(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 837 407**

(51) Int. CI.:

G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 27/72 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)
G01N 27/74 (2006.01)
G01N 33/543 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 17151834 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020 EP 3193170**

(54) Título: **Sistema microfluídico usando microaberturas para detección con alto rendimiento de entidades**

(30) Prioridad:

05.04.2011 US 201161471762 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.06.2021

(73) Titular/es:

PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)
Office of Technology Commercialization 1281
Win Hentschel Boulevard
West Lafayette, IN 47906, US

(72) Inventor/es:

SAVRAN, CAGRI A.;
LOW, PHILIP S. y
CHANG, CHUN-LI

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

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 microfluídico usando microaberturas para detección con alto rendimiento de entidades

Campo técnico

La presente invención se refiere, en general, a microfluidos y, en particular, a la detección de células diana presentes en los fluidos de las muestras.

Antecedentes

Las células tumorales circulantes (o las CTC) son células raras presentes en la sangre de pacientes con cáncer metastásico. La detección cuantitativa de las CTC es importante para la detección temprana del cáncer, así como para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta a la terapia. El recuento de CTC se correlaciona con la masa tumoral total y puede servir a menudo como indicadores más fiables de enfermedad metastásica que los marcadores moleculares de enfermedades. Por ejemplo, el nivel de antígeno prostático específico (APE) a menudo puede elevarse debido a hiperplasia prostática benigna (común en personas con más de 60 años) y por tanto no necesariamente puede indicar cáncer.

La presencia de un número significativo de CTC puede ser un indicador fiable de la presencia de cáncer. También, la posible recidiva después de la cirugía puede detectarse mucho más temprano mediante las CTC que mediante la mayoría de marcadores moleculares. Otra ventaja es que las CTC pueden evaluarse además después de la detección; la secuenciación del genoma y el transcriptoma puede revelar las mutaciones que han llevado al cáncer, así como los niveles de expresión de los genes en cuestión. Las células también pueden cultivarse y ensayarse con diferentes combinaciones de agentes quimioterapéuticos para el descubrimiento de fármacos y la medicina personalizada.

Detectar las CTC es, sin embargo, una tarea difícil debido a su escasez en las muestras de sangre, tan pocas como una sola célula en muestras de sangre de varios mililitros (ml). El enfoque preferido actual para detectar células enteras en entornos clínicos y de laboratorio es la citometría de flujo, en donde se detectan células etiquetadas a medida que fluyen en fila de a una por un detector óptico. Esta tecnología se usa extensamente desde el análisis de vacunas al control del sida. Sin embargo, el alto coste y el gran tamaño de los citómetros de flujo limita normalmente esta propuesta de ensayo a instalaciones centrales compartidas por muchos usuarios. Además, puesto que las células tienen que pasar por una porción de detección de los citómetros de flujo de una manera en fila de a una, el rendimiento de la muestra volumétrica es relativamente bajo y los citómetros requieren un barrido durante tiempos prolongados para analizar muestras grandes. Para las células denominadas «raras», es decir, células que son escasas en una muestra de fluido, como las células CTC, pueden requerirse muestras de volumen relativamente grande para encontrar las células. En este caso, los citómetros de flujo actuales pueden ser prohibitivamente caros para el uso frecuente de diagnóstico.

Se han desarrollado detectores de células microfluídicas para superar las limitaciones de coste y tamaño de los citómetros de flujo tradicionales en ciertas aplicaciones. Estos sistemas sofisticados pueden evaluar con éxito muestras pequeñas, del orden de µl (microlitros), pero se ha encontrado que dichos sistemas presentan una capacidad limitada para analizar muestras grandes, del orden de varios mililitros. Los sistemas más microfluídicos permiten analizar bien volúmenes de muestra pequeños, de tamaño de microlitros o de nanolitros. Sin embargo, debido a sus dimensiones de micrómetros, los detectores microfluídicos «*lab on a chip*» requieren muchas horas para procesar volúmenes de muestra grandes, del tamaño de mililitros. Los caudales lentos en los ensayos microfluídicos son normalmente una consecuencia de las dimensiones de microescala de los canales de detección. Estas dimensiones son necesarias para aumentar la probabilidad de unión de una célula rara (es decir, una CTC) en las paredes de los microcanales y en algunos casos para aumentar la relación señal a ruido del mecanismo de detección subyacente. Así, los detectores de células microfluídicas anteriores pueden ser en general ineficaces y pueden requerir tiempos de análisis prohibitivamente largos para analizar muestras de gran volumen necesariamente para la detección de dianas raras como las CTC.

En un sistema de detección microfluídico desarrollado por los grupos Toner and Haber del Massachusetts General Hospital, se llena un *lab on a chip* con aportes funcionalizados con anticuerpos de 100 µm de diámetro con 50 µm de separación para crear rutas de flujo de fluido. En otro diseño de chip, los aportes fueron reemplazados con una estructura en espiga para ayudar activamente a mezclar las células y aumentar la probabilidad de unirse a las paredes funcionalizadas. En estos estudios, los caudales usados con muestras clínicas fueron del orden de 1 ml por hora, tasa a la que el tratamiento de una muestra de sangre típica de 7,5 ml podía llevar muchas horas. Para reducir los tiempos de transporte fluídico a una cantidad gestionable de minutos en vez de horas, el caudal por estos sistemas anteriores tendría que aumentarse en uno o dos órdenes de magnitud. In general, las modificaciones necesarias para los sistemas microfluídicos anteriores pueden ser problemáticas debido a: 1) la resistencia del fluido de los canales de flujo del tamaño de micrómetros y las conexiones asociadas de macro a micro serían muy altas; 2) un caudal alto a través de un área transversal pequeña daría como resultado una «velocidad lineal» alta que crearía tensiones por cizallamiento por encima de los niveles que podrían sostenerse por la unión del anticuerpo / de la célula en la pared del dispositivo y conducir a una desunión de las células y 3) una velocidad lineal demasiado alta perjudicaría a la eficacia de la captura de las células diana en el primer lugar. Aumentar el tamaño de los canales permitiría mayores

caudales, pero esto reduciría significativamente la probabilidad de la interacción de las células diana con las paredes funcionalizadas.

En el caso de otros dispositivos microfluídicos en que se usan técnicas de detección electrónica, dimensiones mayores reducirían la sensibilidad de la detección del dispositivo puesto que la mayoría de los microdispositivos requieren alguna forma de enfoque de dianas en un área pequeña del sensor para la detección. Otros investigadores han usado en paralelo detectores microfluídicos (muchos microcanales conjuntamente) para superar el problema del rendimiento. Sin embargo, los caudales que se usan pueden ser del orden de 10 microlitros (µl) por minuto, que puede conducir a horas de tiempo para tratar las muestras de gran volumen necesarias para la detección de las CTC.

El sistema de detección de células raras relativamente simple y robusto de rendimiento alto aún sería muy beneficioso en muchos entornos clínicos y de investigación. Por lo tanto, se requiere un aparato sensor que pueda detectar células raras, como las CTC, en sangre con alto rendimiento, por el que se traten fluidos de muestras a tasas de mililitro por minuto (en vez de microlitros por minuto) para capturar las células contenidas. Dicho sistema también sería muy útil en la detección de otros diversos tipos de células, bacterias y esporas presentes en los fluidos de las muestras o en el ambiente.

Sumario

Según un aspecto de las explicaciones actuales se describe que un sistema fluídico, incluido un componente del detector con microaberturas, está configurado para detectar células diana unidas por elementos de reconocimiento, como perlas magnéticas, en un análisis con alto rendimiento para caudales de mililitros por minuto. En particular, se proporciona un sistema de detección microfluídico para la detección de células diana en un fluido que contenga una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de células diana unidas a una o más perlas magnéticas, en que cada célula diana unida a una perla magnética presenta la dimensión efectiva más pequeña mayor que la dimensión efectiva más pequeña de cada perla magnética. En un aspecto, el sistema comprende un componente del detector, incluido un cuerpo que define un depósito y un chip sensor en forma de placa con aberturas dispuesta en el depósito y separando el depósito en una primera cámara y una segunda cámara. La placa incluye una pluralidad de microorificios, teniendo cada orificio la dimensión efectiva más pequeña mayor que la dimensión efectiva más pequeña de cada perla magnética y menor que la dimensión efectiva más pequeña de cada célula diana unida a una perla magnética. En un aspecto, la primera cámara del depósito tiene una primera entrada y una primera salida, en que la primera entrada se puede conectar de manera fluida a una fuente del fluido que contiene las células diana, mientras que la primera salida se puede conectar de manera fluida a un recipiente de recogida.

