

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 804**

51 Int. Cl.:

B03C 5/02 (2006.01)
B03C 1/02 (2006.01)
G01N 15/14 (2014.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
B03C 1/033 (2006.01)
B03C 1/035 (2006.01)
B03C 1/28 (2006.01)
G01N 15/10 (2014.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2012** **PCT/US2012/028948**
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012** **WO12148583**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2012** **E 12777488 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2024** **EP 2701851**

54 Título: **Sistema fluidoico de inmovilización y recogida de partículas en línea y método para usar el mismo**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480811 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2024

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
1 Becton Drive, MC110
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

CHEN, YONG

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 980 804 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema fluídico de inmovilización y recogida de partículas en línea y método para usar el mismo

5 **Introducción**

La descripción se refiere a un sistema de clasificación fluídica.

10 Los sistemas de clasificación de partículas de tipo flujo, como los citómetros de flujo de clasificación, se utilizan para clasificar partículas en una muestra de fluido basándose en al menos una característica medida de las partículas. En un sistema de clasificación de partículas de tipo flujo, las partículas, tales como las moléculas, las perlas unidas a analitos, o las células individuales, en una suspensión fluida pasan en una corriente por una región de detección en la que un medio de detección de partículas detecta partículas contenidas en la corriente del tipo que va a clasificarse. El medio de detección de partículas, al detectar una partícula del tipo que va a clasificarse, activa un mecanismo de clasificación que aísla selectivamente la partícula de interés.

La detección de partículas normalmente se realiza pasando la corriente de fluido por una región de detección en la que las partículas se exponen a una luz de excitación, normalmente desde uno o más láseres, y se miden las propiedades de dispersión de la luz y fluorescencia de las partículas. Las partículas o sus componentes pueden marcarse con tintes fluorescentes para facilitar la detección, y múltiples partículas o componentes diferentes pueden detectarse simultáneamente usando tintes fluorescentes espectralmente distintos para marcar las diferentes partículas o componentes. Normalmente, la detección se realiza utilizando una pluralidad de fotosensores para facilitar la medición independiente de la fluorescencia de cada distinto tinte fluorescente.

25 Un tipo de sistema de clasificación de partículas de tipo flujo ampliamente utilizado es el tipo de clasificación electrostática. En un clasificador electrostático, la suspensión fluida se expulsa en chorro desde una boquilla y se hace vibrar para romper la corriente en gotas discretas uniformes. El mecanismo de clasificación incluye un medio de carga de gotas conectado a la corriente para cargar gotas que contengan una partícula del tipo que se va a clasificar con una carga eléctrica a medida que se separan de la corriente en chorro. La corriente de gotas se pasa a través de un campo electrostático transversal establecido por un par de placas de desviación de carga opuesta. Las gotas no cargadas no se desvían pasando a través del campo electrostático y son recogidas por un receptáculo central. Las gotas cargadas que contienen una partícula del tipo que se va a clasificar, se desvían en una dirección y cantidad relacionadas con la polaridad y magnitud de la carga de las gotas, y se recogen en distintos receptáculos de recogida. El citómetro de flujo BD FACSSaria™ de BD Biosciences (San José, CA) es un clasificador de partículas del tipo de clasificación electrostática.

Un tipo alternativo de clasificador de partículas de tipo flujo se basa en el uso de un tubo de captura de gotas en movimiento en un sistema fluídico cerrado, tal como se describe en la patente de EE. UU. núm. US 5.030.002. En este tipo de clasificador, un tubo de captura (también denominado tubo colector) se coloca en la corriente de flujo aguas abajo del medio de detección de partículas. El tubo colector normalmente se coloca en la corriente de flujo, pero fuera de la trayectoria de las partículas, que está enfocada en el centro de la corriente de flujo. El tubo colector es capaz de moverse transversalmente dentro de la corriente, de manera que pueda moverse hacia dentro y hacia fuera de la trayectoria de las partículas. El medio de detección de partículas, al detectar una partícula del tipo que se va a clasificar, desencadena el movimiento del tubo colector hacia la trayectoria de partículas para atrapar la partícula que se va a clasificar, y luego vuelve a salir de la trayectoria de partículas antes de que la siguiente partícula llegue al tubo. El citómetro de flujo BD FACSCalibur™ con opción de clasificación, de BD Biosciences (San José, CA), es un clasificador de partículas de tipo flujo basado en el mecanismo de clasificación de tubos colectores móviles.

En varias aplicaciones de la citometría de flujo, tales como la clasificación de células para uso terapéutico, es deseable un sistema fluídico cerrado, para evitar la contaminación de la muestra. Una desventaja de los clasificadores electrostáticos es que la generación de una corriente de partículas en el aire, y la formación concomitante de los aerosoles, dificultan el aislamiento de la muestra para evitar o la contaminación de la muestra o la exposición del operador a un aerosol de muestras peligrosas. El tipo de clasificador con tubo colector móvil tiene la ventaja de que la corriente de flujo está completamente cerrada y no expuesta al aire, lo que facilita que se mantenga la esterilidad del entorno de clasificación. Los clasificadores fluídicos cerrados, generalmente son más rentables que los clasificadores de gotas, y las vías fluídicas cerradas de estos clasificadores también proporcionan un medio seguro para analizar muestras peligrosas.

Un inconveniente de los clasificadores fluídicos cerrados del tipo descrito en la patente de EE. UU. núm. US 5.030.002, es que el tubo colector móvil siempre está en la corriente de fluido, incluso cuando está fuera de la trayectoria de las partículas, y recibe el fluido envolvente. Como tal, las células recogidas por el tubo colector a menudo se diluyen en el fluido envolvente hasta el punto de que la densidad celular sea incompatible (p. ej., demasiado baja) para una serie de aplicaciones clínicas y de investigación posteriores. El problema es particularmente importante cuando se clasifican células raras. Este problema de dilución celular ha impedido la adopción generalizada de los clasificadores fluídicos cerrados, a pesar de la seguridad y otras ventajas que estos clasificadores proporcionan.

