



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 280 241**

51 Int. Cl.:
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 27/403 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00962475 .0**
86 Fecha de presentación : **12.09.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1218736**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **03.07.2002**

54 Título: **Dispositivo para medir parámetros celulares de células contenidas en un medio líquido.**

30 Prioridad: **08.10.1999 DE 199 48 473**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

73 Titular/es: **CYTOCENTRICS AG.**
Joachim-Jungius-Strasse 9
18059 Rostock, DE
Nanion Technologies GmbH

72 Inventor/es: **Nisch, Wilfried;**
Stelzle, Martin;
Stett, Alfred;
Krahn, Thomas;
Müller, Thomas y
Methfessel, Christoph

74 Agente: **Gil Vega, Víctor**

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 medir parámetros celulares de células contenidas en un medio líquido.

5 La invención se refiere a un dispositivo para medir eléctricamente parámetros celulares de células que se encuentran en un medio líquido según el preámbulo de la reivindicación 1.

Ya es conocido principalmente de la DE 198 41 337 C1 un dispositivo del tipo arriba indicado.

10 El dispositivo conocido de la DE 198 41 337 C1 sirve para la manipulación intracelular de una célula biológica, no se describe en esta publicación la obtención de valores de medida.

15 Para examinar células biológicas es generalmente conocida la utilización de los llamados “conjuntos de microelectrodos”. Los conjuntos de microelectrodos se emplean aquí, por ejemplo, para estimular las células o para deducir potenciales. Los ensayos pueden llevarse a cabo en un entorno biológico o también en un entorno artificial. Para ello, los conjuntos comprenden, en un cuerpo portador, múltiples microelectrodos cuyas dimensiones son aproximadamente del orden de magnitud de las células, es decir en el rango de algunos μm hasta decenas de μm . De la WO 97/05922, por ejemplo, se conoce un conjunto general de microelectrodos de este tipo general.

20 Con los conjuntos de microelectrodos tradicionales se depende en cierta medida del azar, si una u otra célula se deposita sobre un determinado electrodo o no. En la práctica, las células solamente se depositan sobre un electrodo con una superposición parcial, de manera que la estimulación de la célula o el cálculo de un potencial celular quedan limitados a esta superficie parcial. Además, las células sólo se apoyan sin fijarse a los electrodos. Esto puede causar problemas en cuanto a la resistencia de la impermeabilización frente al electrodo de referencia. Las células también
25 pueden quedar situadas fuera del alcance de un electrodo, de manera que no son detectadas durante la medición.

30 En un conjunto de microelectrodos, conocido de la DE 197 12 309 A1, se evitan estas desventajas gracias a que las células se recogen en microcubetas en cuyo fondo se sitúa un electrodo. El electrodo está provisto de un canal central en el que se puede generar una caída de tensión mediante canales de conexión adecuados que transcurren por debajo de los electrodos. De esta forma es posible atraer con precisión células individuales hasta los electrodos y fijarlas en éstos con una cierta presión de contacto. Ahora ya se pueden realizar mediciones en los electrodos, pero solamente desde su lado exterior.

35 De otro sector técnico es conocida la llamada técnica “patch-clamp” (fijación de voltaje) mediante el sistema de aspirar las células en una pipeta con un bajo voltaje (véase US-Z “NATURE”, Vol. 260, páginas 799-801, 1976). En la técnica de “patch-clamp”, sin embargo, es necesario acercar con precisión la pipeta hasta una célula individual. En la técnica de “patch-clamp” las células a contactar no se mueven ya que normalmente están adheridas a un sustrato. Sin embargo, poner en contacto de forma tradicional células con pipetas de “patch-clamp” tiene la desventaja de que el número de células que se pueden poner en contacto simultáneamente es extremadamente limitado, ya que por razones
40 de espacio no se puede introducir cualquier número de pipetas en la cámara de cultivo.

45 Por otro lado, la técnica “patch-clamp” tiene la ventaja, frente a la técnica descrita anteriormente en la que únicamente se pueden realizar medidas desde el lado exterior de la célula, de que el interior de la célula puede incluirse en la medida.

Mediante la técnica “patch-clamp” convencional, aplicada con pipetas individuales, esto se lleva a cabo por observación al microscopio ya que se acerca una frágil pipeta de vidrio mediante un micromanipulador a una célula individual adherida a un sustrato y aspirándose cuidadosamente la membrana hasta la boca de la pipeta. Por tanto, existe un contacto directo entre la superficie de vidrio y la membrana. Así, se sella un punto de la membrana del líquido del entorno y se aísla eléctricamente. Este aislamiento también se denomina “gigaseal”. Desde esta configuración “Cell-Attached” (configuración de célula fijada) se llega a la llamada configuración “Whole-Cell” (configuración de célula completa), aspirando aún más la membrana sellada. Esto se lleva a cabo de manera que se rompe la parte de la membrana por debajo de la pipeta. Así, se genera una entrada sellada al líquido y eléctricamente a través de la abertura de la pipeta al interior de la célula. Así, el resto de la membrana celular es accesible eléctricamente en conjunto (el llamado “whole cell patch”). La aplicación de este método tradicional requiere, sin embargo, una gran experiencia y tacto. El procesamiento de varias células sólo se puede realizar de forma secuencial. Por tanto, este método no es adecuado para realizar exámenes en masa, como son necesarios, por ejemplo, en el sector de la exploración farmacéutica, de la exploración de sustancias y similares.

60 La WO 01/25769 no publicada previamente describe un dispositivo genérico donde se dispone un canal en un sustrato conectado con una cavidad a través de una abertura. A ambos lados de la abertura se disponen los electrodos gracias a los cuales se puede capturar la célula con ayuda de la técnica de medida aspirándola hasta la abertura mediante una disminución de la tensión en el canal. De esta publicación no se conocen múltiples canales a través de los cuales se puede introducir o evacuar líquido.

65 La publicación Kostyuk y col, “Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells”, Nature 257, 23 de octubre de 1975, página 691, describe un procedimiento para la diálisis intracelular y la medida de la tensión en células, donde la correspondiente célula no se coloca en una abertura sobre

un sustrato planar, sino que se aspira dentro de una abertura que se estrecha de forma cónica sobre el sustrato planar de un espesor relativamente grande.

Por tanto, el objetivo de la invención consiste en desarrollar un dispositivo del tipo arriba indicado gracias al cual es posible evitar las desventajas arriba mencionadas. En especial, la invención ha de permitir obtener medidas lo más consistentes posibles, preferentemente paralelas, en múltiples células, en particular tal como se requiere en el sector de la exploración experimental y orientada hacia la aplicación de los efectos de los principios activos farmacéuticos a nivel celular.

En un dispositivo del tipo arriba indicado se alcanza el objetivo de la invención según las características de la reivindicación 1.

El objetivo que sirve de base a la invención se alcanza así por completo.

En el dispositivo según la invención, se dispone un segundo electrodo en el extremo del canal opuesto a la cara inferior de la membrana de una célula posicionada en la superficie de un sustrato, siendo el primer y el segundo electrodos adecuados para la exploración eléctrica de la célula; por tanto, el segundo electrodo está dispuesto en el extremo del canal, alejado del primer electrodo.

Así, se explora eléctricamente la célula mediante un electrodo distanciado de la cara inferior de la membrana en la dirección del canal. Para este fin se puede inyectar una corriente en el interior de la célula.

Esto tiene la ventaja de que se genera un acceso eléctrico directo tan sólo al interior de la célula. Debido a que la célula se apoya herméticamente con su membrana exterior sobre el fondo de la microcubeta e incluso se fija ahí por medio de una depresión, se produce de forma automática el Gigaseal conocido de la técnica de "patch-clamp" tradicional, es decir una extremadamente alta resistencia a la fuga entre el medio intracelular y el extracelular, que, por tanto, tiene poca influencia sobre la medición. Debido a que el electrodo se encuentra a una distancia del Gigaseal se garantiza, además, que la propia célula solamente entra en contacto con materiales eléctricamente aislados, de manera que se garantiza el mantenimiento del Gigaseal.

En comparación con las técnicas tradicionales de "patch-clamp", la invención permite renunciar a la difícil manipulación de una frágil pipeta de vidrio, ya que la función de la pipeta de vidrio tradicional es realizada por el canal en un sustrato en el que se aplica una presión negativa para ajustar una configuración "cell-attached". Si se ajusta así un Megaseal entre la pared de la célula y la superficie sobre la que ésta se aspira, según la invención se rompe el lado inferior de la membrana, incrementando la presión negativa de manera que ahora se pueden llevar a cabo medidas a través del canal por el interior de la célula, rodeada por la membrana. Como alternativa o adicionalmente, la membrana puede convertirse en microporosa por adición de sustancias formadoras de poros y de forma eléctrica con un bajo ohmiaje. Al añadir tales sustancias formadoras de poros, por ejemplo nistatina o amfotericina B, se forman poros en la membrana, de manera que se permite un acceso de bajo ohmiaje al interior de la célula, a través del cual, sin embargo, no se pueden difundir moléculas grandes. Así, se pueden medir las corrientes de membrana resultantes sin que sea necesario destruir para ello el lado inferior de la membrana. Como alternativa, la membrana también puede hacerse permeable en esta zona mediante un corto impulso eléctrico o bien romperse.