El componente del detector incluye además un imán dispuesto en relación con el depósito de manera que la segunda cámara del depósito y la placa con aberturas estén situados entre el imán y la primera cámara del depósito. El imán configurado para generar una fuerza magnética suficiente para atraer perlas magnéticas en la primera cámara del depósito a la segunda cámara del depósito. El sistema microfluídico de detección comprende además una bomba para que fluya de manera continua el fluido desde la fuente del fluido que contiene las células diana a través de la primera cámara del depósito.

Se proporciona un método para detectar células diana en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de células diana unidas a una o más perlas magnéticas, en que cada célula diana unida a una perla magnética tiene la dimensión efectiva más pequeña mayor que la dimensión efectiva más grande de cada perla magnética. En un aspecto, el método comprende: hacer fluir de manera continua el fluido a través de la primera cámara de un depósito separado de una segunda cámara del depósito mediante una placa con aberturas, teniendo cada orificio en la placa la dimensión efectiva más pequeña mayor que la dimensión efectiva más pequeña de cada perla magnética y menor que la dimensión efectiva más pequeña de cada célula diana unida a una perla magnética y aplicar una fuerza magnética bajo la placa con aberturas suficiente para extraer las perlas magnéticas no unidas a una célula diana a través de las aberturas en la segunda cámara y suficiente para mantener las células diana unidas a una o más perlas magnéticas contra la superficie de la placa con aberturas en la primera cámara del depósito.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una vista esquemática de un sistema microfluídico de detección según la presente descripción.

La figura 1B es una vista esquemática de una porción del sistema mostrado en la figura 1B modificada según una realización alternativa.

La figura 2 es una vista transversal lateral de un componente del detector según la presente descripción para uso en el sistema de detección mostrado en la figura 1.

La figura 3 es una vista en planta de una placa microperforada de chip sensor para uso en el sistema mostrado en la figura 1A.

La figura 4 es una representación lateral de la operación del chip sensor mostrado en la figura 44 para capturar células diana y extraer elementos de reconocimiento magnético no unidos.

Las figuras 5A-D son vistas esquemáticas del sistema microfluídico de detección de la figura 1A, en las que se muestran rutas de flujo de fluido en diferentes etapas de operación del sistema.

La figura 6 es una imagen obtenida por microscopía de campo claro de células diana capturadas en un chip sensor según una realización descrita.

Descripción detallada

Para favorecer un mejor entendimiento de los principios de la invención, se hará ahora referencia a las realizaciones ilustradas en los dibujos y descritas en la siguiente memoria descriptiva. Se entiende que no se pretende de ningún modo limitar el alcance de la invención. Se entiende además que la presente invención incluye todas las alteraciones y modificaciones a las realizaciones ilustradas e incluye aplicaciones adicionales de los principios de la invención como normalmente entendería un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

En la presente descripción se proporciona un sistema microfluídico con un componente del detector que tiene una placa con aberturas o un chip configurados para proporcionar un análisis con alto rendimiento de mililitros (ml) por minuto de una muestra de fluido que fluye a través de canales de flujo relativamente grandes (milímetro (mm) en vez de micrómetros (µm)). La muestra de fluido puede ser un fluido corporal, incluidos entre otros sangre, sangre tratada, suero, plasma, saliva u orina, o fluidos medioambientales, incluidas entre otras muestras de fluidos de ríos, alcantarillados, instalaciones y plantas de tratamiento de aguas. Usando perlas funcionalizadas capaces de unirse a células diana en tres dimensiones, el sistema elimina la necesidad de unión basada en la afinidad química de las células a una superficie del chip bidimensional y estacionaria. En el sistema se usa tanto un flujo de fluido convectivo para ayudar al transporte de masa de células diana unidas por perlas magnéticas funcionalizadas y tamizado magnético de las células unidas en una placa o un chip con microaberturas que captura las células, pero permite que las perlas magnéticas libres (es decir, aquellas no unidas a células diana) pasen a través de las aberturas. En ciertas realizaciones, las perlas magnéticas sirven simultáneamente para: 1) unir en base a la afinidad células diana específicas; 2) transportar magnéticamente las células unidas a la superficie de la placa o del chip y 3) generar reconocimiento o etiquetar señales para la detección. El nuevo sistema fluídico de la presente descripción puede analizar grandes cantidades de fluidos de muestras, incluyendo cantidades clínicamente significativas de fluidos corporales como sangre, en una cantidad de tiempo relativamente pequeña.

En la figura 1A se representa un esquema de un sistema 10 microfluídico según una realización de la presente descripción. El sistema 10 incluye un componente 12 del detector que tiene un primer segmento 13 de flujo y un segundo segmento 14 de flujo paralelo. El primer segmento 13 de flujo está provisto de una entrada 13a y una salida 13b, en que la entrada está conectada por un conducto 35 de entrada a una fuente S de fluido de la muestra. La salida 13b está conectada por el conducto 36 de salida a un recipiente CC de recogida, que es adecuado para recoger y almacenar células diana aisladas por el sistema 10 microfluídico de detección. La segunda entrada 14a está conectada por un conducto 38 de entrada a una fuente de solución B tamponada o fisiológicamente inerte o no reactiva. La segunda salida 14b está conectada por un conducto 39 de salida a un recipiente BC de recogida para recoger solución tamponada que sale del componente 12 del detector.

En una realización, se proporciona una bomba 40 para hacer fluir un fluido de la fuente S de muestra a través del primer segmento 13 de flujo del componente 12 del detector. En la realización mostrada en la figura 1, la bomba 40 está integrada en el conducto 36 de salida para extraer fluido a través del componente del detector. Sin embargo, se considera que la pompa 40 puede estar situada en el conducto 35 de entrada cuando se desee. La realización de la figura 1A incluye además una segunda bomba 41 que está integrada en el conducto 14b de salida para hacer fluir el fluido tampón de la fuente B a través del segundo segmento 14 de flujo del componente 12 del detector. La bomba 41 puede proporcionarse en el conducto 38 de entrada para extraer fluido tampón de la fuente B y bombearlo a través del segundo segmento 14 de flujo. Alternativamente, la misma bomba, como la bomba 40, para usarse para bombear tanto el fluido de la muestra de la fuente S a través del primer segmento 13 de flujo y el fluido de la fuente B a través del segundo segmento 14 de flujo, como se representa en el segmento ampliado mostrado en la figura 1B. En esta realización, los dos conductos, 36, 39, de salida están conectados a la bomba 40 a través de la válvula V6 bidireccional que se puede controlar para conectar de manera seleccionable una salida o las otras salidas para el flujo a través de la bomba, según un protocolo de flujo de fluido analizado en la presente memoria.

Volviendo a la figura 1A, el sistema 10 microfluídico incorpora líneas de desvío que se activan de manera selectiva según un protocolo de flujo de fluido descrito a continuación. Se proporciona una línea 42 de desvío entre la fuente B de tampón y el conducto 35 de entrada al primer segmento 13 de flujo del componente del detector. Una válvula VI puede operar para controlar el flujo de solución tampón de la fuente B a los dos conductos 35, 38, de entrada, mientras que una válvula V2 puede operar para controlar el flujo de solución tampón en el primer conducto 35 de entrada.