Los citómetros de flujo típicos que analizan las propiedades de dispersión de la luz y fluorescencia de las células, no están diseñados para proporcionar imágenes subcelulares de las células analizadas. La citometría de flujo de obtención imágenes (IFC) es una tecnología que combina el análisis fotométrico proporcionado por un citómetro de flujo con el análisis morfométrico proporcionado por un sistema de obtención de imágenes. Un ejemplo comercial de un sistema IFC es el ImageStream, de Amnis, que utiliza la tecnología CCD de integración y retardo temporal (TDI) para capturar imágenes con resolución espectral de cada célula que pasa a través de la zona de excitación del láser en una celda de flujo con enfoque hidrodinámico. La IFC tiene una sensibilidad y un rendimiento reducidos en relación con la citometría de flujo y, por lo tanto, es difícil de utilizar para estudiar eventos raros y/o células con antígenos que se tiñen débilmente. Además, después del análisis, las células se desechan en un depósito de residuos y no se pueden utilizar para análisis adicionales ni para el cultivo celular.

Los citómetros de flujo y los citómetros de flujo de clasificación se describen en Shapiro, 2003, *Practical Flow Cytometry* (John Wiley and Sons, Inc. Hoboken, NJ); y "Flow Sorters for Biological Cells" de Tore Lindmo, Donald C. Peters y Richard G. Sweet, *Flow Cytometry and Sorting*, 2a ed. (Nueva York: Wiley-Liss, Inc., 1990), páginas 145-169. Los citómetros de flujo y los citómetros de flujo de clasificación están disponibles comercialmente de, por ejemplo, BD Biosciences (San José, CA).

Resumen

La presente invención proporciona un sistema cerrado de clasificación fluidica según la reivindicación 1 y un método de uso según la reivindicación 8, que permiten la captura, concentración y/o análisis de partículas clasificadas.

En un aspecto, el sistema comprende un clasificador fluidico cerrado con un mecanismo en línea integrado de recogida de células, configurado para localizar las partículas clasificadas, tales como las células, dentro de una cámara de flujo continuo en línea que es una cubeta óptica, y un sistema de obtención de imágenes que permite la obtención de imágenes de las partículas clasificadas localizadas. El mecanismo de recogida de células está configurado para localizar las células clasificadas y permitir que el exceso de fluido (envolvente y de muestra) pase a través de la cubeta y se deseché.

La localización de las partículas en la cubeta se lleva a cabo preferiblemente de forma magnética. Las partículas (p. ej., las células) se marcan con partículas magnéticas antes del análisis. Las células clasificadas marcadas magnéticamente son capturadas en la cubeta por un imán colocado adyacente a la cámara de flujo continuo de la cubeta. En una realización preferida, la localización de las células clasificadas es reversible, de modo que, después de la obtención de imágenes, las células clasificadas pueden liberarse para su uso posterior, como el cultivo celular, u, opcionalmente, desecharse.

El sistema de obtención de imágenes permite el análisis de las células mediante una tecnología de microscopía, tal como, por ejemplo, la microscopía convencional, la microscopía de imágenes de fluorescencia, la microscopía confocal o las tecnologías de microscopía de barrido láser.

En otro aspecto, el sistema comprende un clasificador fluidico cerrado por citometría de flujo con un mecanismo en línea integrado de recogida de células, configurado para localizar las partículas clasificadas, tales como las células, dentro de una cámara de flujo continuo, al tiempo que permite el paso de los fluidos. El sistema permite concentrar las células clasificadas dentro de la cámara de flujo continuo. En una realización preferida, la localización de las células clasificadas es reversible, de modo que, después de la obtención de imágenes, las células clasificadas puedan liberarse para su uso posterior, como el cultivo celular, u, opcionalmente, desecharse. Las células liberadas se concentrarán significativamente en relación con la concentración en la muestra clasificada.

Para su uso en la concentración de las partículas clasificadas, la localización de las partículas en la cámara de flujo continuo se puede realizar magnéticamente o mediante cualquier otro método que retenga las partículas, al tiempo que permita que los fluidos (envolventes y de muestra) fluyan a través de la cámara. En una realización, las partículas se localizan utilizando una trampa de enfoque acústico que utiliza ondas acústicas para mantener las partículas en su lugar. Al apagar la fuente de ondas acústicas se liberan las partículas de la trampa.

Los aspectos anteriores de la invención pueden combinarse y realizarse simultáneamente. Por ejemplo, el uso de un sistema que comprende un clasificador fluidico cerrado con un mecanismo en línea integrado de recogida de células, configurado para localizar magnéticamente de forma reversible las partículas clasificadas dentro de una cubeta óptica en línea (cámara de flujo continuo), y un sistema de obtención de imágenes que permite la obtención de imágenes de las partículas clasificadas localizadas, permite un análisis óptico adicional de las partículas clasificadas, la concentración de las partículas clasificadas, y la recuperación de las partículas clasificadas para su uso posterior.

Los sistemas y métodos en cuestión encuentran uso en una variedad de diferentes aplicaciones en las que se desee inmovilizar de forma reversible una partícula de interés. Como se indicó anteriormente, los sistemas de clasificación fluidica cerrados del tipo descrito en la patente de EE. UU. núm. US-5.030.002, clasifican las partículas utilizando un tubo colector móvil en una ubicación aguas abajo del punto de interrogación. Cuando se identifica una partícula de interés mediante el análisis óptico realizado en el punto de interrogación, la abertura del tubo colector se mueve hacia

el centro de la corriente de flujo (es decir, la corriente central), hacia la trayectoria de la partícula, de manera que la partícula entre en el tubo colector. Cuando no se detecta una partícula de interés en el punto de interrogación, la abertura del tubo colector se mantiene alejada de la corriente central, y solo se recoge el fluido envolvente. Por consiguiente, un inconveniente de tales clasificadores fluidicos cerrados es que las partículas de interés se recogen
 5 junto con un flujo constante de fluido envolvente que diluye las partículas clasificadas. La presente invención resuelve este problema al permitir la concentración de las partículas clasificadas. La inmovilización de las partículas en la cámara de flujo, a la vez que se permite el paso del fluido, concentra las partículas. Invertir la inmovilización (p. ej., desactivando el medios de inmovilización) libera las partículas de la cámara de flujo continuo, y permite que se recojan a densidades adecuadas para aplicaciones clínicas y/o de investigación posteriores.