Una especial ventaja de la invención consiste en que el electrodo de medida se puede colocar espacialmente a cierta distancia de la membrana, de forma que la célula no se apoya directamente con su membrana sobre el electrodo, sino que la medida se realiza a través del medio intracelular.

Mientras que en la disposición conocida de la DE 197 12 309 A1 solamente son posibles mediciones extracelulares, es decir medicadas de cambios de potencial provocadas por corrientes de membrana en el entorno directo de la célula, según la invención se pueden realizar mediciones intracelulares y extracelulares, es decir se puede medir y controlar la tensión existente por encima de la membrana. Preferentemente para ello se inyecta una corriente en la membrana.

Por tanto, la invención es especialmente adecuada para estudios en masa en el sector de la farmaexploración y la exploración de sustancias, de la identificación de clones (GVO's; organismos modificados genéticamente) y en el marco de la optimización de sustancias, midiéndose eléctricamente el citoplasma de células biológicas, esto es de forma simultánea, o directamente secuencial, para diversas tales células. Así, la invención permite por primera vez la posibilidad de aplicar, de forma completamente automática, una técnica con las mismas ventajas que las técnicas tradicionales de "patch-clamp". Por esta razón se pueden examinar muchas de tales células en paralelo, de forma automatizada y con un alto rendimiento.

La conexión del canal en su extremo, alejado del primer electrodo, mediante válvulas, con múltiples canales a través de los cuales se puede introducir o evacuar líquido tiene la ventaja de que mediante el control adecuado de las condiciones de tensión en los canales de conexión, el interior de la célula entra en contacto con el líquido intracelular después de realizar la configuración de "whole-cell", es decir después de romper la membrana.

En este punto se puede modificar la composición del medio líquido intracelular después de abrir la membrana o después de generar microporos por la adición de sustancias o se puede sustituir el medio líquido intracelular. Para este fin, el canal puede conectarse con dos o más canales de conexión separados, donde uno se llena con un electrolito cuya

composición es similar a la del citoplasma (líquido intracelular) o que consiste en un líquido especial al que se han añadido principios activos.

De esta forma es posible influir de forma precisa y controlada en el medio intracelular y al mismo tiempo aumentar considerablemente el espectro de posibles mediciones a realizar.

En un desarrollo preferente del dispositivo según la invención se prevén medios para controlar los cambios de tensión, tanto para generar un cambio de tensión estático para ajustar una configuración “cell-attached” como también para aumentar en pulsos los cambios de tensión con el fin de romper el lado inferior de la membrana.

De esta manera se puede conseguir de forma fiable y controlada, por un lado, el ajuste del megaseal y, por otro lado, se puede mantener el megaseal, mientras que con un corto impulso de tensión se rompe el lado inferior de la membrana que se apoya sobre la pared del canal. Aquí, preferentemente, el control ha sido diseñado de forma que se mantiene continuamente una presión negativa estática (presión offset), de forma que el megaseal también se mantiene con la configuración “whole-attached”.

El segundo electrodo en el nuevo dispositivo puede rodear en forma de anillo el extremo opuesto del canal.

Estas medidas tienen la ventaja de que el electrodo puede integrarse de forma sencilla en una microestructura, conformándolo en el lado inferior de la capa en la que transcurre el canal.

En otra variante de la invención, por el contrario, el segundo electrodo está dispuesto a cierta distancia del extremo opuesto del canal.

Esta medida tiene la ventaja de que el electrodo, como se explicará posteriormente, también puede estar dispuesto de forma móvil frente al canal, de manera que con el mismo electrodo se pueden medir sucesivamente varias células.

En otro desarrollo de la invención se dispone una microcubeta por encima del sustrato, microcubeta en cuyo fondo se ha previsto una abertura.

De esta manera se puede almacenar el líquido por encima del sustrato de forma adecuada, en especial para ensayos en masa, habiendo previsto el canal o los canales. Aquí, las células pueden conducirse a través de una conformación adecuada en forma de embudo desde la microcubeta directamente hasta la proximidad de una desembocadura del canal de una superficie de sustrato. De forma alternativa, la abertura en el fondo de la microcubeta, sin embargo, también puede tener un diámetro claramente mayor, de manera que la conducción de la célula hasta la boca del canal se consigue esencialmente por la presión negativa aplicada. Esto facilita la realización de la estructura según la invención.

Además, preferente se disponen múltiples canales en un sustrato común.

Así se puede conseguir una ejecución compacta con una realización sencilla.

Además, aquí se disponen, preferentemente, múltiples microcubetas en una placa.

De ello se deriva la ventaja de que se pueden preparar de manera sencilla mediciones paralelas o secuenciales en muchas células porque todas las microcubetas se encuentran en una placa común.

En algunas realizaciones de la invención que utilizan una placa común para las microcubetas es preferente, además, que la placa esté estructurada en múltiples capas.

Esta medida tiene la ventaja de que se pueden tener en cuenta las diferentes exigencias de los distintos elementos de la placa eligiendo de forma adecuada el material.

Esto es aplicable, en especial, cuando un desarrollo de esta variante la placa comprende una capa superior, una capa intermedia y una capa inferior, disponiéndose en la capa superior las microcubetas, constituyendo la capa intermedia el sustrato con los canales y encontrándose en la capa inferior los canales de conexión que conducen hasta los canales; igualmente, en un tipo de realización preferente, se disponen líneas de alimentación eléctrica que conducen hasta los canales y microelectrodos.

Esta división de la placa en tres partes tiene la ventaja de que se pueden utilizar, en cada caso, capas individuales con espesores y materiales diferentes para las tres funciones esenciales.

Según otro tipo de realización de la invención, el sustrato se conecta con una capa inferior compuesta por una o varias capas de materiales fotoestructurables, que permiten una conducción tridimensional de canales de conexión que conducen hasta los canales.

La capa inferior puede estar aquí aplicada sobre un soporte de vidrio.

ES 2 280 241 T3

Con esta medida es posible llevar a cabo una realización especialmente compacta y sencilla. Como materiales fotoestructurables se conocen determinados polímeros así como también ciertos vidrios.

Preferentemente los canales de conexión tienen un ancho entre 10 μm y 40 μm , en especial de aproximadamente 20 μm .

Los propios canales tienen, de preferencia, un ancho interior inferior a 10 μm , en especial inferior a 5 μm .

Estas dimensiones resultan óptimas en el presente contexto. En especial, se refuerza el posicionamiento, en cada caso, de una célula en un canal debido a que el ancho interior de los canales es inferior al diámetro de las células.

Como ya se ha indicado anteriormente, en estos tipos de realización de la invención es especialmente preferente que los electrodos estén dispuestos en el lado inferior de la capa intermedia o en el lado superior de la capa inferior.

Esta medida tiene la ventaja de que los electrodos, junto con sus líneas de alimentación, pueden configurarse por simple impresión, precipitación, por vaporación y subsiguiente microestructuración por procedimientos conocidos (fotolitografía, ataque químico, "lift-off" [despegue], etc.).

En este caso se prefiere, además, que los electrodos estén diseñados, vistos desde arriba, como una superficie cuadrada con una longitud entre bordes de entre 20 μm y 60 μm , preferentemente de aproximadamente 40 μm .

Como ya se ha mencionado, se puede prever en este caso disponer los circuitos impresos que conducen hasta los electrodos entre la capa intermedia y la capa inferior. Como alternativa, esto puede realizarse gracias a que se aplican en la parte inferior de la capa intermedia o en la parte superior de la capa inferior. Una aplicación sobre el lado inferior de la capa intermedia tiene la ventaja de que los circuitos impresos pueden configurarse junto con los electrodos, especialmente también con el mismo material, en particular un metal noble, preferentemente oro.

Preferentemente, los circuitos impresos tienen aquí un ancho de entre 5 μm y 30 μm , en especial de aproximadamente 10 μm .

Como ya se ha mencionado, en una realización multicapa de la placa se pueden utilizar diferentes materiales para las distintas capas.

Las distintas capas pueden fabricarse, por ejemplo, independientemente entre sí, de material sintético, de metacrilato de polimetilo (PMMA), silicona, PTFE, poliimida o de un material inorgánico, en particular de vidrio, cerámica o silicio.

Para el sustrato se utiliza preferentemente poliimida, que para este fin se emplea en forma de lámina sobre la que se han conformado los canales como taladros. El sustrato (la lámina) tiene en este caso, preferentemente, un espesor de entre 2 μm y 40 μm , en especial de aproximadamente 5 μm .

Para la capa inferior se utiliza preferentemente vidrio. En el vidrio, que se puede disponer prácticamente en cualquier espesor para así garantizar también una estabilidad mecánica, se pueden conformar de la forma tradicional los canales de conexión necesarios y similares.

En otro desarrollo de la invención, se prefiere disponer el sustrato en el lado inferior de una placa en la que se han realizado múltiples huecos como microcubetas, en cuyo fondo se han previsto agujeros con los que se centran los canales del sustrato.

De esta manera se puede fabricar de forma relativamente sencilla un cuerpo combinado con múltiples microcubetas que tienen asignados canales y electrodos individuales.

Según otro tipo de realización de la invención, se dispone una unidad hidráulica y de medida que tiene una cámara abierta hacia el lado inferior del sustrato, la cual puede posicionarse en el lado inferior del sustrato de manera que la cámara comunica con un canal determinado y queda sellada hacia el exterior, conteniendo la cámara como mínimo un electrodo y pudiendo conectarse con al menos un canal de conexión que está conectado con una fuente de presión negativa.

