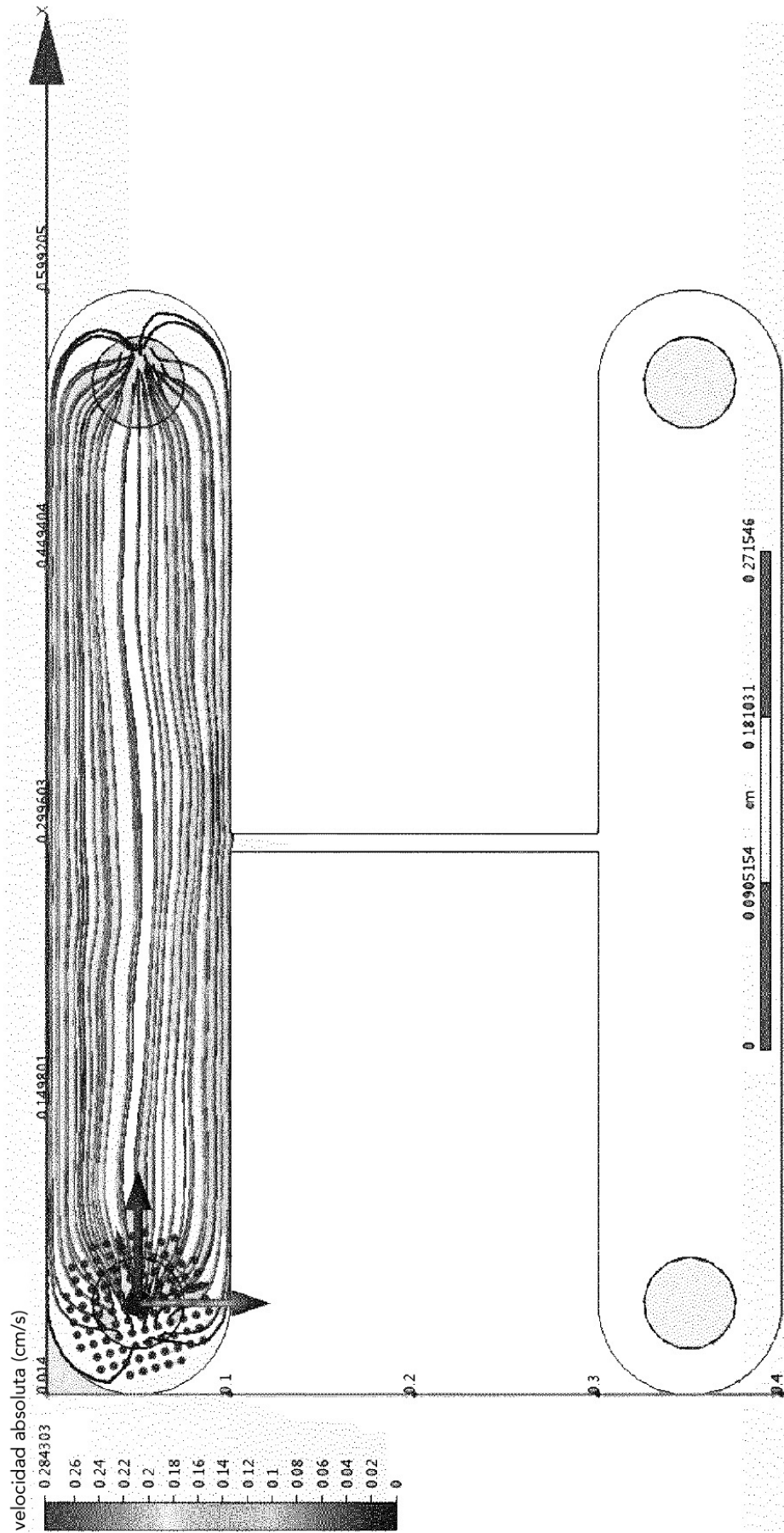


FIG. 15C

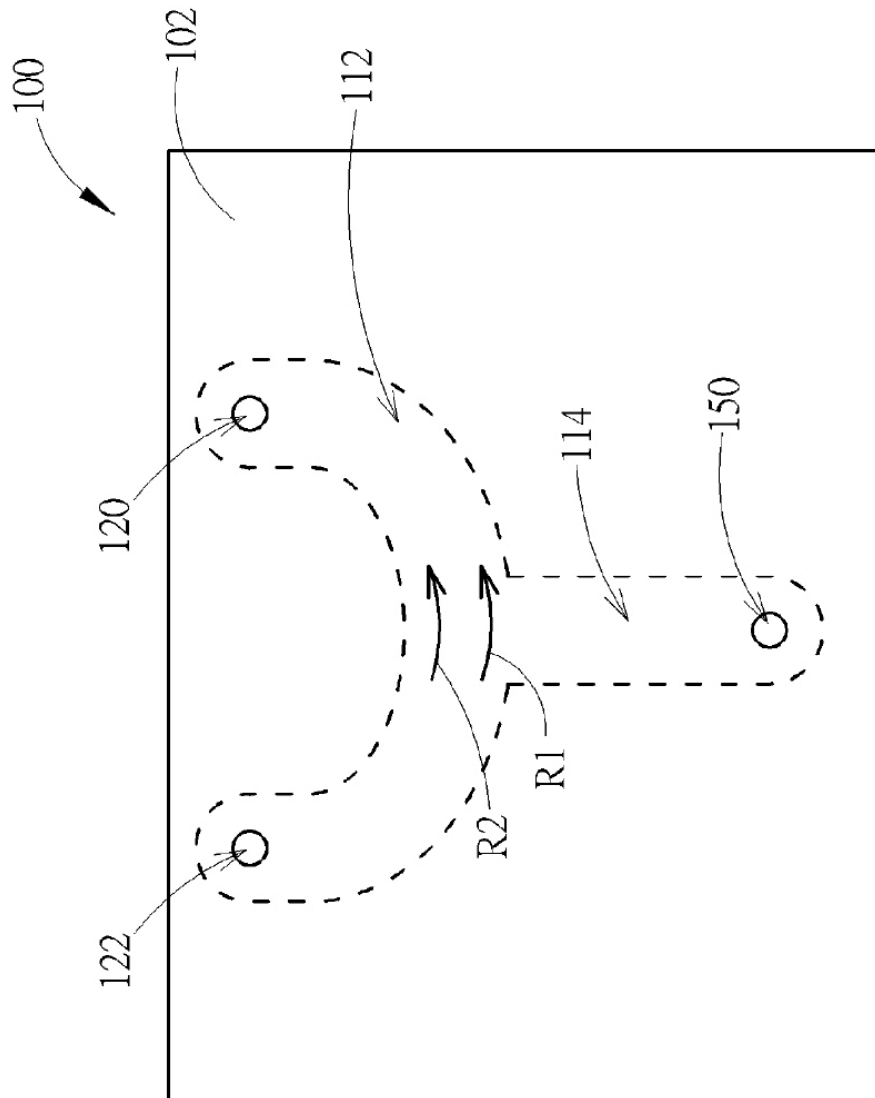


FIG. 16