10 Como se indicó anteriormente, los clasificadores fluidicos de la invención incluyen, opcionalmente, un componente de análisis configurado para analizar una o más partículas dentro de la cámara de flujo continuo. La capacidad de analizar las partículas inmovilizadas es útil en aplicaciones de investigación, en donde el análisis de una o más características de la partícula (posibilitado por la inmovilización reversible de la partícula en una cámara de flujo continuo según la
 15 invención) conduce a una mejor comprensión de la naturaleza de la partícula. Dichas aplicaciones también incluyen aplicaciones de diagnóstico, p. ej., aplicaciones en donde el análisis de una o más características de la partícula facilite el diagnóstico de un sujeto con respecto a una afección determinada, p. ej., una afección patológica.

La capacidad de analizar las partículas inmovilizadas también se usa en una variedad de aplicaciones terapéuticas, p. ej., aplicaciones de terapia celular. Por ejemplo, el análisis de una célula inmovilizada de forma reversible en un sistema de clasificación fluidica de la invención, puede facilitar la selección o exclusión de esa célula para su posterior trasplante en un paciente con una afección médica específica. A modo de ejemplo, una célula (p. ej., una célula madre, una célula de médula ósea, o cualquier otra célula que pueda utilizarse en una aplicación terapéutica) puede
 20 inmovilizarse de forma reversible y analizarse para determinar una o más características subcelulares y/o extracelulares (p. ej., características físicas, químicas y/o biológicas) indicativas o predictivas de la eficacia de esa célula en una aplicación terapéutica específica basada en células. Dichas aplicaciones incluyen el tratamiento de una variedad de afecciones médicas que incluyen, pero no se limitan a, el cáncer (p. ej., leucemia, linfoma y cánceres de mama, páncreas, pulmón, riñón, sistema nervioso [p. ej., cerebro], colon, endometrio, piel, próstata, tiroides y otros tipos de cáncer), afecciones del sistema inmunitario (p. ej., infección por VIH y/o inmunodeficiencias adquiridas asociadas), afecciones endocrinas (p. ej., diabetes), enfermedades neurodegenerativas (p. ej., enfermedad de
 25 Parkinson, enfermedad de Alzheimer, etc.) y cualquier otra afección médica para la que una terapia a base de células esté disponible o sea deseable.

La capacidad de analizar ópticamente las células clasificadas mediante un sistema de obtención de imágenes permite
 35 combinar el análisis de las células que tiene lugar aguas arriba del medio de clasificación, que se realiza en función de las propiedades ópticas que se pueden medir con un citómetro de flujo, y que se utiliza en la decisión de clasificación, y el análisis de obtención imágenes. El análisis de obtención de imágenes permite una identificación y caracterización adicional de las células clasificadas. Esta información adicional se puede usar para confirmar las propiedades de las células y acceder a la idoneidad de las células clasificadas para aplicaciones específicas, tal como para usos terapéuticos. Si las células clasificadas cumplen suficientemente los criterios para su uso en la aplicación
 40 terapéutica de interés, las células pueden liberarse de la cámara de flujo continuo invirtiendo la inmovilización, como se describió anteriormente. Por ejemplo, las células pueden recogerse en un recipiente de recogida adecuado (p. ej., un recipiente de recogida estéril con un medio apropiado), trasplantarse a un paciente según un protocolo de trasplante, o almacenarse para un posterior trasplante, p. ej., almacenarse congeladas en un medio de congelación adecuado. Si las células clasificadas no cumplen con los requisitos de idoneidad, las células pueden liberarse de la
 45 cámara de flujo continuo y desecharse.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona sistemas de clasificación fluidica que incluyen una cámara de flujo continuo configurada para recibir una partícula (p. ej., una célula) en una corriente de fluido desde un tubo colector, y un componente de inmovilización de partículas configurado para inmovilizar de forma reversible la
 50 partícula dentro de la cámara de flujo continuo. El sistema de clasificación fluidica es un sistema cerrado de clasificación fluidica, p. ej., un sistema en el que un tubo colector móvil dispuesto aguas abajo del punto de interrogación se mueve hacia la corriente central cuando se detecta una partícula de interés (p. ej., una partícula que cumpla ciertos criterios espectrales, de tamaño, granularidad, u otros criterios) en el punto de interrogación, de manera que el tubo colector capture la partícula de interés aguas abajo del punto de interrogación. En determinadas
 55 realizaciones, el componente de inmovilización de partículas inmoviliza de forma reversible la partícula por medios magnéticos. Por ejemplo, el componente de inmovilización de partículas incluye, opcionalmente, un generador de campo magnético, tal como un imán permanente, un electroimán o ambos. Por consiguiente, los sistemas de clasificación fluidica de la invención pueden incluir partículas marcadas magnéticamente. En otras realizaciones, la inmovilización se logra por medios acústicos, p. ej., en los que el componente de inmovilización de partículas incluye un generador de campo acústico.

Opcionalmente, los sistemas de clasificación fluidica de la invención incluyen, además, un componente de análisis configurado para analizar la partícula inmovilizada dentro de la cámara de flujo continuo. En ciertos aspectos, el
 65 componente de análisis incluye un microscopio, p. ej., un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de barrido láser o cualquier otro microscopio útil para analizar una o más

características de partículas de interés. Para facilitar la observación de la partícula inmovilizada, la cámara de flujo continuo incluye, opcionalmente, una cubeta óptica de flujo continuo.

La presente invención también proporciona métodos que incluyen atrapar una partícula (p. ej., una célula) que fluya desde un punto de interrogación en un sistema de clasificación fluidica, llevar la partícula a una cámara de flujo continuo, e inmovilizar, preferiblemente de forma reversible, la partícula dentro de la cámara de flujo continuo. En algunos aspectos, inmovilizar la partícula incluye, opcionalmente, generar un campo magnético dentro de la cámara de flujo continuo. En otros aspectos, inmovilizar la partícula comprende generar un campo acústico dentro de la cámara de flujo continuo.