Aquí se puede prever, además, una unidad de posicionamiento para desplazar y colocar la placa y la unidad de presión negativa y de medida relativamente entre sí.

De esta forma se puede utilizar una única unidad de medida para la medición secuencial de múltiples células, lo cual puede resultar en un considerable ahorro en coste.

Aquí se utilizan preferentemente placas comerciales, tradicionales de trama normalizada (las llamadas "placas de 96 pocillos", "placas de 384 pocillos" ó similares). Éstas únicamente han de cerrarse hacia abajo mediante la aplicación de la lámina provista a los canales (pocillos). Las mediciones en muchas células individuales en los pocillos de la placa

ES 2 280 241 T3

perforada se realizan a continuación secuencialmente mediante el desplazamiento de la unidad de presión negativa y de medida o, a la inversa, por el desplazamiento de las placas de trama normalizada con relación a una unidad fija de presión negativa y de medida. Ésta genera un pulso de presión negativa para abrir la célula y contiene también el electrodo para realizar a continuación la medida a través del interior de la célula.

Aquí, de nuevo, como ya se ha mencionado anteriormente, la cámara puede estar conectada a través de válvulas con múltiples canales de conexión para así poder poner en contacto el interior de la célula después de conformar la configuración de "whole-cell" con líquido intracelular o modificar la composición del líquido intracelular.

Otras ventajas resultan de la descripción y de las figuras adjuntas.

Se entiende que las características arriba mencionadas y a explicar más adelante pueden aplicarse no solamente en la combinación correspondiente citada, sino también en otras combinaciones o independientemente sin salirse del alcance de la presente invención.

En las figuras se representan ejemplos de realización de la invención y se explican más en detalle en la siguiente descripción.

Figura 1: vista en perspectiva extremadamente esquemática de un ejemplo de realización de un dispositivo según la invención;

Figura 2: corte a través de una microcubeta del conjunto según la Figura 1, también muy esquematizado;

Figura 3: vista desde arriba de la microcubeta según la Figura 2 a escala ligeramente reducida;

Figura 4: detalle de la Figura 2 a escala aumentada para explicar el procedimiento según la invención;

Figura 5: representación similar a la Figura 3 que representa el estado actual de la técnica;

Figura 6: vista en perspectiva y aumentada de un detalle de la misma, en un ejemplo comparativo y

Figuras 7a) a 7c): diferentes fases de aspirar una célula, de conformar una configuración "cell-attached" y una configuración "whole-cell" al utilizar dos canales de conexión hasta el canal, en representación esquemática simplificada.

Ejemplo 1

En las Figuras 1 a 4 se designa como 10 una placa. En una superficie 11 de la placa 10 se conforma una trama de microcubetas 12. Las microcubetas 12 son tridimensionales y tienen las dimensiones adecuadas para el cultivo de células. En una placa 10 pueden disponerse, por ejemplo, $8 \times 12 = 96$ microcubetas 12.

Con una flecha 14 se indica que las microcubetas se pueden llenar desde arriba, es decir con un líquido en el que se encuentra la célula a examinar. Aquí es posible llenar las microcubetas 12, en cada caso, individualmente, con diferentes líquidos y células.

Para llevar a cabo las medidas se ha previsto un módulo de conexión eléctrica 16 que se puede acoplar lateralmente a la placa 10, para lo cual se disponen múltiples clavijas 18. Las clavijas 18 están conectadas a la red de circuitos impresos. Estos circuitos conducen hasta los electrodos colocados en el área de las microcubetas 12, como se explicará posteriormente. Desde el módulo de conexión eléctrica se dispone una línea de datos 20 hasta una unidad de mando 22.

Además, se ha previsto un módulo de conexión hidráulico 24 que también se puede acoplar lateralmente con la placa 10, es decir, por medio del número correspondiente de tomas hidráulicas 26. A través del módulo hidráulico de conexión 24 se puede generar una presión negativa de manera predeterminada, en especial individualmente, por debajo de las microcubetas 12, particularmente con un desarrollo de pulsos temporales como se explicará más en detalle adelante.

Para este fin las tomas hidráulicas 26 están conectadas con las microcubetas 12 a través de una red de canales de conexión y aberturas 49 en el fondo de las microcubetas. Si se quiere aplicar la misma presión negativa a todas las microcubetas 12 se conectan en paralelo todos los canales de conexión y se conectan directamente al módulo hidráulico de conexión 24 con una fuente de presión negativa central controlada. Si, por el contrario, se quiere aplicar a las distintas microcubetas 12 una presión negativa individual correspondiente, también se puede utilizar una fuente de presión negativa central conectada a la red de canales de conexión donde, en este caso, se encuentran válvulas accionadas individualmente en estos canales de conexión. Como alternativa, sin embargo, también se pueden disponer en los canales de conexión bombas miniaturizadas, especialmente bombas de diafragma en miniatura, que se controlan individualmente. El control eléctrico de las válvulas y/o de las bombas en miniatura puede realizarse bien a través del módulo de conexión eléctrica 16 o a través del módulo hidráulico de conexión 24. En cualquier caso, una línea 28 conduce desde el módulo hidráulico de conexión 24 a la unidad de mando 22 con el fin de controlar los elementos antes mencionados.

ES 2 280 241 T3

La unidad de mando 22 está a su vez conectada a un multiplexor 30 para poder llevar a cabo de forma predeterminada varias medidas simultáneamente o, en caso dado, secuencialmente.

Como se puede ver en la Figura 2, la placa 10 se compone esencialmente de tres capas. Sobre la capa inferior 32 se encuentra una capa intermedia o un sustrato 34 realizada/o en forma de lámina. Una capa superior 36 está realizada como capa microestructurada. La capa inferior 32 está hecha aquí, preferentemente, de vidrio. El sustrato 34 es preferentemente una lámina de poliimida. La capa microestructurada 36 se compone, por el contrario, preferentemente, de metacrilato de polimetilo (PMMA).

En el lado superior de la capa inferior 32 se dispone un canal de conexión 38. El canal de conexión 38 sirve para ser dirigido hasta la microcubeta 12 representada en la Figura 2. El canal de conexión 38 está conectado a una abertura 49 en el fondo 48 de la microcubeta 12 a través de un canal vertical 40 en el sustrato 34. La microcubeta 12 está provista en su lado superior de un segmento cilíndrico 42 revestido con un electrodo de referencia 44. El electrodo de referencia 44 está conectado a una primera conexión eléctrica 46. Ésta se coloca preferentemente a tierra.

En la parte inferior del segmento cilíndrico 42 se conecta un segmento en forma de embudo que constituye el fondo 48 en el que se ha previsto la abertura 49.

Se dispone un electrodo 50 alrededor del extremo inferior del canal vertical 40, aproximadamente en forma de anillo. Para este fin se coloca en el lado inferior del sustrato 34. El electrodo 50 está conectado a una línea de alimentación 52 que transcurre entre la capa inferior 32 y el sustrato 34. La línea de alimentación 52, junto con el electrodo 50, puede estar, por ejemplo, impresa, vaporizada, precipitada o similar, sobre el lado inferior del sustrato 34. La línea de alimentación 52 está conectada a una segunda toma eléctrica 54.

Los electrodos 46 y 50 están hechos de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl). Tales electrodos se designan en el mundo técnico como “reversibles” o como “no polarizables”. Tienen la ventaja de que en las células son posibles no sólo medidas de tensión alternativa, es decir medidas de las puntas de potencial (los llamados “spikes”), sino también medidas de tensión continua. También se pueden utilizar para la inyección de corriente.

Entre los electrodos 46 y 50 se mide la tensión de medida U_{amp} . Además se puede alimentar una corriente de estimulación I_{st} a través de una segunda toma 54 paralelamente a la medida de la tensión.

Esto se explica en detalle más adelante con ayuda de la Figura 4.

Como se puede ver en la vista en planta de la Figura 3, se disponen varios electrodos 12 en la placa 10 en forma de una trama, donde el tamaño de la trama d oscila entre 0,1 y 10 mm, preferentemente de 9 mm aproximadamente.

Las microcubetas 12 tienen en la zona de su segmento cilíndrico 42 un radio interior r de entre aproximadamente 1 y 9 mm, preferentemente de aproximadamente 7 mm, lo que permite un pequeño relleno. El ancho de luz x del canal vertical 40 es inferior a $10\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente inferior a $5\text{ }\mu\text{m}$.

Los circuitos impresos 52 tienen un ancho b de entre $5\text{ }\mu\text{m}$ y $30\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $10\text{ }\mu\text{m}$. Los electrodos 50, vistos en planta, tienen preferentemente un diseño en cuadrado y un largo entre bordes de entre $20\text{ }\mu\text{m}$ y $60\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $40\text{ }\mu\text{m}$. Los canales de conexión 38 tienen un ancho b_2 entre $10\text{ }\mu\text{m}$ y $40\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $20\text{ }\mu\text{m}$.

El sustrato 34, o la lámina, tiene un espesor entre $2\text{ }\mu\text{m}$ y $40\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $5\text{ }\mu\text{m}$.