En una segunda ruta de desvío, se conecta una línea 43 de desvío entre el primer conducto 36 de salida y el primer conducto 35 de entrada. Esta línea de desvío devuelve así el fluido que sale del primer segmento 13 de flujo del componente del detector de vuelta a la entrada 13a para el primer segmento de flujo. Una válvula V3 controla el flujo de fluido a través de la segunda línea 43 de desvío. Una tercera ruta de desvío incluye la línea 44 de desvío a partir del segundo conducto 39 de salida a la fuente S que contiene el fluido de la muestra. Se configura una válvula V4 para dirigir el flujo del fluido tampón que sale del segundo elemento 14 de flujo al recipiente BC de recogida de tampón o a

la tercera línea 44 de desvío. El sistema 10 se proporciona con un módulo 45 de control que puede operar controlando la bomba o las bombas 40 (y 41 si hay) así como las válvulas para controlar el flujo de los fluidos a través de cada segmento, 13, 14, de flujo del componente 12 del detector, según un protocolo de flujo descrito en la presente memoria.

El sistema 10 microfluídico puede configurase para aceptar fluidos de muestras a partir de varias fuentes Si. Las diversas fuentes Si pueden estar conectadas en serie o en paralelo, con válvulas apropiadas para conectar la fuente particular al conducto 35 de entrada al primer segmento 13 de flujo del componente del detector. El sistema puede modificarse además para que incluya componentes 12i del detector adicionales conectados al conducto 36 de salida desde el primer segmento 13 de flujo, mediante una válvula V5 de control.

El flujo de fluido de la muestra y la solución tampón a través del sistema 10 y, en particular, a través del componente 12 del detector, se ha descrito hasta aquí. Los detalles del componente 12 del detector y su función se ilustran en las figuras 2-4. Volviendo primero a la vista transversal en la figura 2, el componente 12 del detector incluye un cuerpo 15 que puede estar en forma de dos mitades 15a, 15b, que se combinan para formar el componente completo. El cuerpo 15 define un depósito 16 que está separado en una primera cámara 16a y una segunda cámara 16b por un chip sensor en forma de placa 18 con microaberturas. La primera cámara 16a está en comunicación con la primera entrada 13a de flujo y la primera salida 13b de flujo y se forma así el primer segmento 13 de flujo del componente del detector. Un primer canal 22 de entrada comunica la primera cámara 16a y la entrada 13a, mientras que un primer canal 23 de salida comunica con la salida 13b. En la realización ilustrada, los dos canales forman ángulo hacia el depósito 16 o están definidos en un ángulo no planar con respecto al depósito, de manera que las células diana y el fluido de la muestra no se acumulen en el canal 22 o el conducto 35 de entrada.

La segunda cámara 16b está en comunicación con las respectivas segunda entrada y salida, 14a, 14b, para formar el segundo segmento 14 de flujo del componente del detector. Un canal 25 de entrada comunica la segunda cámara y la segunda entrada 14a, canal 26 de salida que comunica con la segunda salida 14b. Los dos canales 25, 26, pueden estar formando ángulo, pero se requiere que no lo estén, puesto que la segunda cámara 16b está conectada a la fuente B de solución tampón y que no fluyan células diana por esta segunda ruta 14 de flujo de fluido.

El depósito 16 puede estar abierto en un lado del componente 12 del detector, abriéndose el depósito sellado y cerrado mediante una ventana o un panel 20 de visualización. El panel 20 de visualización está orientado para proporcionar una vista sin obstrucción de la placa 18 con aberturas en el depósito 16. En una realización, el panel 20 de visualización es ópticamente transparente, permitiendo la visualización directa de la superficie de la placa con aberturas.

El chip sensor o la placa 18 con aberturas pueden estar soportados por un montaje 28 de placas, formado alrededor del perímetro de la placa, que está retenido entre las dos mitades 15a, 15b, del cuerpo cuando se acoplan entre sí. Puede proporcionarse un cierre 29 en uno o en los dos lados del montaje 28 de las placas para asegurar un cierre estanco a fluidos entre las dos cámaras 16a, 16b. Los detalles de la placa con aberturas se muestran en las figuras 3-4. En particular, la placa 18 incluye una superficie 51 superior y una pluralidad de aperturas del tamaño del micrómetro u orificios 50 definidos a su través. En una realización, los orificios son generalmente de tamaño uniforme y tienen la dimensión d efectiva más grande menor que la dimensión efectiva más pequeña de una célula T diana (figura 4) que se tiene que detectar. Además, la dimensión d efectiva más pequeña de los orificios de la placa es mayor que la dimensión efectiva más grande de los elementos M de reconocimiento magnético. Para los fines de la presente descripción, el término «dimensión efectiva» se refiere a una dimensión de un elemento particular medida a lo largo de un eje particular. Para un orificio circular en la placa o una perla magnética esférica, las dimensiones efectivas más pequeña y más grande son las mismas y son simplemente el diámetro del orificio o la perla. Para un orifico alargado, la dimensión efectiva más grande es la longitud del orificio a lo largo de su eje largo, mientras que la dimensión efectiva más pequeña es la anchura a lo largo del eje corto. Las células diana pueden no presentar una forma tridimensional uniforme (como una esfera) así que la célula tendrá una dimensión diferente dependiendo del eje de la medición. Para las células de este tipo, el término «dimensión efectiva más pequeña» se refiere a la más pequeña de esas mediciones. Así, las dimensiones efectivas relativas de los orificios de las placas son de manera que una perla magnética pueda pasar siempre a través de cualquier orificio sin importar como esté orientada la perla, mientras que una célula diana nunca puede pasar por un orificio sin tener en cuenta cómo esté orientada.

El sistema 10 microfluídico se configura para detectar y aislar las células T diana que están unidas a elementos M de reconocimiento. Así, la fuente S de fluido soporta un fluido de muestra que contiene células diana, por ejemplo, una muestra de sangre de un paciente que contiene células tumorales circulantes (las CTC) o una muestra que tiene estirpes celulares tumorales ejemplares como carcinoma de ganglios linfáticos de células prostáticas (LNCaP, por sus siglas en inglés) o células de cáncer de ovario (IGROV, por sus siglas en inglés). La muestra de fluido contiene además elementos de reconocimiento en forma de perlas M magnéticas que se unen a las células diana. Seguirán detalles de las células diana y los elementos de reconocimiento, pero con respecto a los orificios 50 en la placa 18 puede apreciarse que el tamaño de los orificios se calibra de modo que las perlas M magnéticas libres (es decir, las perlas que no están unidas a una célula T diana) pasarán libremente por el orificio, como las perlas M_X en el lado derecho de la placa en la figura 4. Por otra parte, los orificios 50 se dimensionan de manera que las células T diana no puedan pasar a su través, con o sin perlas magnéticas unidas a ellas, como las perlas M_B.

La importancia de las perlas M magnéticas puede apreciarse volviendo a referirse a la figura 2. En particular, el cuerpo 15 del componente 12 del detector incluye un imán 32 montado en una cavidad 31 bajo la segunda cámara 16b. En

particular, el imán 32 está colocado de manera que la fuerza magnética atraiga a las perlas M magnéticas en la primera cámara 16a hacia la placa 18 con aberturas. Es esta fuerza magnética la que arrastra a las perlas M_X magnéticas libres a través de los orificios 50, como se ilustra en la figura 4, incluso aunque las perlas estén bajo la influencia de un flujo F de fluido que sea sustancialmente paralelo a la superficie 51 de la placa 18. Esta misma fuerza magnética también atrae a las perlas M_B que están unidas a una célula T diana, que también están bajo la influencia de un flujo F de fluido paralelo. Sin embargo, puesto que la célula T diana es demasiado grande para pasar a través de cualquier orificio la fuerza magnética sirve para soportar la célula diana unida contra la superficie 51 de la placa 18 con aberturas. En ciertos casos, la célula T diana es lo suficientemente grande respecto a las perlas M magnéticas para tener varias perlas M_B unidas a la célula. Como se representa en la figura 4, algunas de las perlas M_B unidas se extienden parcialmente en un orificio 50. Las perlas M_B se mantienen en el orificio por la fuerza magnética, que no solo soporta la célula T diana unida a la superficie 51 de la placa, sino que también impide que la célula se traslade, o «bloquea» el traslado de la célula, por la superficie o que se lave bajo la influencia del flujo F de fluido. Así, las perlas M_B unidas no solo capturan células diana, sino que también ayudan a evitar que las células diana capturadas se agrupen o se recojan en el extremo de salida de la primera cámara 16a.