Según una realización, los métodos incluyen, además, analizar la partícula inmovilizada dentro de la cámara de flujo continuo. El análisis de la partícula inmovilizada puede incluir observar la partícula usando un microscopio, p. ej., un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de barrido láser, y similares. Opcionalmente, los métodos incluyen invertir la inmovilización para liberar la partícula de la cámara de flujo continuo, y recoger la partícula liberada.

En otros aspectos, se proporcionan componentes para su uso en un sistema de clasificación fluidica. Los componentes incluyen una cámara de flujo continuo configurada para recibir una partícula en una corriente de fluido desde un tubo colector, y un subcomponente de inmovilización configurado para inmovilizar de forma reversible la partícula dentro de la celda de la cámara de flujo continuo. El subcomponente de inmovilización puede incluir un generador de campo magnético (p. ej., un imán permanente y/o un electroimán) o un generador de campo acústico. Según una realización, el componente incluye, además, un subcomponente de análisis configurado para analizar la partícula inmovilizada dentro de la cámara de flujo continuo. El componente de análisis incluye, opcionalmente, un microscopio, tal como un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de barrido láser, etc. En ciertos aspectos, la cámara de flujo continuo de los componentes de la invención incluye una cubeta óptica de flujo continuo.

Según una realización no cubierta por la invención reivindicada, se proporcionan kits que incluyen una cámara de flujo continuo configurada para acoplarse fluidicamente a un tubo colector en un sistema de clasificación fluidica, y un componente de inmovilización configurado para inmovilizar de forma reversible una partícula dentro de la cámara de flujo continuo. El componente de inmovilización incluye, opcionalmente, un generador de campo magnético o un generador de campo acústico.

Los sistemas, métodos, componentes y kits de clasificación fluidica resumidos anteriormente, se describen con mayor detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 proporciona una vista esquemática de un sistema de clasificación fluidica según una realización de la invención.

La Figura 2 es una ilustración esquemática de un sistema de clasificación fluidica según otra realización de la invención.

Descripción pormenorizada

Al describir adicionalmente las realizaciones de la invención, los aspectos de las realizaciones de los sistemas de clasificación fluidica se describirán primero con mayor detalle. Posteriormente, se describen con mayor detalle aspectos de las realizaciones de los métodos de uso de los sistemas de clasificación fluidica. A continuación, se describen con mayor detalle aspectos de las realizaciones de los componentes y kits no cubiertos por la invención reivindicada.

Sistemas

Clasificación

Tal como se usa en la presente memoria, un clasificador fluidico cerrado se refiere a un clasificador, tal como un citómetro de flujo de clasificación, que clasifica las partículas suspendidas en una corriente de fluido que pasa a través de un canal de flujo, redirigiendo una parte de la corriente de fluido que contiene una partícula de interés a un canal fluidico separado, sin expulsar la corriente de flujo a través de una boquilla en una corriente de gotas en el aire. Las partículas de interés se identifican analizando las partículas a medida que fluyen a través de una región de detección (punto de interrogación) dentro del canal de flujo, como ocurre con un típico citómetro de flujo de clasificación. La redirección temporal de la corriente de fluido se realiza preferiblemente utilizando un tubo colector móvil, como se describe en la patente de EE. UU. núm. US 5.030.002. De manera alternativa, la redirección temporal de la corriente de fluido se puede realizar utilizando cualquier mecanismo de válvula que pueda redirigir eficazmente la corriente de fluido mediante control automático en respuesta a la detección de una partícula de interés.

Como en un típico citómetro de flujo de clasificación, las partículas suspendidas en un medio líquido se hacen pasar a través de un canal fluido estrecho de una en una pasando por una región de detección. Las partículas se marcan antes del análisis, con uno o más tintes fluorescentes para facilitar la identificación. Al pasar por la región de detección, las partículas marcadas se exponen a la luz de excitación, normalmente de uno o más láseres, y se mide la fluorescencia de las partículas resultantes. Normalmente, también se mide la cantidad de luz de excitación dispersada por las partículas. La cantidad de luz dispersada y la intensidad de la luz fluorescente emitida por cada uno de los marcadores unidos proporcionan una caracterización de las partículas marcadas. Normalmente, las partículas que se van a clasificar (es decir, las partículas de interés) se identifican usando algún criterio que se base en una o más de las propiedades ópticas.

Cámara de flujo continuo

Los sistemas de clasificación fluidica de la invención incluyen una cámara de flujo continuo configurada para recibir una partícula en una corriente de fluido desde un tubo colector, y están configurados para inmovilizar la partícula en la cámara de flujo continuo. Opcionalmente, los sistemas se configuran para analizar las partículas inmovilizadas en la cámara de flujo continuo. La cámara de flujo continuo puede tener cualquier configuración conveniente y fabricarse de cualquier material conveniente. En un aspecto, la cámara de flujo continuo es una cubeta óptica de flujo continuo, p. ej., una cubeta de calidad óptica suficiente como para que las partículas dentro de la cubeta puedan analizarse, p. ej., utilizando un sistema de microscopio. Las dimensiones de la cámara de flujo continuo pueden variar.

Las dimensiones de la cámara de flujo continuo se pueden elegir según, p. ej., el volumen de fluido deseado que debe alojar la cámara de flujo continuo, etc. Normalmente, las cámaras de flujo continuo tendrán un volumen de aproximadamente uno a más de 10 mililitros. Las cámaras de flujo continuo de interés incluyen al menos un puerto de entrada de fluido y al menos un puerto de salida de fluido, donde los al menos un puerto de entrada y de salida se configuran para permitir el flujo de fluido hacia, a través y desde la cámara de flujo continuo. Las cámaras de flujo continuo pueden incluir características adicionales, si se desea, tales como múltiples puertos, válvulas, etc. Las cámaras de flujo continuo empleadas en los sistemas de la invención pueden fabricarse utilizando cualquier protocolo conveniente, tal como mediante protocolos de fabricación de dispositivos microfluídicos.

En las realizaciones en las que la clasificación se realiza utilizando un tubo colector móvil, tal como se describe, p. ej., en la patente de EE. UU. núm. US 5.030.002, la cámara de flujo continuo de la presente invención se acopla fluidicamente al tubo colector móvil, y se configura para recibir una partícula de interés capturada selectivamente por el tubo colector, como se ilustra esquemáticamente en la Figura 2.