La distancia 1 desde las microcubetas 12 hasta el borde de la placa 10 es preferentemente de como mínimo 2 cm, gracias a lo cual se consigue una alta resistencia “shunt”, es decir un desacoplamiento eléctrico de los diferentes electrodos.

El electrodo 50 y los circuitos impresos 52 son preferentemente de oro.

En la Figura 2 se muestra, además, que en el canal de conexión 38 se puede integrar una microbomba 56 accionable por medio de una tercera conexión 58. Por medio de la microbomba 56 o por medio de una fuente central de presión negativa, en caso dado interconectando válvulas en los canales de conexión 38, se puede ajustar una presión negativa con un desarrollo temporal preciso en los canales de conexión 38.

La Figura 4 muestra a escala mayor aquella situación en que una célula 60 se deposita en el fondo 48 de la microcubeta 12. Esto tiene lugar bien por la fuerza de la gravedad o bien de manera dirigida debido a que, por la generación de una presión negativa, preferentemente constante, en el canal 40, la célula es aspirada de forma controlada. El diseño en forma de embudo del segmento en el fondo 48 de la microcubeta 12 provoca, además, una separación individual de las células, de manera que en un caso normal únicamente una sola célula 60 queda situada por encima de la abertura 49 en el fondo de la microcubeta 12 por encima del canal 40.

En la Figura 4, la capa exterior o membrana de la célula 60 lleva la referencia 62 y el interior de la célula la referencia 64. La célula 60 se encuentra en un medio líquido 66, el cual, en el ejemplo de realización mostrado, puede

ES 2 280 241 T3

llenar también los canales de conexión 38 y los canales 40 y se puede sustituir en los mismos. La célula se apoya con su lado inferior 68 sobre el fondo 49.

5 Cuando se ha alcanzado esta posición, se genera un impulso de presión negativa en el canal de conexión 38, tal como se indica en la Figura 4 con una flecha 70. Este impulso de presión negativa 70 se calcula de manera que se rompa el lado inferior 68 y se introduzca en el canal 40 a modo de un cuello 72. El interior de la célula 64 queda entonces directamente conectado con el canal 40 o bien con el líquido que se encuentra en el mismo. Como alternativa, también se puede renunciar a un impulso de presión negativa y el lado inferior de la membrana puede permeabilizarse mediante la adición de sustancias formadoras de poros, por ejemplo nistatina o amfotericina, de manera que se produce un acceso de bajo ohmiaje hacia el interior de la célula, sin que, sin embargo, se puedan difundir moléculas grandes.

En la figura 4 se ha dibujado, además, el esquema eléctrico equivalente de la célula 60.

15 R_M y C_M designan la resistencia y la capacidad de la membrana 62. R_s es la resistencia del “seal” (sellado), es decir la resistencia de aislamiento entre el interior de la célula 64 y el medio extracelular 66 exterior a la célula 60. R_p es la resistencia entre el interior de la célula 64 y el electrodo 50, mientras que R_k es la resistencia entre el electrodo 50 y el electrodo de referencia 44.

20 R_s tiene un valor relativamente alto (“gigaseal”) debido a que el cuello 72 penetra en el canal 40 y se apoya sobre la pared 48 sin alcanzar, no obstante, el electrodo 50, relativamente alejado.

En estado sin corriente, es decir cuando a través de la conexión 54 y a través del canal de conexión 38 no pasa corriente, la tensión U_{amp} corresponde a la tensión de membrana U_M existente en la membrana de la célula. Si, por el contrario, pasa una corriente finita a través del canal de conexión, es aplicable la relación:

$$U_{amp} = \frac{R_k}{R_k + R_p} U_M$$

30 es decir, la tensión de membrana U_M es proporcional a la tensión U_{amp} .

En caso de introducir una corriente de estimulación I_{ST} en la segunda conexión 54 es aplicable para la tensión de membrana U_M en estado estacionario la relación:

$$U_M = \frac{R_s \cdot R_M}{R_M + R_s} I_{ST}$$

40 en el caso en que $R_k \gg R_p + R_s$ $R_m/(R_s + R_m)$. Esta condición se alcanza según la invención mediante canales de conexión con la suficiente longitud y con una sección transversal reducida.

Del modo arriba descrito, la célula 60, por tanto, se pone en contacto con el fondo 48 de la microcubeta 12 tanto hidráulica como eléctricamente, generando a través de la solución de electrolito la presión negativa necesaria y, por generación adicional de un impulso de presión negativa 70, el proceso de apertura de la célula 60.

Ejemplo comparativo

50 Para ilustrar la diferencia del procedimiento según la invención frente a la técnica actual según la DE 197 12 309 A1, en la Figura 5 se muestra una representación similar a la Figura 4 que corresponde a la disposición conocida. Los mismos elementos llevan aquí las mismas referencias habiéndose añadido en cada caso la letra “a”.

55 Como se puede ver claramente en la Figura 5, en esta técnica actual la célula 60a se apoya directamente sobre el electrodo. Es decir, la célula 60a es sometida a una carga eléctrica desde el exterior, es decir desde la cara exterior de la membrana 62a. El canal 40a sirve en este estado de la técnica exclusivamente para atraer la célula 60a al fondo 48a mediante la aplicación de una determinada presión negativa reducida y fijarla en este punto, donde el fondo 48a está formado en este estado de la técnica, contrariamente a la presente invención, por el electrodo 50a.

60 Incluso si se aplicara un impulso de presión negativa a la célula 60a a través del canal 40a en este estado de la técnica y se abriera la membrana 62a (no apareciendo en este estado de la técnica ninguna mención al respecto) se formaría un cuello 72a en el lado inferior 68a de la célula 60a que cubriría el electrodo 50a en la zona del canal 40a. A pesar de abrirse la célula 60a, el electrodo 50a seguiría sin permitir la medida directa a través de la parte interior de la célula 64a; por el contrario, se seguiría apoyando en el lado exterior de la membrana 62a. Por tanto, las mediciones en este dispositivo según la técnica actual, incluso si se abriera la parte inferior 68a de la célula 60a, no se desarrollarían de otra forma que la descrita en la misma para el caso en que la presión negativa no condujera a una apertura de la célula 60a.

Otro ejemplo comparativo

Finalmente, la Figura 6 muestra otro ejemplo comparativo.

5 En la figura 6, 80 designa una placa de ejecución en sí tradicional. Las placas 80 de este tipo se denominan “placas de 96 pocillos”. Contienen 96 pocillos 84 cilíndricos verticales dispuestos en una trama. Estos pocillos 84 pueden utilizarse como microcubetas. Como se ha indicado en la Figura 6, a la derecha, arriba, mediante una línea de trazo discontinuo, la placa 80 puede también estar estructurada en varias capas, en especial en dos capas.

10 Un fondo 82 de los pocillos cilíndricos o microcubetas 84 queda formado por un sustrato 86 en forma de lámina adherido, soldado o unido de otra manera a la parte inferior a la placa 80. El sustrato 86 comprende, siempre en el centro del fondo 82, un canal 88 configurado como un agujero.

15 En contraste con el ejemplo de realización según la invención de acuerdo con las Figuras 2 y 4, no hay por debajo del sustrato 86 ningún apoyo con un sistema de canales de conexión. En su lugar se ha previsto una unidad móvil hidráulica y de medida 90 que se puede acercar individualmente desde abajo a la parte inferior 91 de la lámina 86.

20 Una unidad 90 comprende una cámara 92 en forma de cazoleta provista en su lado frontal superior de una junta anular 94. De esta manera se puede acoplar la cámara 92 herméticamente al lado inferior 91, es decir de manera que el eje vertical de la cámara 92 se alinea en cada caso con el eje de un agujero 88.

Desde la cámara 92 se conduce una tubería 96 hasta una unidad de presión negativa, no representada. De este modo se puede generar un impulso de presión negativa en la cámara 92, como se indica con una flecha 98.

25 En el fondo de la cámara 92 se dispone un electrodo 100 conectado a una conexión externa 102.

30 Con 104 se indica una unidad de desplazamiento multiaxial. La unidad de desplazamiento 104 permite conducir la unidad hidráulica y de medida 90 a lo largo del lado inferior 91, es decir desde una microcubeta 84 a otra microcubeta 84, para en cada caso presionar la unidad 90 sobre el lado inferior 91 desde abajo, herméticamente, alrededor del correspondiente agujero 88. Al aplicar un impulso de presión negativa 98 sobre la tubería 96 se puede realizar entonces el mismo experimento como se explicó más arriba con ayuda de la Figura 4 con relación al primer ejemplo de realización de la invención.

35 El primer ejemplo de realización de la invención según las Figuras 2 a 4 tiene la ventaja de que se dispone de una placa compacta con todos los canales de conexión para conectar con las microcubetas 12 de manera que, sin más dispositivos de accionamiento, únicamente por la activación de válvulas, contactos y similares, se pueden realizar múltiples medidas de forma secuencial o en funcionamiento multiplexor.

40 El segundo ejemplo comparativo según la Figura 6, por el contrario, tiene la ventaja de que se puede utilizar una placa comercial y que se ahorra el coste de la capa inferior con múltiples canales de conexión, circuitos impresos y electrodos individuales.

Ejemplo 2

45 En las Figuras 7a) a c) se representa muy esquemáticamente otro ejemplo de realización de la invención que se explica más en detalle a continuación.