El imán 32 se calibra con respecto a las perlas M magnéticas para ejercer una fuerza magnética suficiente para arrastrar a las perlas hacia la placa con aberturas, pero no tan fuertemente como para romper las perlas M_B unidas lejos de una célula T diana capturada en la superficie 51 de la placa. La fuerza magnética es también lo suficientemente fuerte como para arrastrar a las perlas y las células diana fuera del flujo F de fluido que tiende a impulsar a las perlas y las células en una ruta de flujo paralela a la superficie 51 de la placa 18 del chip sensor. En un ejemplo específico, el imán es imán cúbico de NdFeB (aproximadamente 5 mm x 5 mm x 5 mm) con una densidad de flujo y un gradiente medidos de 0,4 T y 100 T/m, respectivamente. Se prevén otros imanes incluidos entre otros imanes permanentes más grandes o más pequeños hechos de varios materiales y electroimanes que están comercialmente disponibles o son fabricados usando procedimientos habituales o de microfabricación y que pueden generar campos magnéticos variables en el tiempo. En la realización ilustrada en la figura 2, el imán 32 está alojado en una cavidad 31 formada en la mitad 15b del fondo del alojamiento. Sin embargo, el imán puede fijarse o soportarse con respecto al exterior del componente 12 del detector siempre que esté orientado de manera que se extraigan las perlas M magnéticas de la primera cámara 16a a la segunda cámara 16b. Se considera además que el imán 32 puede asociarse con el cuerpo 15 del detector de manera que la distancia del imán desde la placa 18 con aberturas pueda variarse para variar de ese modo la fuerza magnética aplicada a las perlas magnéticas en la primera cámara 16a. La fuerza magnética puede calibrarse así a una perla magnética particular. Además, el imán 32 puede moverse para eliminar la fuerza magnética completamente según un protocolo de flujo para el sistema 10 microfluídico. La eliminación del campo magnético puede facilitar la eliminación de células diana capturadas de la superficie de la placa de manera que las células diana puedan transportarse o descargarse a un recipiente CC de recogida separado.

En otra realización, puede aplicarse un campo magnético desde la parte superior del componente 12 del detector o directamente por encima de la superficie 51 de la placa 18 del chip sensor. Este campo magnético puede así «elevar» las células diana capturadas de la superficie 51 para facilitar además su eliminación. Se considera en esta realización que el campo magnético del imán 32 se interrumpe como se describió anteriormente de manera que el campo magnético aplicado desde la parte superior del componente no «compite» con el campo magnético de captura original.

Como se explicó anteriormente, la(s) bomba(s) 40 (41) y las válvulas V1-V5 se controlan según un protocolo de flujo adaptado para: a) preparar el componente 12 del detector para recibir un fluido que contenga células diana unidas; b) capturar las células diana unidas; c) descargar las perlas magnéticas no unidas y d) extraer las células diana capturadas. En una primera etapa del protocolo, el sistema se ceba con una solución no reactiva o tamponada de la fuente B. La solución de la fuente B es preferiblemente no reactiva a las células T diana, a los elementos de reconocimiento o a las perlas B magnéticas, y a cualquier ligando, anticuerpo, aptámero, péptido, ligando de bajo peso molecular o antígeno usados para funcionalizar y unir los elementos de reconocimiento. En una realización específica, la solución puede ser una solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Haciendo referencia a las figuras 1A y 5A, el depósito 16 se inunda inicialmente con PBS por la válvula VI de abertura, moviendo la válvula V4 para cerrar la línea 44 de desvío, pero abrir la ruta de flujo al envase BC de recogida, y moviendo la válvula V2 para cerrar el conducto 35 de entrada a la fuente S de la muestra y abrir el conducto a la línea 42 de desvío. Las válvulas V3 y V5 se cierran de manera que todo el fluido que sale del componente 12 del detector se alimente al envase BC de recogida de tampón. La solución tamponada PBS fluye libremente por las dos cámaras, 16a, 16b, y por la placa 18 con aberturas de manera que todo el fluido fluya por el segundo canal 26 de salida y la segunda salida 14b al conducto 39 de salida y al envase BC de recogida. En algunas realizaciones, puede ser deseable abrir la válvula V5 para bombear PBS de la cámara 16a al recipiente CC de recogida para evitar cualquier aumento de presión dentro de la cámara. Se activa la bomba 41 así para controlar el flujo de PBS a través de los dos segmentos, 13, 14, de flujo. En la configuración alternativa de la figura IB, la bomba 40 proporciona la fuerza motora para el flujo de fluido con la válvula V6 abierta a las dos salidas, 13b, 14b, pero con descarga de la bomba a solo el segundo conducto 39 de salida. Puede apreciarse que este flujo inicial de PBS a través del sistema purgará el aire del depósito y de los canales.

Con el componente del detector cebado, el circuito de fluido de solución tamponada se desactiva cerrando las válvulas VI y V4, cerrando la línea 42 de desvío en la válvula V2, y desactivando la bomba 41. La primera cámara 16a ahora está lista para recibir el fluido de la muestra de la fuente S por abertura de la válvula V2 al conducto 35 de entrada y la válvula V5 al recipiente CC de recogida, como se ilustra en la figura 5B. Se activa la bomba 40 para extraer el fluido de la muestra de la fuente S a través del componente 12 del detector y más en particular para arrastrar al fluido de la

muestra a través de la primera entrada 13a a la primera cámara 16a. El imán 32 se activa para arrastrar a las perlas M magnéticas a la placa 18 con aberturas, como se representa en la figura 4. Puede apreciarse que la tasa de flujo F del fluido de la muestra se calibra de manera que la presión del fluido no supere la fuerza magnética. A modo de ejemplo no limitante, la bomba 40 puede estar configurada para producir un caudal de varios mililitros por minuto, que es significativamente más rápido que las tasas de mililitros por hora de sistemas microfluídicos anteriores. En una realización específica, los canales, 22, 23, de entrada y de salida pueden tener la dimensión efectiva más pequeña de 0,5 mm de manera que un caudal de 1 ml/min pueda generar una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 3 mm/s en los canales y aproximadamente 0,7 mm/s a través del depósito 16. Estas velocidades lineales son casi 100 veces menores que las velocidades que se cree que dañan a las células T diana. Sin embargo, a este caudal puede pasar una muestra de fluido típica de 7,5 ml a través del componente 12 del detector en 7,5 minutos o menos. De manera similar, un caudal de 3 ml/min indicaría un paso de una muestra de 7,5 ml en aproximadamente 2,5 minutos.

Las células diana y las perlas magnéticas están bajo la influencia de flujo de fluido para intentar separarlas por lavado de la superficie del chip sensor, así como una fuerza magnética para intentar extraerlas a la superficie del chip. La fuerza magnética producida por el imán 32 puede calibrarse así para contrarrestar la influencia del flujo F de fluido. En otras palabras, puede llevarse a cabo un caudal mayor aumentando la fuerza magnética, puesto que se requiere una fuerza mayor para expulsar las células y las perlas del flujo de fluido. Un factor limitante a la intensidad del campo magnético generado por el imán 32 es que la fuerza magnética no puede ser suficientemente grande para disociar las perlas B magnéticas de las células T diana unidas o suficientemente grande para dañar a la célula diana a medida que las perlas son arrastradas por la fuerza magnética.

A medida que la muestra de fluido fluye por la primera cámara 16a, el imán atrae los elementos M de reconocimiento a la placa 18 y el segundo depósito 16b inferior. Como se explicó anteriormente, la mayoría de las perlas M_B no unidas pasará por las aberturas 51 y al depósito 16b inferior donde se mantienen en su lugar por la fuerza magnética. Asimismo, las células T diana unidas serán capturadas frente a la superficie 51 de la placa 18 con aberturas siempre que haya fuerza magnética. El fluido de muestra restante, menos las células diana capturadas, puede suministrarse al recipiente CC de recogida. Alternativamente, la válvula V5 puede cerrarse y la válvula V3 abrirse para permitir la descarga del fluido de la muestra de la salida 13b para volver a la entrada 13a por la línea 43 de desvío, como se refleja en el diagrama de la figura 5C. El uso del desvío puede justificar las células diana unidas o las perlas magnéticas no unidas que escapan a la captura en el depósito 16. El fluido de muestra puede reciclarse de manera continua durante un periodo de tiempo estimado suficiente para capturar todas las células diana unidas.