Inmovilización

Un componente de inmovilización de partículas está acoplado operativamente a la cámara de flujo continuo en los sistemas de la invención. Por componente de inmovilización de partículas, se entiende un componente de un sistema de clasificación fluidica configurado para inmovilizar, preferiblemente de forma reversible, una partícula dentro de una cámara de flujo continuo del sistema. El subcomponente de inmovilización de partículas puede configurarse para inmovilizar una partícula de interés mediante una variedad de mecanismos.

En algunos casos, el subcomponente de inmovilización de partículas puede incluir un generador de campo magnético, p. ej., un imán permanente, un electroimán o una combinación de los mismos. Para su uso con un subcomponente de inmovilización magnética, las partículas se marcan con una o más perlas magnéticas antes del análisis. Este marcado magnético se suma a cualquier marcado fluorescente, si lo hubiera, utilizado para identificar las células de interés. Normalmente, las células se marcarán con anticuerpos marcados tanto magnética como fluorescentemente, aunque en algunos casos, la clasificación de las partículas de interés puede basarse únicamente en las propiedades de dispersión de la luz o en la fluorescencia celular inherente.

Normalmente, el marcado magnético de las células se realiza utilizando perlas magnéticas conjugadas con uno o más anticuerpos que se unen a un polipéptido en la superficie de la célula, p. ej., un receptor de la superficie celular. Por ejemplo, los glóbulos blancos se pueden marcar con perlas magnéticas que incluyan anticuerpos que se unan específicamente al CD45, las células madre se pueden marcar con perlas magnéticas que incluyan anticuerpos que se unan específicamente al CD34, etc. Los anticuerpos unidos a las perlas magnéticas adecuadas para marcar células, son muy conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente de múltiples proveedores, p. ej., BD Biosciences (San José, CA). Cuando la partícula marcada magnéticamente entra en la cámara de flujo continuo, un campo magnético generado por el subcomponente de inmovilización de partículas inmoviliza la partícula dentro de la cámara de flujo continuo.

La inmovilización de partículas es reversible. Por ejemplo, cuando el subcomponente de inmovilización de partículas incluye un imán permanente, el imán puede colocarse lo suficientemente adyacente a la cámara de flujo continuo de manera que un campo magnético generado por el imán inmovilice la partícula. Cuando ya no se desee la inmovilización de partículas, p. ej., cuando sea deseable recoger la una o más partículas inmovilizadas, la distancia entre el imán permanente y la cámara de flujo continuo puede aumentarse, p. ej., moviendo el imán a una ubicación más distante

de la cámara de flujo continuo, de manera que el campo magnético sea insuficiente para mantener la inmovilización de la partícula. En un aspecto relacionado, cuando el subcomponente de inmovilización de partículas incluya un electroimán colocado adyacente a la cámara de flujo continuo, se puede permitir que una corriente fluya a través de una bobina del imán, generando así un campo magnético suficiente como para inmovilizar las partículas en la cámara de flujo continuo. El invertir la inmovilización se puede lograr reduciendo o eliminando la corriente que fluye a través de la bobina. La presente invención también proporciona subcomponentes para la inmovilización reversible de partículas, que incluyen un imán permanente y un electroimán, para inmovilizar de forma reversible partículas marcadas magnéticamente dentro de la cámara de flujo continuo.

En otra realización, la inmovilización de partículas se logra utilizando un subcomponente de inmovilización de partículas, que incluye un campo acústico y/o un generador de nodos de presión configurado para producir un campo acústico o de desplazamiento dentro de la cámara de flujo continuo. Tal como se usa en la presente memoria, un “generador de campo acústico” incluye un generador de vibraciones, tal como un transductor piezoeléctrico (que convierte la energía eléctrica en energía mecánica), un generador de desplazamiento, un elemento de accionamiento en línea, o cualquier otro dispositivo capaz de producir dentro de la cámara de flujo continuo un campo acústico o de desplazamiento suficiente como para inmovilizar la partícula de interés, p. ej., de modo que la presión del campo acústico o del de desplazamiento atrape la partícula de interés en una superficie de la cámara de flujo continuo. La inmovilización acústica y/o la concentración de partículas dentro de un dispositivo fluido se describen, p. ej., en la patente de EE. UU. núm. US-7.837.040, titulada: “Acoustic Concentration of Particles in Fluid Flow”, y la patente de EE. UU. núm. US-7.373.805, titulada: “Apparatus for Directing Particles in a Fluid”.

La inmovilización de partículas utilizando un generador de campo acústico y/o un generador de nodos de presión es reversible. El invertir la inmovilización de la partícula dentro de la cámara de flujo continuo se logra reduciendo la intensidad (o eliminándola por completo) del campo acústico o del de desplazamiento generado por el generador de campo acústico, p. ej., apagando el generador.

En ciertos aspectos, el subcomponente de inmovilización de partículas está sincronizado con la cámara de flujo continuo. Por ejemplo, la cámara de flujo continuo puede estar conectada a múltiples puertos con válvulas asociadas. Las válvulas pueden sincronizarse con un interruptor (p. ej., un interruptor que reduzca o elimine la generación de campo magnético por el subcomponente de inmovilización de partículas) que invierta la inmovilización, de modo que las células deseadas puedan recogerse en un puerto para su posterior procesamiento, y desecharse las células no deseadas.

Componente de análisis

Los sistemas de la invención incluyen, opcionalmente, un componente de análisis configurado para analizar una partícula inmovilizada dentro de la cámara de flujo continuo. El componente de análisis puede incluir cualquier dispositivo capaz de analizar una o más características de partículas de interés para un usuario del sistema. Según esta realización, el componente de análisis está acoplado operativamente (p. ej., acoplado ópticamente) a la cámara de flujo continuo, para permitir el análisis de las partículas inmovilizadas en la misma.

En ciertos aspectos, el componente de análisis incluye un microscopio. El microscopio puede ser un microscopio convencional (p. ej., un microscopio que ilumine la partícula con luz para producir una imagen ampliada de la partícula), un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de barrido láser, o cualquier otro tipo de microscopio útil para analizar partículas en un sistema de clasificación fluida. Según esta realización, el microscopio se acopla ópticamente a la cámara de flujo continuo. Por ejemplo, el microscopio y la cámara de flujo continuo pueden configurarse de tal manera que el microscopio ilumine (p. ej., proporcione radiación de excitación a) la partícula inmovilizada y genere una imagen ampliada de la partícula.