50 De nuevo se ha previsto un sustrato 110 que puede ser, por ejemplo, una lámina de poliimida. En el sustrato 110 se han conformado un sinnúmero de canales, de los cuales se representa uno que lleva la referencia 112. Por encima del sustrato 110 se encuentra un líquido en el que existen células 112. Por debajo del canal 122 se ha conformado una cámara 124 que comunica con el canal 122 y en cuyo fondo, similar a la ejecución de la figura 6, se ha previsto un electrodo 126.

55 A diferencia de las realizaciones arriba descritas, está cámara 124, no obstante, no solamente está conectada a un canal de conexión, sino a dos canales de conexión 130, 132. Estos canales de conexión 130, 132 pueden conectarse con los depósitos de líquidos F_1 y F_2 a través de las válvulas 118, 120.

60 Se entiende que la representación es puramente esquemática y que los canales de conexión 130, 132 pueden estar conformados en una capa fotopolimerizable y que las válvulas, preferentemente, están previstas en los extremos exteriores de los canales.

Si ahora, según se representa en la Figura 7a), la válvula 120 se encuentra cerrada y la válvula 118 abierta, la aplicación de una presión P_1 en el canal 130 inferior a la presión P_0 en el líquido 114 conduce a la formación de una corriente en dirección de la flecha 133 a través del canal 122 y el canal de alimentación 130. Debido a ello, la célula 112 es aspirada y se asienta sobre la superficie 128 del sustrato 110 por encima de la boca del canal 122 y forma un “megaseal” al mantener la presión negativa de manera que se presenta la configuración “cell-attached”.

ES 2 280 241 T3

Si ahora se abre la válvula 120 según la Figura 7b), manteniéndose la relación $P_1 < P_2 < P_0$, se llena la cámara 124 con el medio intracelular desde el depósito de líquido F_2 mientras que se produce una corriente en la dirección de la flecha 134 desde el canal de conexión 132 a través de la cámara 124 hasta el canal de alimentación 130. La presión P_2 ha de ser aquí mayor que la presión P_1 para que la corriente se dirija en la dirección de la flecha 134 desde el canal de conexión 132 hasta el canal de conexión 130; además, ambas presiones P_1 y P_2 han de ser menores que la presión P_0 en el medio extracelular 114 que rodea la célula 112.

Ahora, en la siguiente fase según la Figura 7c), se cierra la válvula 118 y se aplica una presión negativa en pulsos en el canal de conexión 132 de modo que P_2 es mucho menor que P_0 ($P_2 \ll P_0$). Debido a ello, el lado inferior de la membrana de la célula 112, el “membranpatch”, es aspirado y se rompe por acción de los impulsos de presión negativa, de manera que ahora se presenta un “whole-cell-patch-clamp”. La corriente se produce durante esta fase en la dirección de la flecha 135 a través del canal 122 y el canal de conexión 132 hasta el depósito de líquido F_2 . Ahora se alcanza un estado en el que la cámara 124 está rellena exclusivamente del medio intracelular 116. A continuación se puede trabajar de nuevo con otro medio a través de la válvula 118, en caso que sea necesario para las mediciones a realizar.

La ventaja de esta disposición y de este procedimiento consiste en que se puede trabajar con un medio intracelular exactamente controlado sobre cuya composición se puede influir o con el que se puede utilizar incluso otro medio intracelular.

Esta realización con dos o más canales de conexión que se pueden controlar a través de válvulas, en principio, se puede combinar con la realización explicada anteriormente con ayuda de las Figuras 1 a 4, lo mismo que con la de la Figura 6.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para la llevar a cabo medidas eléctricas en células (60; 112) en un entorno líquido (66), con un sustrato (34; 86), que comprende un canal (40; 88; 122), por encima del cual se puede posicionar una célula (60; 112) con un lado inferior (68) de su membrana (62) sobre una superficie (49; 85; 128) del sustrato (34; 86), comprendiendo además medios (56) para generar un diferencial de presión (70) a lo largo del canal y con un primer electrodo (44) así como al menos un segundo electrodo (50; 100; 126), el cual se dispone a una cierta distancia del primer electrodo (44) en la dirección del canal (40; 88; 122), **caracterizado** porque el segundo electrodo (50) está dispuesto en el extremo del canal (40) alejado del lado inferior (68) de la membrana (62) de una célula (60; 112) posicionada sobre la superficie (49; 85; 128) del sustrato (34; 86) y porque los electrodos mencionados (44, 50; 100; 126) son adecuados para la exploración eléctrica de la célula (60; 112), estando el canal (122) conectado con múltiples canales (130, 132) a través de válvulas (118, 120) en su extremo alejado del primer electrodo (44), canales (130, 132) a través de los cuales se puede introducir o extraer líquido (F_1 , F_2).
2. Dispositivo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se han previsto medios (56, 58) para regular el diferencial de presión (70), tanto para generar un diferencial de presión (70) estático para ajustar una configuración "cell-attached", como también para aumentar de forma de pulsos el diferencial de presión (70) para romper el lado inferior (68) de la membrana (62).
3. Dispositivo según la reivindicación 2, **caracterizado** porque el segundo electrodo (50) rodea el extremo alejado del canal (40) a modo de anillo.
4. Dispositivo según una o varias de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque múltiples canales (40; 88; 122) se disponen en un sustrato común (34; 86; 110).
5. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque por encima del sustrato (34; 86) se dispone una microcubeta (12; 84) en cuyo fondo (48; 82) se ha previsto una abertura (49; 88).
6. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** porque el canal (40; 88; 122) tiene un ancho interior (x) inferior a $10\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente inferior a $5\text{ }\mu\text{m}$.
7. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, **caracterizado** porque se han dispuesto múltiples microcubetas (12; 84) en una placa (10; 80).
8. Dispositivo según la reivindicación 7, **caracterizado** porque la placa (12; 80) tiene una estructura multicapa.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, **caracterizado** porque la placa (10) comprende una capa superior (36), una capa intermedia y una capa inferior (32), estando dispuestas las microcubetas (12) en la capa superior (36), la capa intermedia constituye el sustrato (34) en el que se han incorporado los canales (40) y conteniendo la capa inferior (32) canales de conexión (38) que conducen hasta los canales (40).
10. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el sustrato (34; 86) está conectado con una capa inferior (32) que se compone de una o varias capas de materiales fotoestructurables que tienen canales de conexión (38) que conducen hasta los canales (40; 88; 122).
11. Dispositivo según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la capa inferior (32) es aplicada sobre un soporte de vidrio.
12. Dispositivo según la reivindicación 9, 10 u 11, **caracterizado** porque los canales de conexión (38) tienen un ancho (b_2) entre $10\text{ }\mu\text{m}$ y $40\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $20\text{ }\mu\text{m}$.
13. Dispositivo según una de las reivindicaciones 9 a 12, **caracterizado** porque los segundos electrodos (50) están dispuesto en el lado inferior del sustrato (34) o en el lado superior de la capa inferior (32).
14. Dispositivo según la reivindicación 13, **caracterizado** porque los segundos electrodos (50) tienen una superficie cuadrada con una longitud entre bordes (a) de entre $20\text{ }\mu\text{m}$ y $60\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $40\text{ }\mu\text{m}$.
15. Dispositivo según la reivindicación 13 ó 14, **caracterizado** porque entre el sustrato (34) y la capa inferior (32) se disponen circuitos impresos (52) que conducen hasta los segundos electrodos (50).
16. Dispositivo según la reivindicación 15, **caracterizado** porque los circuitos impresos (52) tienen un ancho (b_1) entre $5\text{ }\mu\text{m}$ y $30\text{ }\mu\text{m}$, preferentemente de aproximadamente $10\text{ }\mu\text{m}$.
17. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 16, **caracterizado** porque como mínimo la capa superior (36), la capa inferior (32) o el sustrato (34) están hechos, independientemente entre sí, de un material sintético, en particular de metacrilato de polimetilo (PMMA), silicona, PTFE, poliimida o de un material inorgánico, en especial de silicio, cerámica o vidrio.

ES 2 280 241 T3

18. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 17, **caracterizado** porque el sustrato (34; 86) tiene un espesor de capa de entre 2 μm y 40 μm , preferentemente de aproximadamente 5 μm .

5 19. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, **caracterizado** porque el sustrato (34; 86) es una lámina en la que se han conformado múltiples canales (40; 88) en forma de perforaciones.

10 20. Dispositivo según la reivindicación 19, **caracterizado** porque el sustrato (86) está dispuesto en el lado inferior de una placa (80) en la que se han realizado múltiples perforaciones en forma de microcubetas (84) cuyo fondo (82) queda formado por el sustrato (86) en el que se han realizado los canales (88) a modo de perforaciones.

21. Dispositivo según la reivindicación 19 ó 20, **caracterizado** porque el sustrato (86) está dispuesto en el lado inferior de una placa (36) en la que se han conformado múltiples perforaciones como microcubetas (12) en cuyo fondo (48) se han previsto agujeros (49) con los cuales se centran los canales (40) del sustrato (34).