Puede apreciarse que al final de esta segunda etapa del protocolo del flujo todo o al menos una mayoría de las células T diana unidas en el fluido de muestra se ha capturado contra la superficie 51 de la placa 18 con aberturas en la primera cámara 16a superior. Asimismo, todo o al menos la mayoría de las perlas R_B magnéticas no unidas ha sido arrastrada por los orificios y se recogen en la segunda cámara 16b inferior. Las células diana capturadas están así disponibles para la visualización a través del panel 20 de visualización para el recuento del número de células diana, por ejemplo. Se considera que en un procedimiento típico las células diana serán raras o estarán en una concentración extremadamente baja en una muestra (por ejemplo, las CTC en una muestra de sangre). Así, el número de células capturadas puede ser muy bajo, pero fácilmente discernible en la placa con aberturas. En una propuesta, las células capturadas pueden visualizarse mediante microscopía de campo claro. Además, las células capturadas pueden etiquetarse además con moléculas informadoras fluorescentes y visualizarse usando microscopía de fluorescencia. Alternativamente, o, además, las perlas magnéticas pueden funcionalizarse con un indicador visual, como con etiquetado fluorescente. Las perlas magnéticas pueden visualizarse usando microscopía de fluorescencia. Puesto que las células diana están unidas típicamente a una serie de perlas magnéticas la imagen fluorescente de las perlas revelará la presencia de las células diana unidas. Un ejemplo de células diana capturadas se muestra en la imagen obtenida por microscopía de campo claro en la figura 6. En esta imagen, las células capturadas son claramente visibles. Las células son MCF-7 (células de cáncer de mama) que están unidas a perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos anti-EpCAM de una manera conocida. Cabe señalar que, si bien la gran mayoría de varios millones de perlas magnéticas no unidas en la muestra pasaba a través de los orificios de la placa, algunas perlas magnéticas no unidas también estaban presentes en la superficie de la placa. Sin embargo, es evidente que la presencia de estas pocas perlas no interfiere con una visualización clara de las células diana capturadas. En el ejemplo específico mostrado en la figura 6, los orificios tienen un diámetro (o dimensión efectiva más pequeña) de 5 µm y las perlas magnéticas tienen un diámetro de 300 nm.

Para mejorar la visualización de las células recogidas, el depósito puede lavarse para eliminar el fluido de la muestra y otras células que podían interferir visualmente. En este caso, el campo magnético se mantiene al tiempo que la solución tamponada de la muestra B fluye por las porciones superior e inferior del depósito. El ciclo de lavado puede conducirse de la misma manera que el ciclo de preparación inicial descrito anteriormente, es decir, abriendo las dos cámaras 16a, 16b, a la solución de PBS, cerrando la válvula V5 y abriendo la válvula V4 al recipiente BC de recogida de tampón. Puesto que el imán permanece en su posición durante este ciclo de lavado, las células diana permanecerán capturadas en la placa con aberturas en la cámara 16a superior y las perlas magnéticas no unidas permanecerán recogidas en la cámara 16b inferior.

El sistema 10 microfluídico descrito en la presente memoria también puede recoger las células T diana capturadas, así como recuperar las perlas M magnéticas. En una propuesta, la solución (PBS) tamponada fluye solo por la primera cámara 16a superior con el campo magnético eliminado. Así, como se muestra en el diagrama de la figura 5D, la

válvula VI se controla para cerrar el flujo a la entrada 14a, pero abrir un conducto 35 y la válvula VI. La válvula VI se controla para evitar el flujo de la fuente S, pero aceptar el flujo de PBS de la fuente B. Las válvulas V3 y V4 se cierran, pero la válvula V5 se abre al recipiente CC de recogida. En ausencia del campo magnético, las células diana unidas se expulsan fácilmente de la placa con aberturas. El flujo de PBS puede lavar las células diana a través del conducto 23 de salida y en el recipiente CC de recogida. Puesto que la segunda entrada 14a y la salida 14b se cierran no hay flujo de fluido a través de la segunda cámara 16b inferior. Así, las perlas M recogidas permanecen mezcladas en el fondo del depósito 16 incluso a medida que las células diana se lavan. Alternativamente, el campo magnético puede ajustarse para reducir la fuerza magnética experimentada por las células diana unidas a un nivel suficiente que tiene que superarse por presión de fluido de la PBS que fluye por la cámara 16a superior. Puesto que las perlas no unidas mezcladas en la cámara inferior están más próximas al imán, la fuerza magnética es suficiente para mantener las perlas en su sitio. Una vez que las células diana han sido eliminadas y recogidas el campo magnético puede eliminarse y las válvulas VI y V4 abrirse para que fluya PBS por la cámara inferior para lavar las perlas no unidas en el recipiente BC de recogida. Alternativamente, la válvula V4 puede activarse para abrir la línea 44 de desvío para redirigir las perlas no unidas de vuelta a la fuente S de muestra. En este caso, las perlas no unidas pueden incubarse para que se unan con las células diana no unidas previamente en la fuente S original o en fuentes Si adicionales.

Como se describió previamente, el sistema 10 microfluídico puede incluir componentes 12i del detector adicionales que pueden producirse en línea mediante la válvula V5. En ciertos protocolos, puede considerarse que el fluido de la muestra fluirá de manera continua desde el primer componente 12 del detector a cada componente 12i del detector sucesivo antes de que fluya al recipiente CC de recogida.

Se considera que los conductos y las válvulas se forman de materiales químicamente inertes. En un ejemplo específico, los conductos 35, 36, 38, y 39, y las líneas 42-44 de desvío pueden ser tubos como los tubos de tipo Cole-Parmer de 0,16 cm (1/16 pulgadas) u otros tubos químicamente inertes. En ciertos procedimientos, la fuente de células diana puede ser una muestra de sangre de 7,5 ml convencional en que las células diana ya se han unido a elementos de reconocimiento, como las perlas magnéticas. Para un protocolo de flujo típico, la fuente B de tampón puede ser un depósito de 10 ml de PBS o mayor. En ciertos procedimientos, la muestra puede ser una muestra de sangre tratada en que ya se han eliminado los glóbulos rojos mediante lisado o mediante tubos comercialmente disponibles, como tubos de preparación de células BD Vacutainer®. En otros procedimientos, la muestra pueden ser otros fluidos corporales como la orina o pueden ser agua u otras muestras de fluidos recogidas del medioambiente o de fuentes industriales.

En una realización, las mitades 15a, 15b superior y del fondo del cuerpo 15 del componente del detector se hacen a máquina de compuesto acrílico y se fijan mediante tornillos de manera que queden entre la placa 18 con aberturas y el anillo 29 de cierre para formar un cierre estanco a los fluidos entre las cámaras. Sin embargo, también se prevé la fabricación y el material, incluidos, entre otros, plástico moldeado formado en una operación de moldeo de plástico.