Los sistemas de citometría de flujo tradicionales analizan las partículas según su tamaño, granularidad y emisión de fluorescencia. El componente de análisis opcional de la presente invención permite la observación directa de los atributos de las partículas que no se pueden observar utilizando sistemas de citometría de flujo tradicionales. Por ejemplo, cuando el subcomponente de análisis incluye un microscopio y la partícula es una célula, se pueden observar y/o medir las propiedades físicas, químicas y/o biológicas subcelulares de la célula inmovilizada.

La partícula recogida por el tubo colector puede suministrarse posteriormente a un recipiente de recogida apropiado, p. ej., un tubo de recogida, un micropocillo, una placa de cultivo de tejidos, o cualquier recipiente de recogida conveniente para una aplicación adicional de interés, p. ej., el aislamiento de ácidos nucleicos, el cultivo de células y/o tejidos, y similares. La recogida y el depósito de una célula de interés pueden realizarse en condiciones estériles para aplicaciones afectadas adversamente, p. ej., por la contaminación microbiana.

Descripción basada en las figuras

En la **Figura 1** se proporciona una vista esquemática de un sistema de clasificación fluida según una realización de la invención. Como se muestra, el sistema **100** incluye una cámara **102** de flujo continuo configurada para recibir una partícula en una corriente de fluido desde un tubo colector (mostrado como círculos negros sólidos). El sistema también

incluye el subcomponente **104** de inmovilización de partículas configurado para inmovilizar de forma reversible la partícula **106** dentro de la cámara de flujo continuo. Debido a que puede ser deseable analizar la partícula en la cámara de flujo continuo, el sistema incluye, opcionalmente, el subcomponente **108** de análisis configurado para analizar la partícula inmovilizada dentro de la cámara de flujo continuo.

En la **Figura 2** se ilustra esquemáticamente un sistema de clasificación fluidica según una segunda realización de la invención. En esta realización, el sistema **200** de clasificación fluidica es un sistema cerrado de clasificación fluidica que tiene un tubo **202** colector móvil configurado para recibir una o más partículas de interés a medida que las partículas fluyen desde el punto **204** de interrogación. Las partículas recogidas por el tubo colector **202** se suministran a una cámara de flujo continuo, p. ej., la cubeta **206** óptica de flujo continuo configurada para recibir una partícula en una corriente de fluido desde el tubo colector. Las partículas **208** de interés marcadas magnéticamente se inmovilizan dentro de la cubeta **206** mediante un campo magnético generado por un componente de inmovilización de partículas que incluye el electroimán **210**. Opcionalmente, el sistema incluye un componente de análisis que incluye el microscopio **212** configurado para analizar una o más partículas, p. ej., las partículas **208**, inmovilizadas dentro de la cámara **206** de flujo continuo. En un aspecto, la presente invención proporciona el sistema ilustrado esquemáticamente en la Figura 2 como un sistema completo, p. ej., un clasificador fluidico cerrado con una cámara de flujo continuo integrada y un componente para la inmovilización reversible (y, opcionalmente, componentes para el análisis y/o la recogida de una partícula de interés). En otras realizaciones, como se describe más adelante, pero no cubiertas por la invención reivindicada, la cámara de flujo continuo y el componente de inmovilización (y, opcionalmente, un componente de análisis y/o un medio de recogida) también pueden proporcionarse como un componente o como un kit, p. ej., para otorgar una funcionalidad adicional a un sistema existente de clasificación fluidica. Los componentes y kits se describen a continuación en la presente memoria.

Según determinadas realizaciones de la presente invención, p. ej., el sistema **200** de clasificación fluidica ilustrado esquemáticamente en la Figura 2, la inmovilización reversible de partículas proporcionada por la presente invención, es útil no solo para permitir la observación de partículas de interés en la cámara de flujo continuo, sino también para analizar y recoger partículas de interés (p. ej., células raras) a densidades de partículas que no se puedan lograr utilizando clasificadores fluidicos cerrados convencionales. Como se describió anteriormente, cuando el tubo colector de un clasificador fluidico cerrado convencional no captura selectivamente una partícula de interés, el tubo colector recoge el fluido envolvente. En consecuencia, las partículas de interés se recogen a densidades demasiado bajas para ciertos tipos de análisis. Como proporcionan determinadas realizaciones de los sistemas de clasificación fluidica de la presente invención, la inmovilización de partículas aguas abajo del tubo colector concentra eficazmente las partículas, lo que facilita su análisis eficiente dentro del sistema y/o su recogida final a densidades suficientes para su posterior análisis, experimentación, manipulación y/o uso.

Métodos

La invención también proporciona métodos, p. ej., métodos de uso de los sistemas de clasificación fluidica descritos anteriormente. Los métodos incluyen clasificar una partícula de interés utilizando un sistema cerrado de clasificación fluidica, llevar la partícula a una cámara de flujo continuo, e inmovilizar, preferiblemente de forma reversible, la partícula dentro de una cámara de flujo continuo.

En una realización de los métodos de la invención, las partículas se inmovilizan utilizando un campo magnético generado dentro de la cámara de flujo continuo, como se describió anteriormente. En otras realizaciones, las partículas se inmovilizan utilizando un campo acústico y/o un nodo de presión dentro de la cámara de flujo continuo, como se describió anteriormente.

En otras realizaciones, los métodos incluyen, además, analizar la partícula inmovilizada dentro de la cámara de flujo continuo. El análisis de la partícula inmovilizada se realiza preferiblemente utilizando un microscopio óptico. El microscopio puede ser cualquier microscopio que sea útil en el análisis de las características de las partículas de interés, incluido un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal o un microscopio de barrido láser.

Puede ser deseable recoger la partícula de la cámara de flujo continuo, para permitir el posterior análisis, experimentación, manipulación y/o uso de la partícula. Como tal, los métodos de la invención incluyen, opcionalmente, invertir la inmovilización para liberar la partícula, y recoger la partícula liberada. Los enfoques adecuados para recoger la partícula liberada incluyen el empleo de un clasificador de partículas acoplado operativamente a la cámara de flujo continuo.