15 22. Dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, **caracterizado** porque se ha previsto una unidad hidráulica y de medida (90) que tienen una cámara abierta (92; 124) hacia el lado inferior del sustrato (86; 110), cámara que puede posicionarse en el lado inferior del sustrato (86; 110) de manera que la cámara (92; 124) comunica con un canal seleccionado (88; 122) y queda sellada hacia el exterior, donde la cámara (92; 124) contiene como mínimo un electrodo (100; 126) y puede conectarse con como mínimo un canal de conexión (86; 130, 132) que está conectado a
20 una fuente de presión negativa.

23. Dispositivo según la reivindicación 22, **caracterizado** porque la cámara (124) está conectada con múltiples canales de conexión (130; 132) a través de válvulas (118, 120).

25 24. Dispositivo según la reivindicación 22 ó 23, **caracterizado** porque se ha previsto una unidad de desplazamiento (104) para desplazar y posicionar la placa (80) y la unidad hidráulica y de medida (90) relativamente entre sí.

30

35

40

45

50

55

60

65

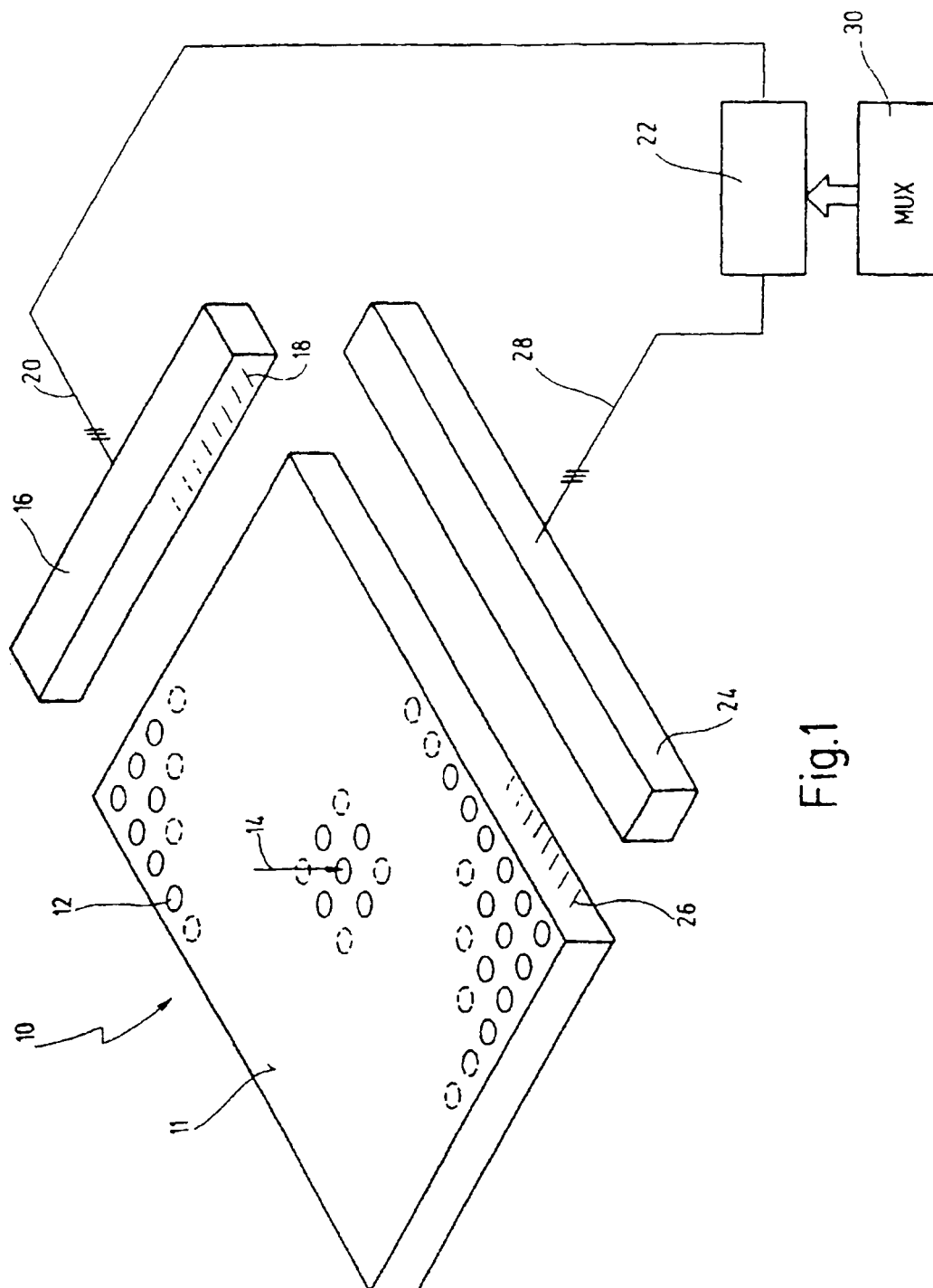


Fig.1

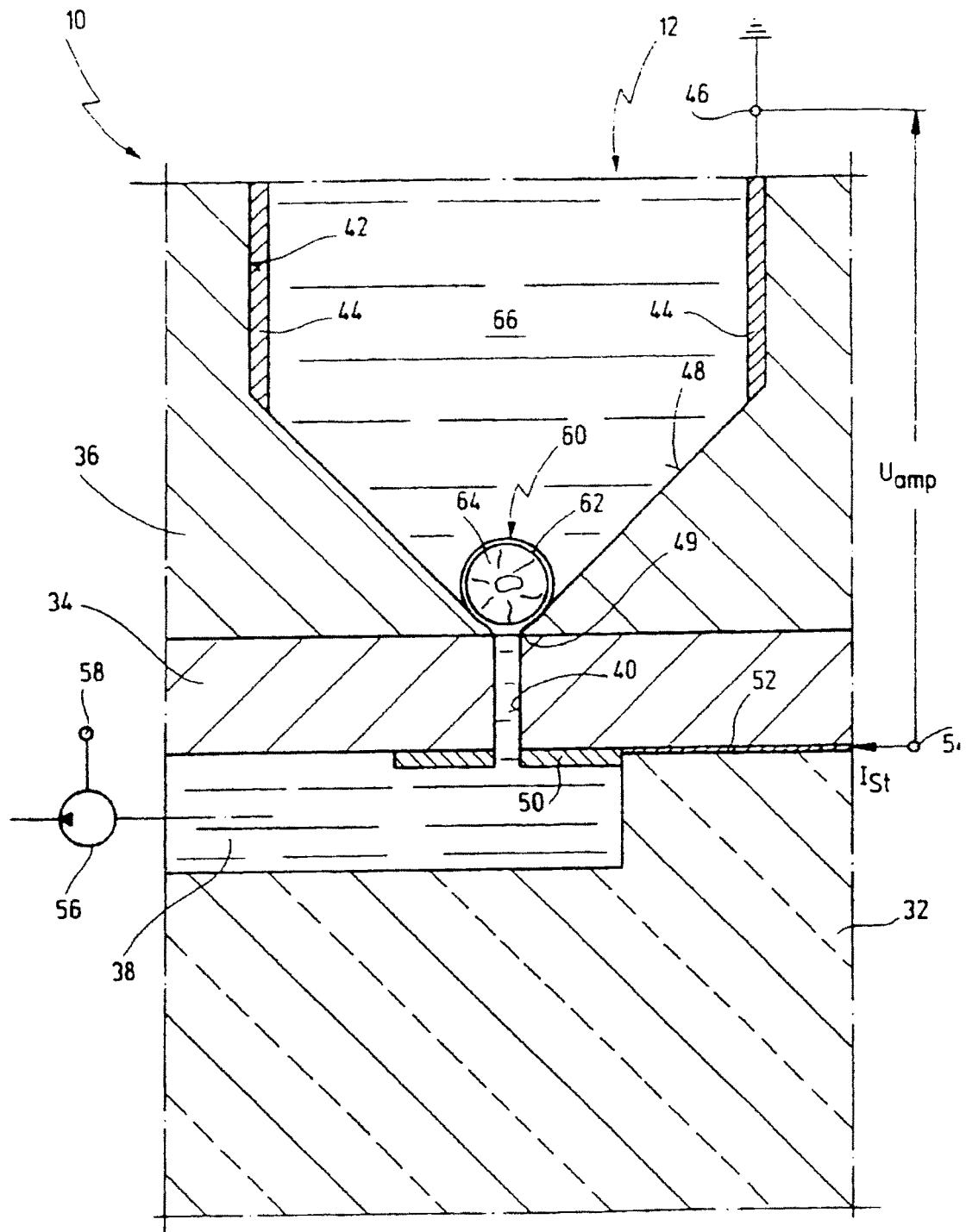
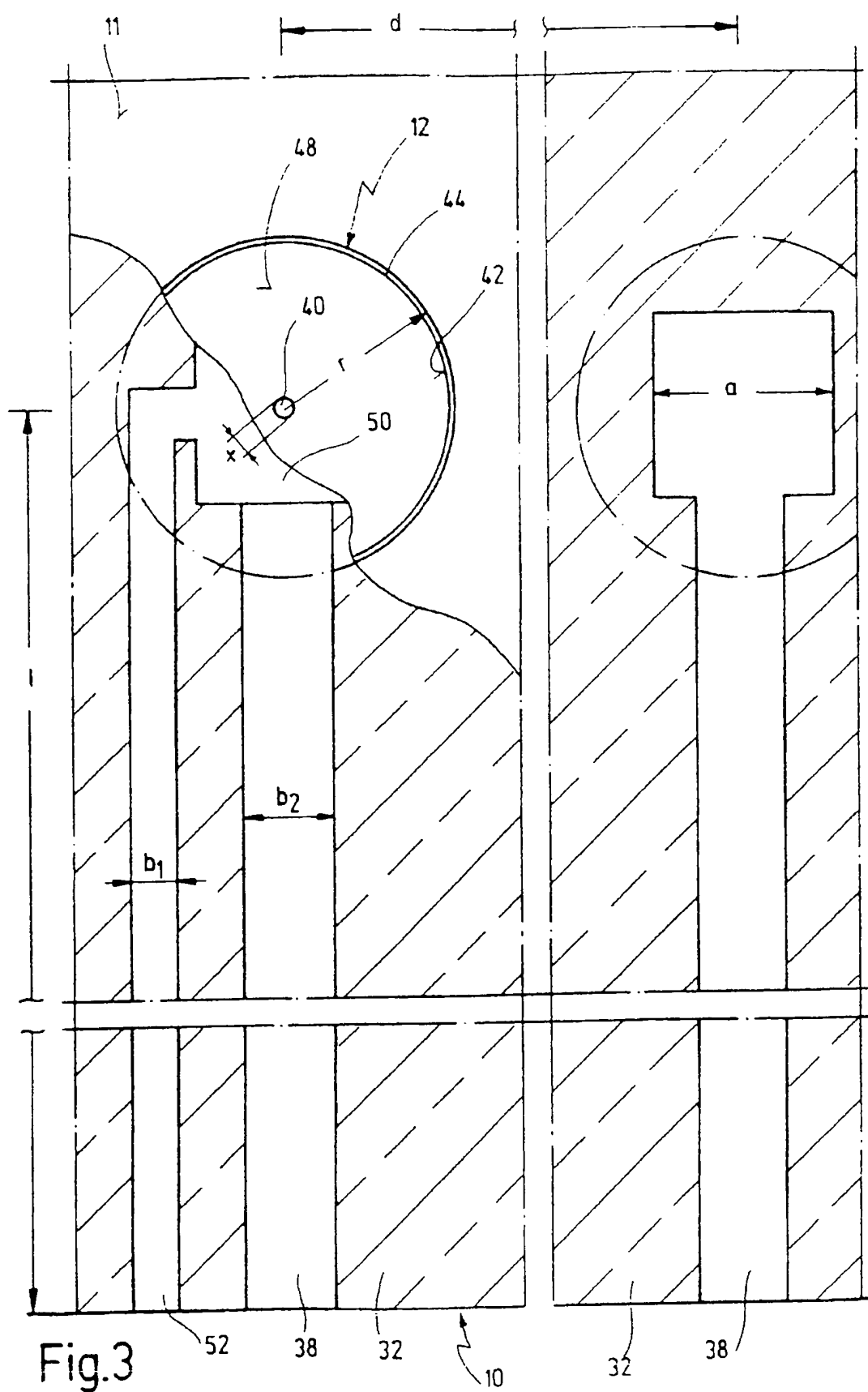