En una realización, la placa 18 con aberturas del chip sensor es una oblea de aproximadamente 15 mm por 15 mm de silicio sobre aislante (SOI, por sus siglas en inglés) que tiene un espesor de aproximadamente 0,5 mm. Los orificios 50 pueden estar limitados a un área activa predeterminada del componente del detector de aproximadamente 10 mm por 10 mm. La disposición de los orificios (como disposición de tablero de damas) puede definirse en la oblea usando litografía y después formarse los agujeros por ataque con iones reactivos del lado frontal de la oblea. Los chips sensores individuales pueden definirse por ataque con iones reactivos del lado de atrás de la oblea seguido por ataque con HF del óxido aislante. Alternativamente, pueden definirse ranuras usando litografía y por ataque en el lado frontal de la oblea de silicio por ataque con iones reactivos seguido por recubrimiento con una capa delgada de nitruro. El nitruro en el lado posterior de la oblea puede modelarse usando litografía con ataque para definir chips individuales. Finalmente, la oblea de silicio puede atacarse en el patrón de la disposición de orificios usando ataque con iones reactivos o hidróxido de potasio y la capa de nitruro restante puede retirarse por ataque. Como se analizó anteriormente, los orificios tienen una dimensión efectiva más pequeña que es suficientemente pequeña para atrapar las perlas magnéticas unidas a células diana, sin embargo, suficientemente grande para permitir que las perlas magnéticas libres que no están unidas a las células diana pasen a su través. En un ejemplo específico, las células diana son CTC, así que se requiere que los orificios sean más pequeños que las CTC diana, pero mayores que las perlas. Por ejemplo, el tamaño promedio de un carcinoma de ganglios linfáticos de células prostáticas (LNCaP) o células de cáncer de ovario (IGROV) es aproximadamente 20 µm mientras que el tamaño de un cierto tipo de perla magnética puede ser de aproximadamente 1 µm. Por lo tanto, los orificios de 3 µm serán suficientemente grandes para que pase fácilmente una perla libre, pero demasiado pequeños para dejar pasar a su través a una CTC. En una realización específica, los orificios se pueden proporcionar a una densidad de empaquetamiento de aproximadamente el 30 %, que puede dar como resultado aproximadamente 14 aberturas debajo de una célula de 20 µm. Además, si cada célula está unida por múltiples perlas magnéticas (como se representa en la figura 4), cada perla es arrastrada por la fuerza magnética de manera que la célula diana es arrastrada en varias localizaciones, haciendo incluso más difícil que una célula pase a través de un solo orificio. Los orificios también se configuran para atrapar las perlas magnéticas unidas a células para «bloquear» las células diana que se desplazan horizontalmente, evitándose que sean eliminadas por lavado de la superficie de la placa por el flujo de fluido. En la realización ilustrada en las figuras 3-4, se muestra que los orificios 50 tienen un diámetro de círculo o de cilindro. Sin embargo, los orificios pueden tener otras conformaciones, como una perforación cónica o un orificio alargado en la dirección del flujo F de fluido siempre que la dimensión efectiva más pequeña del orificio satisfaga los requerimientos dimensionales explicados

anteriormente. En una realización alternativa, la placa 18 puede configurarse con microrranuras, teniendo cada una, una anchura igual a la dimensión d efectiva más pequeña analizada anteriormente dimensionada de manera que las células diana no puedan entrar en las microrranuras, pero sí puedan las perlas magnéticas mucho más pequeñas.

La placa 18 con aberturas puede está recubierta o pasivada con un material fisiológicamente inerte, como albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) o polietilenglicol (PEG). Puesto que en el sistema según la presente descripción no se utiliza unión química entre una célula diana funcionalizada y la placa, la superficie de la placa puede ser no reactiva y preferiblemente es no reactiva.

Según la presente descripción, la unión de la célula diana a la perla magnética es el único paso de unión por afinidad deseado, puesto que el componente 12 del detector no se basa en la unión química de las células diana a una porción del componente. Las perlas magnéticas están funcionalizadas de muchas maneras convencionales, incluidas con anticuerpos monoclonales o policlonales apropiados (incluidos, entre otros, los anticuerpos EpCAM), aptámeros o péptidos cortos que puedan unirse a células diana específicas. En una estrategia de funcionalización alternativa, los ligandos de peso molecular bajo (por ejemplo, ácido 2-[3-(I,3-dicarboxipropil)-ureido]pentanodioico o «DUPA» para células de cáncer de próstata y ácido fólico para células de cáncer de ovario u otras células cancerosas que sobreexpresan el receptor de folato en sus superficies incluidos tumores malignos de pulmón, colon, riñón y mama) se usan para promover la unión a ciertas células, lo más en particular, las CTC. Específicamente, los ligandos de peso molecular bajo (por ejemplo, DUPA y folato) pueden producirse con un grupo funcional (amino, n-hidroxisuccinamida (NHS) o biotina dependiendo del grupo funcional en la perla magnética que se tenga que usar) con una cadena de PEG en medio del ligando de peso molecular bajo y el grupo funcional para suprimir la unión no específica a las perlas.

Las perlas funcionalizadas están disponibles de diversos proveedores con grupos químicamente reactivos. Las perlas magnéticas también están disponibles en muy diversos tamaños (de 100 nm a 5 µm, por ejemplo) que pueden seleccionarse basándose en las dimensiones de la célula diana a la que se unan las perlas. En una realización, las perlas recubiertas con NHS de 1 µm pueden ser el punto de partida de Chemagen. Para estas perlas, la cadena de PEG estará terminada con un grupo amino para enlace covalente al grupo NHS en la perla. También pueden ensayarse las perlas de otros proveedores con otros grupos funcionales y pueden estar terminadas con la cadena de PEG y el grupo funcional de acuerdo con eso. Las perlas también pueden estar funcionalizadas con moléculas fluorescentes usando la química apropiada para el grupo funcional. Para el ejemplo de un ligando de peso molecular bajo, pueden sintetizarse DUPA-PEG-amina y folato-PEG-amina que pueden hacerse reaccionar con las perlas antes de etiquetado fluorescente. Después, puede hacerse reaccionar la cantidad deseada de colorante fluorescente reactivo (fluoresceína, por ejemplo) con las perlas, después de lo cual pueden pasivase grupos residuales NHS (u otros restos activados en las perlas) por reacción con glucosamina (u otra molécula apropiada para neutralizar el resto activado en las perlas). La relación de folato-PEG-amina o DUPA-PEG-amina a un colorante fluorescente y la pasivación de la molécula pueden optimizarse cuando sea necesario. De manera similar, los anticuerpos (como la molécula de adhesión epitelial celular o «EpCAM») pueden inmovilizarse en perlas. Un ejemplo comercialmente disponible, en que las perlas magnéticas funcionalizadas son perlas magnéticas funcionalizadas por unión a un anticuerpo monoclonal frente a la molécula de adhesión epitelial celular humana (EpCAM), como Epithelial Enrich Dynabeads®, comercialmente disponible de Invitrogen. Por ejemplo, los anticuerpos pueden unirse mediante enlaces covalentes a perlas recubiertas con NHS o pueden unirse a perlas recubiertas con estreptavidina mediante una biotina. Otros diversos esquemas de funcionalización también pueden usarse incluidos, entre otros, grupos carboxilo, tioles y silanos. Alternativamente, las perlas solo pueden tener los elementos de reconocimiento para unirse y atrapar a las células en la superficie de la placa, pero carecen de moléculas informadoras fluorescentes que puedan introducirse por separado para unirse directamente a las células capturadas. En un procedimiento, los anticuerpos etiquetados de manera fluorescente (por ejemplo, citoqueratina), ligandos de bajo peso molecular, péptidos o aptámeros pueden exponerse por separado a las células capturadas.

El sistema 10 microfluídico y el componente 12 del detector descritos en la presente memoria son adecuados en particular para la detección de células cancerosas unidas a perlas magnéticas. Están disponibles muchas técnicas para funcionalización y unión de perlas magnéticas a células diana como las CTC. Se describen procedimientos ejemplares en las siguientes publicaciones publicadas: T. Mitrelias, et al, «Biological cell detection using ferromagnetic microbeads», *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 310, pp. 2862-2864, marzo de 2007; N. Eide, et al., «Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow in uveal melanoma patients», *Acta Ophthalmologica*, vol. 87, pp. 830-836, diciembre de 2009; Yu et al., «Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization», *The Journal of Cell Biology*, vol. 192, n.º 3, pp. 373-382 (7 de febrero de 2011); Hayes & Smerage, «Circulating Tumor Cells», *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, vol. 95, 2010, pp. 95-112; Alexiou et al., «Medical Applications of Magnetic Nanoparticles», *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, vol. 6, 2006, pp. 2762-2768 e Ito, et al, «Medical application of functionalized magnetic nanoparticles», *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 100, 2005, pp. 1-11.