Kits

La presente descripción también proporciona kits no cubiertos por la invención reivindicada. Los kits son útiles, p. ej., para incorporar la cámara de flujo continuo y el componente de inmovilización descritos anteriormente en un sistema de clasificación fluidica que carezca de dichos componentes. Los kits incluyen una cámara de flujo continuo (p. ej., una cubeta óptica de flujo continuo) configurada para acoplarse fluidicamente a un sistema de clasificación fluidica, y un componente de inmovilización configurado para inmovilizar de forma reversible una partícula dentro de la cámara

de flujo continuo. Opcionalmente, los kits incluyen un componente de análisis configurado para analizar una partícula inmovilizada de forma reversible dentro de la cámara de flujo continuo. El componente de inmovilización puede incluir un generador de campo magnético o un generador de campo acústico, como se describió anteriormente. El componente de análisis opcional puede incluir un microscopio, p. ej., un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, un microscopio de barrido láser, y cualquier otro tipo de microscopio que sea útil en sistemas de clasificación fluidica.

Los componentes del kit (incluida la cámara de flujo continuo) pueden proporcionarse como una sola unidad (p. ej., como el componente **214** de la Figura 2), donde la incorporación de los componentes en el sistema de clasificación fluidica podría lograrse fácilmente acoplando fluidicamente la cámara de flujo continuo de la unidad a un sistema de clasificación fluidica, p. ej., un clasificador fluidico cerrado. De manera alternativa, uno o más de, p. ej., la cámara de flujo continuo y/o el componente de inmovilización pueden proporcionarse como componentes individuales del kit para su integración por separado en un sistema de clasificación fluidica.

Los kits en cuestión incluirán, además, instrucciones para, p. ej., acoplar operativamente los componentes del kit (ya sea como una sola unidad o individualmente) a un sistema de clasificación fluidica. Estas instrucciones pueden encontrarse en los kits objeto en una variedad de formas, una o más de las cuales pueden encontrarse en el kit. Una forma para que estén presentes estas instrucciones es como información impresa en un medio o sustrato adecuado, p. ej., una o varias hojas de papel donde esté impresa la información, en el embalaje del kit, en un prospecto, etc. Otro medio más sería un soporte legible por ordenador, p. ej., disquete, CD, etc., donde se haya grabado la información. Otro medio más que puede estar presente es una dirección de sitio web que pueda utilizarse a través de Internet, para acceder a la información en un sitio remoto. En los kits puede haber cualquier medio conveniente.

Debe entenderse que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas en la presente memoria, ya que, por supuesto, pueden variar. También debe entenderse que la terminología utilizada en la presente memoria tiene por objeto describir solamente realizaciones particulares, y no pretende ser limitativa, ya que el alcance de la presente invención se limitará únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor indicado o intermedio en ese intervalo indicado, está abarcado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños, y también están abarcados dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluya uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de esos límites incluidos también se incluyen en la invención.

Ciertos intervalos se presentan en la presente memoria con valores numéricos precedidos por el término “aproximadamente”. El término “aproximadamente” se utiliza en la presente memoria para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como un número cercano o aproximado al número que precede al término. Para determinar si un número está cerca de o aproximadamente a un número específicamente recitado, el número no recitado cercano o aproximado puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporcione el equivalente sustancial del número específicamente recitado.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria también se puede usar en la práctica o prueba de la presente invención, ahora se describen métodos y materiales ilustrativos representativos.

Cabe señalar que tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones se pueden redactar para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva como “únicamente”, “solamente” y similares en relación con la recitación de los elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación “negativa”.

Se aprecia que ciertas características de la invención, que, por motivos de claridad, se describen en el contexto de realizaciones por separado, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. Por el contrario, varias características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las realizaciones están específicamente incluidas en la presente invención, y se describen en la presente memoria exactamente como si todas y cada una de las combinaciones se divulgaran individual y explícitamente, en la medida en que tales combinaciones abarcan procesos y/o dispositivos/sistemas/kits operativos. Además, todas las subcombinaciones enumeradas en las realizaciones que describen tales variables, también están incluidas específicamente en la presente invención, y se describen en la presente memoria exactamente como si todas y cada una de estas subcombinaciones de grupos químicos se divulgaran individual y explícitamente en la presente memoria.

Como resultará evidente para los expertos en la técnica al leer esta divulgación, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes y características diferenciados que pueden separarse fácilmente, o combinarse con las características de cualquiera de las otras diversas realizaciones, sin abandonar el ámbito de la presente invención como se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