Fig.2



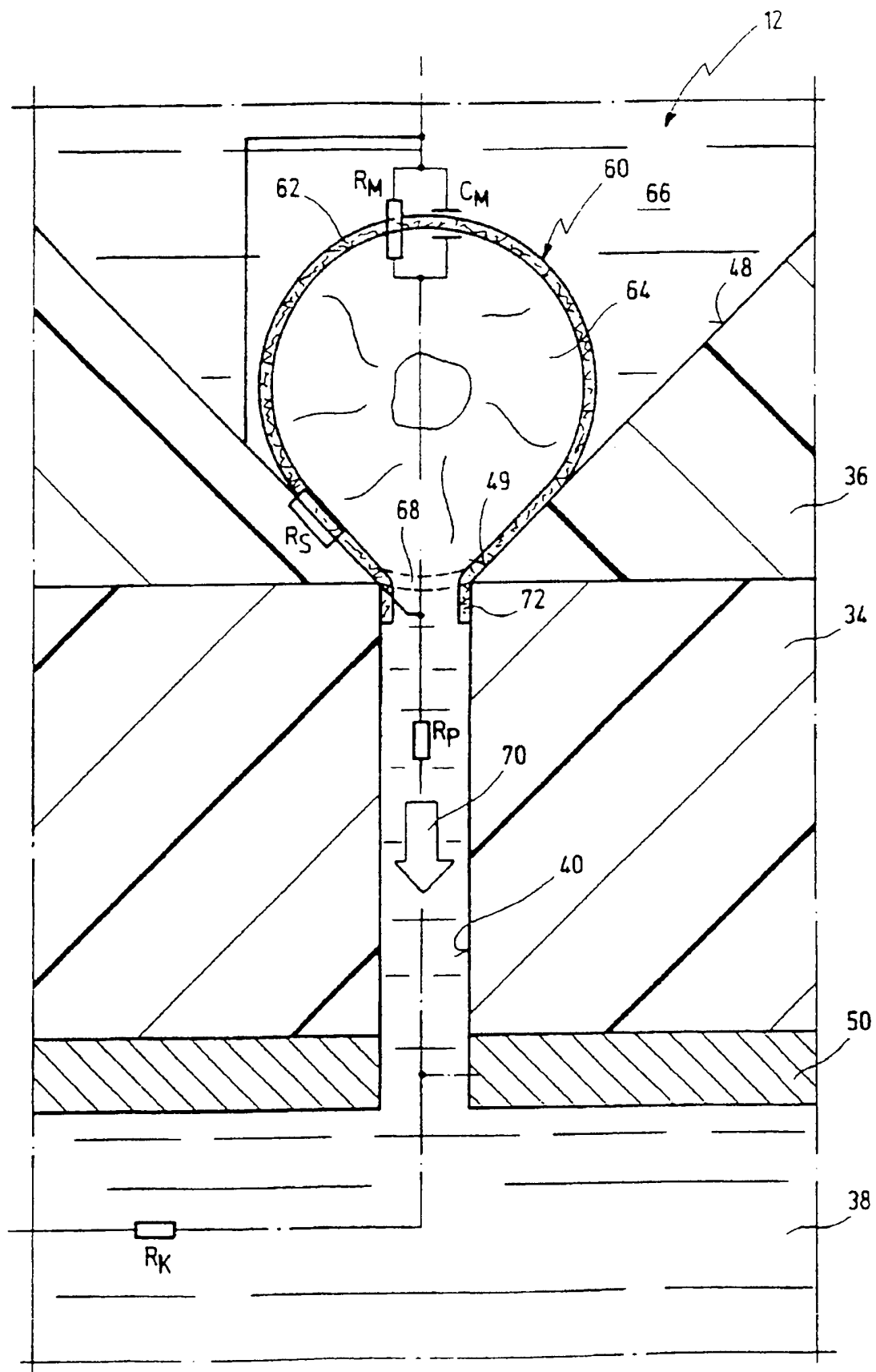


Fig.4

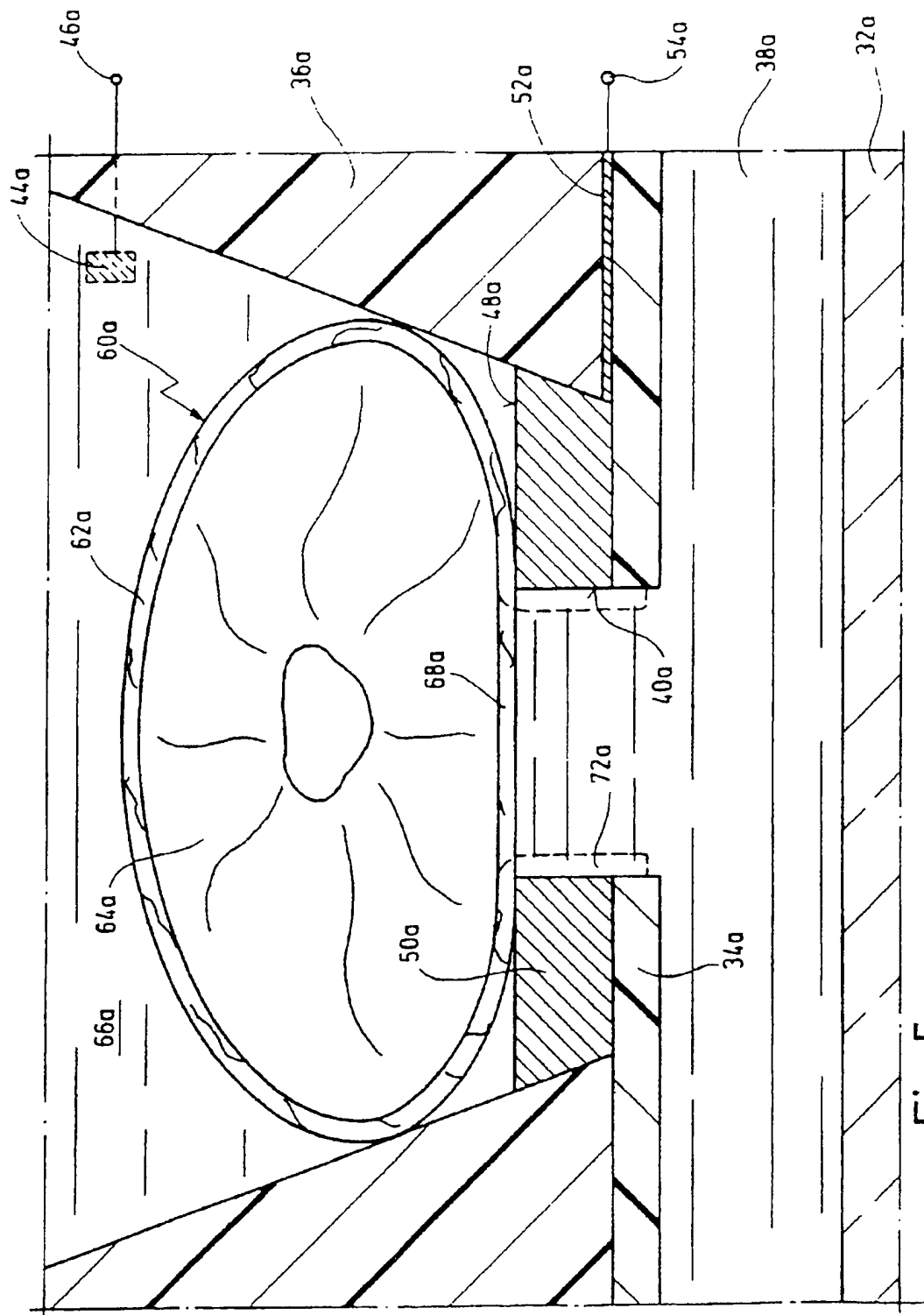