En el apéndice se identifican publicaciones que describen procedimientos ejemplares para la síntesis y la modificación de folato y DUPA. Cualquiera de los procedimientos y métodos descritos en estas publicaciones pueden ser adecuados para unir las perlas magnéticas a las CTC seleccionadas que pueden ser capturadas con posterioridad por el componente 12 del detector descrito en la presente memoria. La funcionalización de las perlas magnéticas con folato se describe totalmente en las referencias enumeradas en el apéndice, por lo tanto un experto en la técnica puede funcionalizar perlas magnéticas similares con DUPA como se describe además en las referencias enumeradas.

La propia molécula de DUPA está también descrita totalmente en las referencias enumeradas en el apéndice y en otros puntos en esta memoria descriptiva.

La capacidad para atraer células cancerosas unidas a perlas a una superficie sólida (es decir, sin orificios) se ha verificado en experimentos usando células de MCF-7 (estirpe celular de cáncer de mama) unidas a perlas magnéticas mediante anticuerpos EpCAM. Las células diana fluyeron con caudales volumétricos mayores que 2 ml/min y fueron atraídas magnéticamente con éxito a la superficie sólida durante el flujo. Las células diana presentan la dimensión efectiva más pequeña de aproximadamente 20 µm de manera que en otro experimento las células diana fluyeron por una placa que tenía orificios con un diámetro efectivo de 5 um. Se observaron células cancerosas intactas en la placa usando doble tinción superficial (citoqueratina) y nuclear (DAP I). En estos experimentos, 9 de 10 células diana fueron detectadas en una muestra de 12 ml, para una recuperación celular del 90 %.

La operación del sistema 10 microfluídico de detección descrita en la presente memoria puede controlarse por un controlador 45 maestro. El controlador puede ser un microprocesador configurado para seguir un protocolo de flujo controlado según una célula diana, un elemento de reconocimiento y un tamaño de la muestra particulares. El controlador maestro puede incorporar un lector para leer indicios asociados a una muestra o muestras particulares y cargar de manera automática y ejecutar un protocolo de flujo predeterminado asociado a una muestra particular.

El controlador 45 puede estar configurado también para permitir una operación controlada por el usuario. Por ejemplo, el caudal para una combinación particular de perla magnética y célula diana puede optimizarse aumentando el caudal de una muestra de células diana unidas hasta que ya no sea posible atraer perlas a la superficie 51 de la placa 18 con aberturas. La operación continua del sistema puede observarse directamente por la ventana de visualización para determinar si se requiere desvío del flujo o si se ha completado el procedimiento de detección.

En las realizaciones ilustradas, se describe que las perlas magnéticas pueden estar funcionalizadas con un marcador fluorescente. En estas realizaciones, la placa 18 con aberturas es generalmente opaca de manera que las señales fluorescentes que salen de las perlas MB no ligadas en la cámara 16b del fondo no serán detectadas por el panel 20 de visualización. Sin embargo, en algunos casos algunas perlas libres pueden quedar en la superficie 51 y producir señales fluorescentes que pueden perturbar la visualización. En estos casos, las perlas pueden funcionalizarse solo con ligandos y no con marcadores fluorescentes. Después de que se ha procesado totalmente la muestra y las células diana han sido capturadas en la placa 18 con aberturas, los ligandos con etiquetas fluorescentes pueden introducirse por separado en el depósito para unirse directamente a las células diana. Las células diana pueden entonces observarse fácilmente por el panel 20 de visualización. Con esta propuesta modificada, en algunos casos la placa 18 puede carecer de microaberturas puesto que las células diana en la superficie de la placa pueden diferenciarse fácilmente de las perlas magnéticas no unidas mediante fluorescencia.

En el procedimiento de detección, la cámara 16b inferior puede inundarse con una cantidad mínima de tampón o sangre, después de lo cual no hay flujo de fluido a través de la cámara inferior hasta que se completa la detección. La difusión de fluido por los orificios 50 entre las cámaras 16a, 16b superior e inferior será mínima puesto que este sistema 10 microfluídico de detección no se basa en un flujo impulsado por presión.

Las CTC de las muestras de sangre de los pacientes con diversos tumores malignos, incluidos, entre otros, cáncer de próstata, ovario, mama, colon, riñón y pulmón pueden detectarse, puesto que muchas células cancerosas expresan ciertas moléculas o antígenos en sus superficies que pueden fijarse como diana con varios elementos de reconocimiento, incluidos, entre otros, anticuerpos (por ejemplo, EpCAM), aptámeros, ligandos de bajo peso molecular (por ejemplo, folato y DUPA) y péptidos. Las perlas pueden ser funcionalizadas como se describió anteriormente (por ejemplo, DUPA para células de cáncer de próstata y EpCAM con extremos folato para células de cáncer de ovario, mama, colon, riñón y pulmón) y después se incuban y se mezclan con el fluido de la muestra durante 20-30 minutos. Este tiempo de incubación puede ser mayor o menor dependiendo del número de perlas usado, el volumen de la muestra y el número de células diana buscado. Por ejemplo, sembrar la muestra con un mayor número de perlas aumenta la posibilidad de que una célula diana «encuentre» una perla magnética y se una. Si hay varias muestras, la incubación de todas las muestras puede realizarse de manera simultánea. El análisis del fluido de la muestra por el presente sistema de detección y la secuencia del fluido de la muestra y los flujos de tampón pueden llevarse a cabo como se describe en la presente memoria. Las alícuotas de las células cancerosas capturadas pueden teñirse con elementos de reconocimiento adicionales, como anticuerpos a citoqueratinas y EpCAM para asegurar que las células retenidas por el componente del detector sean, por supuesto, células cancerosas. Además, un indicio preliminar de si los números de células CTC se correlacionan con el estadio de la enfermedad del donante de la muestra puede confirmarse. Si bien el sistema descrito no está limitado a un tipo de cáncer particular, las células de cáncer de próstata y de ovario se mencionan especialmente en la presente memoria como modelos para el sistema debido a que ambas enfermedades pueden tener síntomas imprecisos que dan como resultado ensayos biomoleculares confusos y ambos pueden beneficiarse de un ensayo de CTC fiable, rápido y sensible. Por ejemplo, el cáncer de próstata puede presentar síntomas similares a los de la hiperplasia prostática benigna. Los ensayos con biomarcadores APE pueden ser confusos debido tanto a falsos positivos como a falsos negativos. De manera similar, el cáncer de ovario puede presentar síntomas imprecisos y puede detectarse tan tardíamente como en el estadio III o IV.

En comparación con una serie de estudios en que se usan perlas magnéticas con éxito para separar manualmente una gran variedad de células (de patógenos a células T a CTC) de muestras complejas, la propuesta según la presente

descripción ofrece ventajosamente separación y detección, análisis más rápido y la capacidad para recoger las células capturadas y hacer que estén disponibles para otros tipos de análisis, incluidos, entre otros, los análisis genéticos. Además, en comparación con la tecnología magnetorresistiva gigante (GMR, por sus siglas en inglés) o sensores de válvula de giro que son conocidos para un experto en la técnica (hechos de muchas nanocapas con espesores controlados precisamente) que pueden detectar perlas magnéticas, la presente propuesta es ventajosamente más robusta, fácil de construir y de usar y ofrece un rendimiento mucho mayor. El sistema según la presente descripción también ofrece una ventaja significativa sobre las pruebas para atrapar células basándose en el tamaño en que se fuerzan las células a través de cavidades del tamaño de micrómetros por presión de fluidos. En estas pruebas se puede experimentar taponamiento de las cavidades (puesto que se fuerza a todas las entidades en la muestra a pasar por las cavidades) o atrapar otras entidades de tamaño similar al de las células diana o completar el paso y por lo tanto la pérdida de células diana a través de la cavidad.