- 5 Cualquier método recitado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos recitados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (200) cerrado de clasificación fluidica, que comprende:
 - 5 un componente de detección configurado para detectar una partícula (106, 208) de interés en una corriente de flujo de partículas en un punto (204) de interrogación; y
 - un tubo (202) colector móvil configurado para activarse para moverse a una posición para recibir la partícula (106, 208) de interés detectada que fluye desde el punto (204) de interrogación cuando la
 - 10 partícula (106, 208) de interés se detecte en el punto (204) de interrogación;
 - una cámara (102, 206) de flujo continuo configurada para recibir la partícula (106, 208) desde el tubo (202) colector móvil, en donde la cámara (102, 206) de flujo continuo consiste en un único puerto de entrada de fluido, un solo puerto de salida de fluido, y un componente (104, 210) de
 - 15 inmovilización de partículas colocado entre los mismos;
 - en donde el componente (104, 210) de inmovilización de partículas está configurado para inmovilizar de forma reversible la partícula (106, 208) dentro de la cámara (102, 206) de flujo continuo.
2. El sistema (200) cerrado de clasificación fluidica según la reivindicación 1, en donde el componente (104, 210) de inmovilización de partículas comprende un generador de campo magnético, que comprende preferiblemente un imán permanente y/o un electroimán (210).
- 20 3. El sistema (200) cerrado de clasificación fluidica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende, además, un componente (108, 212) de análisis configurado para analizar la partícula inmovilizada (106, 208) dentro de la cámara (102, 206) de flujo continuo, preferiblemente en donde el componente de análisis comprende un microscopio (212), más preferiblemente en donde el microscopio (212) se selecciona del grupo que consiste en: un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal, y un microscopio de barrido láser.
- 25 4. El sistema (200) cerrado de clasificación fluidica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cámara (102, 206) de flujo continuo está configurada para recibir una partícula (106, 208) que es una célula.
5. El sistema (200) cerrado de clasificación fluidica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cámara de flujo continuo comprende una cubeta (206) óptica de flujo continuo.
- 35 6. El sistema (200) cerrado de clasificación fluidica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sistema (200) cerrado de clasificación fluidico comprende partículas (208) marcadas magnéticamente.
- 40 7. El sistema (200) cerrado de clasificación fluidico según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el sistema (200) cerrado de clasificación fluidico comprende, además, un clasificador de partículas configurado para recibir la partícula de la cámara de flujo continuo, preferiblemente en donde el clasificador de partículas comprende un tubo colector configurado para recibir la partícula de la cámara de flujo continuo cuando el tubo colector está activado.
- 45 8. Un método que comprende:
 - (a) detectar una partícula de interés en una corriente de flujo de partículas en un punto (204) de interrogación;
 - (b) redirigir la partícula de interés detectada a un tubo (202) colector móvil separado del fluido de la
 - 50 corriente de flujo de partículas;
 - (c) captar la partícula (106, 208) de interés que fluye desde el punto (204) de interrogación en dicho tubo (202) colector móvil, en donde el tubo (202) colector móvil está configurado para activarse para moverse a una posición para recibir la partícula (106, 208) de interés detectada cuando la partícula (106, 208) de interés se detecta en el punto (204) de interrogación;
 - 55 (d) llevar la partícula (106, 208) de interés a una cámara (102, 206) de flujo continuo acoplada fluidicamente al tubo colector (202), en donde la cámara (102, 206) de flujo continuo consiste en un único puerto de entrada de fluido, un único puerto de salida de fluido, y un componente (104, 210) de inmovilización de partículas colocado entre los mismos, en donde el componente (104, 210) de inmovilización de partículas está configurado para inmovilizar de forma reversible la partícula (106, 208) de interés dentro de la cámara de flujo continuo (102, 206); y
 - 60 (e) inmovilizar de forma reversible la partícula (106, 208) de interés dentro de la cámara (102, 206) de flujo continuo.
9. El método según la reivindicación 8, en donde la inmovilización reversible de la partícula (106, 208) de interés comprende generar un campo magnético dentro de la cámara (102, 206) de flujo continuo.
- 65

10. El método según las reivindicaciones 9 o 10, que comprende, además, analizar la partícula (106, 208) de interés inmovilizada dentro de la cámara (102, 206) de flujo continuo, preferiblemente en donde analizar la partícula (106, 208) de interés inmovilizada comprende observar la partícula (106, 208) de interés utilizando un microscopio (212), más preferiblemente en donde la partícula (106, 208) de interés se observa utilizando un microscopio (212) seleccionado entre: un microscopio convencional, un microscopio de fluorescencia, un microscopio confocal y un microscopio de barrido láser.
- 5
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10 anteriores, que comprende, además, invertir la inmovilización para liberar la partícula (106, 208) de interés, y recoger la partícula liberada. partícula (106, 208) de interés.
- 10
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 anteriores, en donde la partícula (106, 208) de interés es una célula.

Figura 1

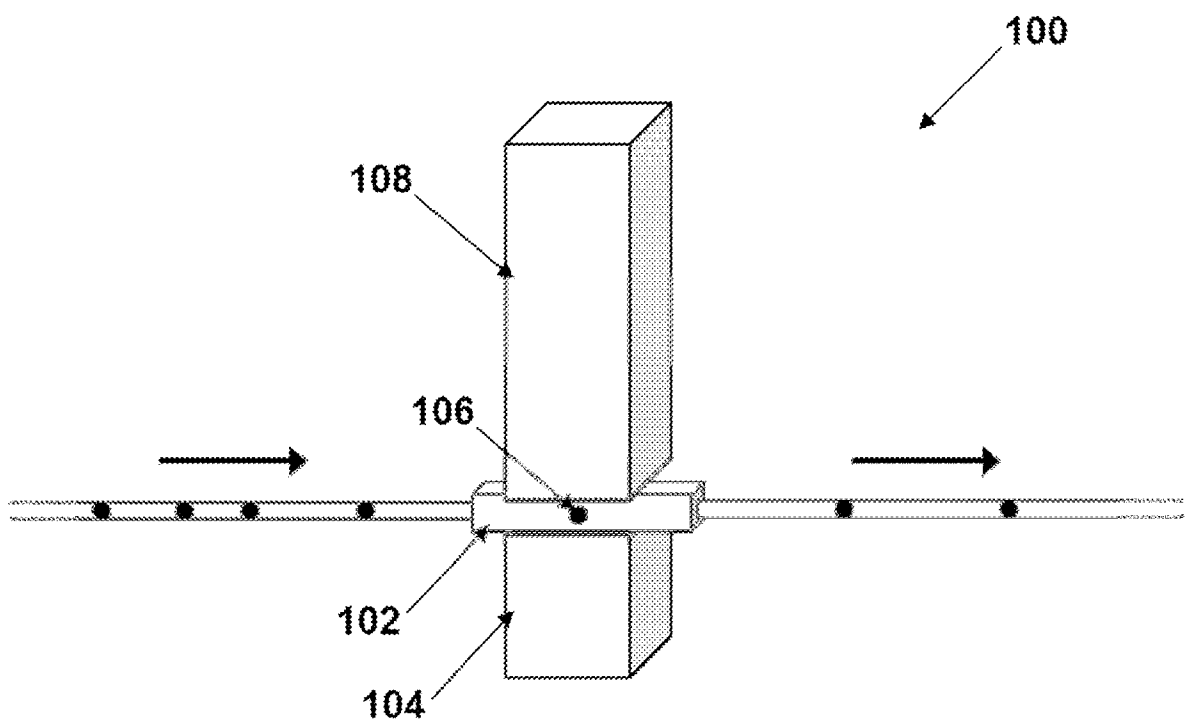


Figura 2