Fig. 5 ESTADO DE LA TÉCNICA

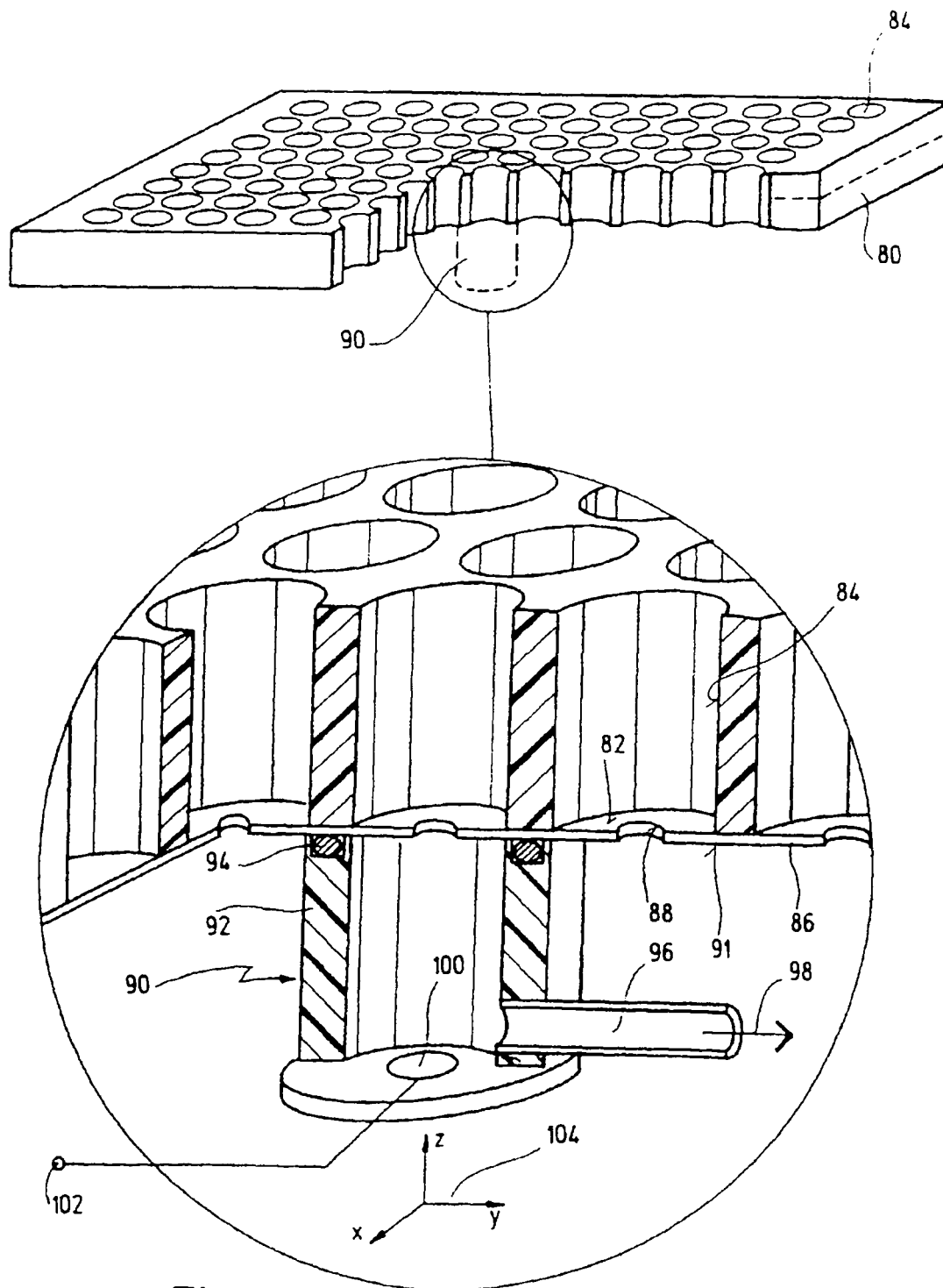


Fig.6

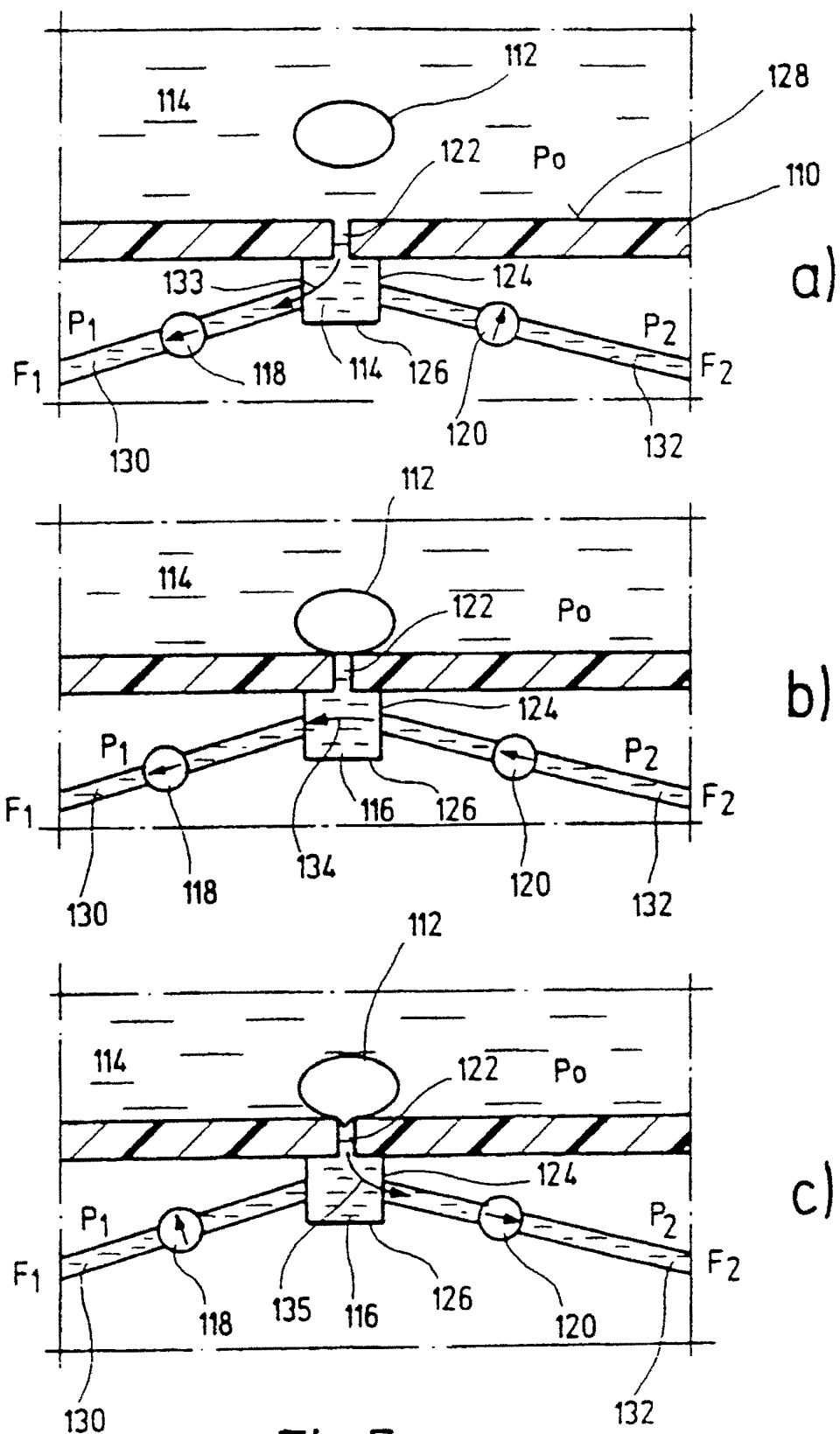


Fig.7