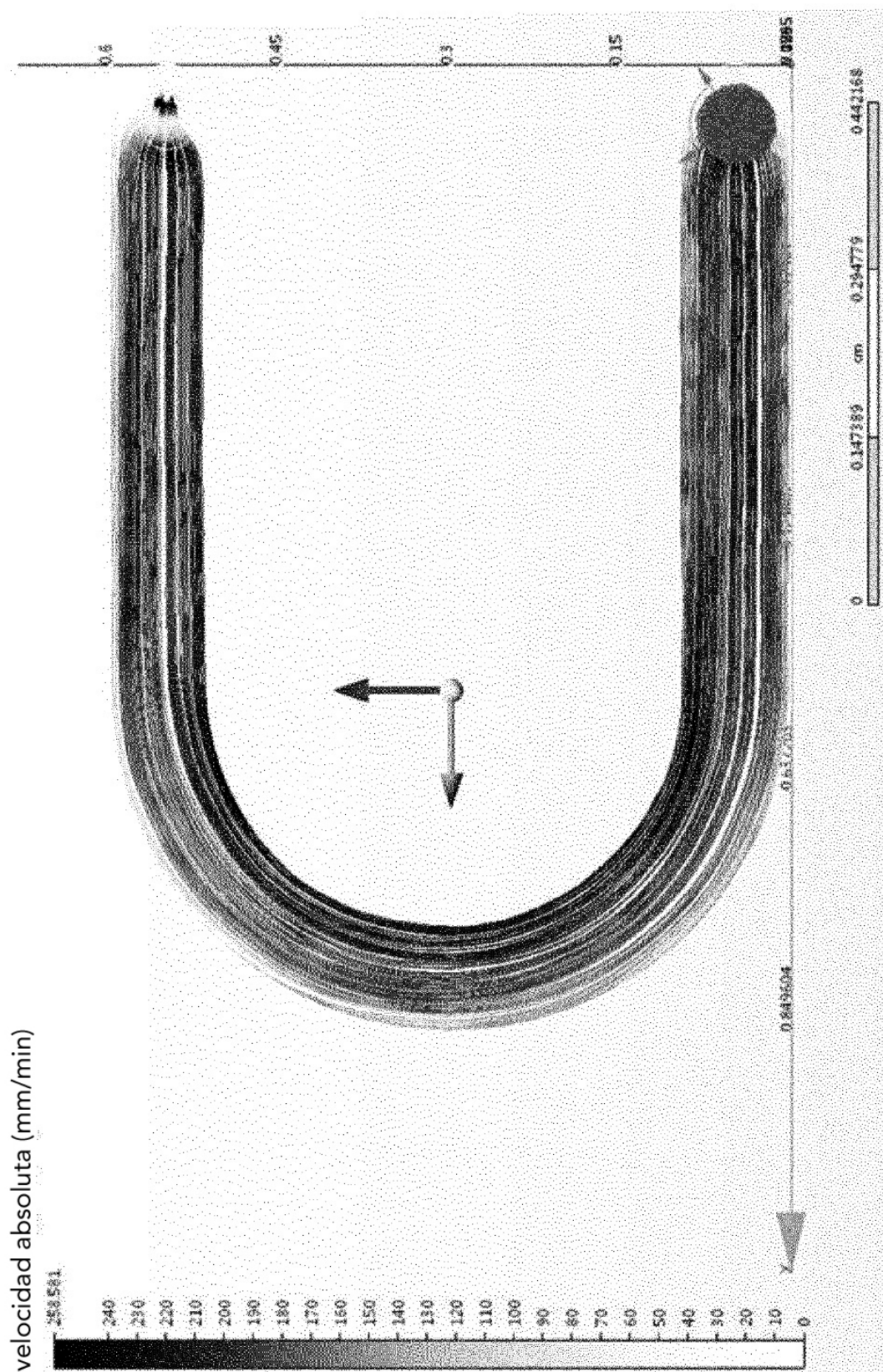


FIG. 17

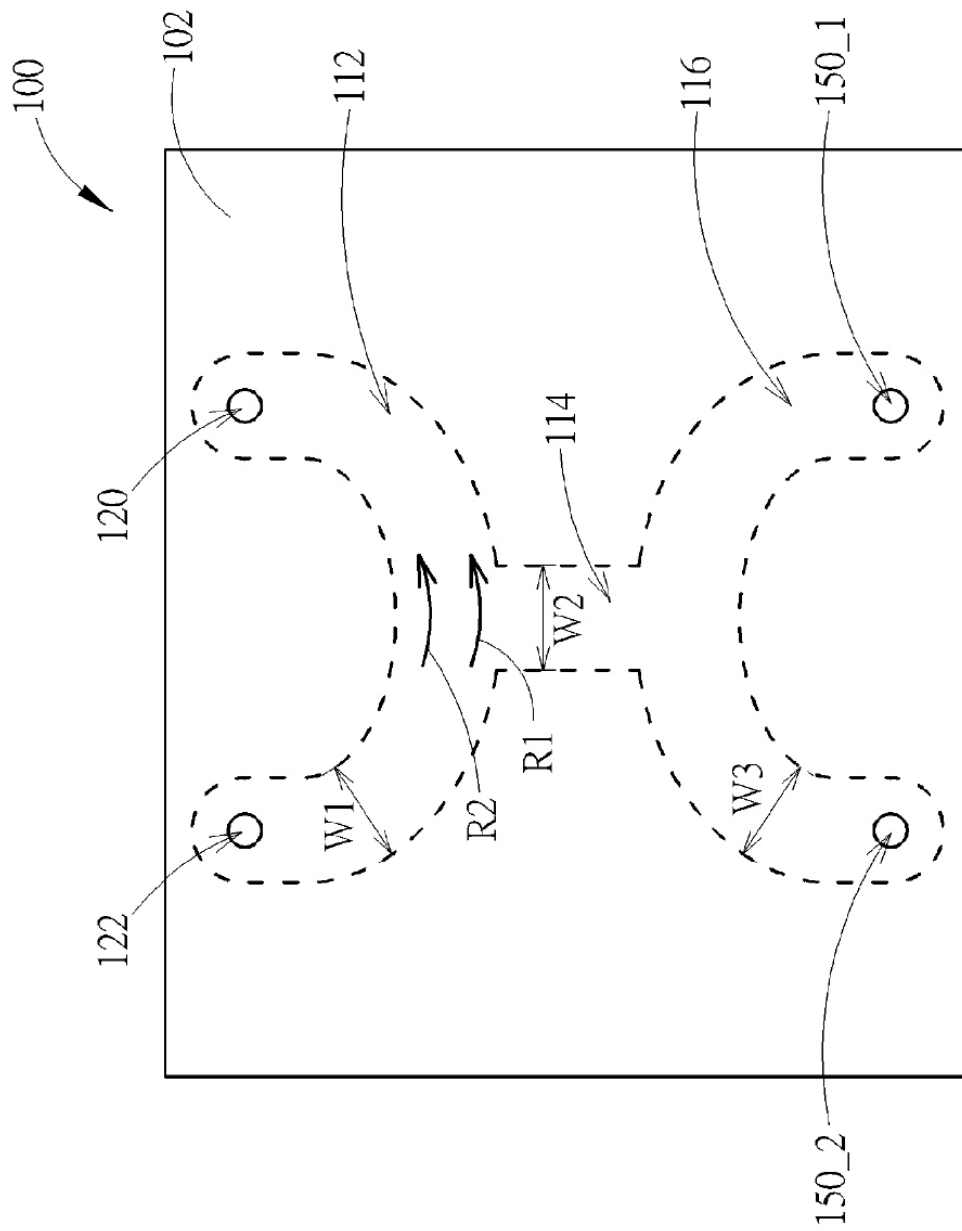


FIG. 18

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

• US 20170297036 A [0003] [0004] [0031] [0032]

• US 2018120255 A1 [0006]