La fuente S puede incluir células diana que ya se hayan unido a elementos de reconocimiento, así como perlas magnéticas. Alternativamente, la fuente puede contener inicialmente un fluido de muestra, como una muestra de sangre, a la que se añaden perlas magnéticas y se permite su incubación. Puesto que las células diana son raras o están en una concentración baja, es deseable sembrar la muestra con millones de perlas magnéticas funcionalizadas. Por ejemplo, en una propuesta se proporcionan 100 millones de perlas por cada mililitro de muestra de sangre. Se ha encontrado que un tiempo de incubación de 20 minutos es suficiente para encontrar CTC raras. El sistema 10 puede cebarse como se describió anteriormente durante el periodo de incubación puesto que la fuente S de la muestra no está implicada en el flujo de fluido durante este paso. Una vez que se completa el periodo de incubación, el protocolo de flujo para detectar las células diana descrito anteriormente puede implementarse. Alternativamente, como se describió anteriormente, la muestra proporcionada puede ser sangre muestreada y tratada por una combinación de tubos de preparación de células comerciales y centrifugación para desechar los glóbulos rojos que normalmente no se buscan durante una detección de CTC. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra de sangre tratada en donde los glóbulos rojos se han lisado usando un tampón para lisis de glóbulos rojos.

Se considera que el sistema 10 puede modificarse por incorporación a un sistema de diálisis o de tipo diálisis. En este caso, las perlas magnéticas funcionalizadas pueden inyectarse en el torrente sanguíneo del paciente previamente a la diálisis. En vez de que fluya a un recipiente CC de recogida la sangre que fluye por el componente 12 del detector o los componentes 12i del detector se devuelven a la diálisis. Puede incorporarse un elemento magnético de recogida a la producción del sistema para capturar todas las perlas magnéticas no unidas y las células unidas que no hayan sido recogidas en el componente o los componentes detectores.

Los expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse numerosas modificaciones a las implementaciones específicas descritas anteriormente. Por lo tanto, la descripción anterior no tiene que estar limitada a las realizaciones específicas ilustradas y descritas anteriormente. La descripción como se presenta y como puede ser demandada incluye variaciones, alternativas, modificaciones, mejoras, equivalentes y equivalentes sustanciales de las realizaciones y explicaciones descritas en la presente memoria, incluidas aquellas que no están contempladas o no son apreciadas en el momento presente, y que, por ejemplo, puedan surgir de los solicitantes / titulares de la patente y otros.

Por ejemplo, en las realizaciones ejemplares se describe que son capturadas células biológicas particulares, como las CTC, por el componente 12 del detector del sistema 10 microfluídico de detección. Otras entidades, incluidas partículas o cuerpos similares, de tamaño del orden de micrómetros (µm) también pueden ser detectadas y capturadas por el sistema descrito en la presente memoria, siempre que las partículas o los cuerpos puedan unirse a uno o más elementos de reconocimiento, como las perlas magnéticas descritas en la presente memoria.

Además, se representa que la placa 18 con aberturas está en general paralela a la mitad 15b inferior de la base 15 del componente del detector. Alternativamente, la placa puede formar ángulo hacia el canal 23 de salida de manera que las células diana capturadas tienden a acumularse en el extremo de salida y completarse hacia el extremo de entrada. Con una placa en ángulo también se puede facilitar el paso de las perlas magnéticas no unidas a la cámara 16b inferior por inducción de traslación a lo largo de la superficie 51 de la placa. Además, la placa 18 se muestra en general plana, aunque se contemplan otras configuraciones que facilitan la captura de células diana y el paso de perlas no unidas.

El imán 32 se describe en la presente memoria como un imán permanente con la aplicación del campo magnético controlado por el movimiento del imán. El campo magnético puede manipularse mediante una pantalla ajustable dispuesta entre el imán y el depósito 16. La pantalla puede usarse para bloquear completamente el campo magnético o para reducir el campo cuando sea necesario. Alternativamente, el imán puede ser un electroimán que pueda controlarse mediante el controlador 45 para activar o desactivar el campo magnético o ajustar la intensidad del campo. El controlador también puede modular el campo magnético durante un ciclo de detección para facilitar la captura de las células diana y extraer las perlas magnéticas no unidas a la cámara inferior.

En una alternativa más, el imán 32 puede incluir varios imanes dispuestos en un patrón predeterminado para facilitar el recuento de células capturadas en la placa 18 con aberturas. Así, en una realización, pueden disponerse varios imanes en tiras paralelas de manera que las células capturadas aparezcan en varias líneas.

En los protocolos de flujo de fluido descritos anteriormente, las células diana se purgan del componente 12 del detector en un paso. Alternativamente, las células pueden retenerse en la placa con aberturas y la propia placa eliminarse del componente del detector. En esta alternativa, el componente magnético puede permanecer en su posición a medida que se retira como la mitad 15a del cuerpo superior para proporcionar acceso a la placa con aberturas. La mitad 15b del cuerpo inferior puede transportarse con la placa con aberturas y el imán estar intacto y acoplado con otra mitad del cuerpo para procedimientos adicionales.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (10) microfluídico de detección para la detección de entidades diana en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en que cada entidad diana unida a una perla magnética presenta la dimensión efectiva más pequeña mayor que la dimensión efectiva más grande de cada perla magnética, comprendiendo el sistema:

una bomba (40, 41);

un imán (32) y un componente del detector que incluye:

un cuerpo (15) que define un depósito (16) y

una placa (18) dispuesta en dicho depósito y que separa dicho depósito en una primera cámara (16a) y una segunda cámara (16b), definiendo dicha placa una pluralidad de orificios (50) a su través, teniendo cada orificio un tamaño de dimensión efectiva para permitir el paso de la dimensión efectiva más grande de cada perla magnética y tamaño adicional para evitar el paso de la dimensión efectiva más pequeña de cada entidad diana;

en donde dicha primera cámara de dicho depósito tiene una primera entrada (13a) y una primera salida (13b), en donde dicha primera entrada es conectable de manera fluida a una fuente del fluido que contiene las entidades diana;

en donde el imán está sujeto o es soportado respecto al exterior del componente del detector y está dispuesto respecto a dicho depósito de manera que dicha segunda cámara de dicho depósito y dicha placa estén situados entre dicho imán y dicha primera cámara de dicho depósito, en donde dicho imán está configurado para generar una fuerza magnética suficiente para atraer perlas magnéticas en dicha primera cámara de dicho depósito a dicha segunda cámara de dicho depósito y

en donde la bomba es adecuada para que fluya el fluido de la fuente del fluido que contiene las entidades diana a través de dicha primera cámara de dicho depósito.

2. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 1, en donde dicho componente del detector incluye un panel de visualización que forma parte de dicha primera cámara de dicho depósito y está dispuesto para visualizar la superficie de dicha placa a través de dicha primera cámara, por ejemplo, en donde dicho componente de visualización es un vidrio ópticamente transparente.

3. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 1, en donde dicha primera entrada y dicha primera salida incluyen canales definidos en dicho cuerpo en comunicación con dicho depósito, dichos canales dispuestos en un ángulo no plano respecto a dicho depósito.

4. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 1, en donde dicho cuerpo incluye una porción que define al menos parte de dicha segunda cámara de dicho depósito, definiendo además dicha porción una cavidad con dicho imán montado en dicha cavidad.

5. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 1, en donde dicha bomba está conectada a dicha primera salida y opcionalmente en donde dicha bomba incluye:

una entrada conectada a dicha primera salida y

una salida conectada a una línea de fluido conectable a un recipiente de fluido.

6. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 1, en donde dicha segunda cámara de dicho depósito incluye una segunda entrada y una segunda salida, dicha segunda entrada conectable de manera fluida a una fuente de un fluido no reactivo diferente de dicho fluido que contiene las entidades diana.

7. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 6, en donde dicha bomba incluye:

una entrada conectada a dicha primera salida y a dicha segunda salida y

una salida conectada a una línea de fluido conectable a un primer recipiente para recibir fluido bombeado a través de dicha primera salida y a un segundo recipiente separado para recibir fluido bombeado a través de dicha segunda salida y opcionalmente en donde el sistema microfluídico de detección comprende, además:

una primera válvula controlable dispuesta entre dichas primera y segunda salidas y la entrada de dicha bomba y

una segunda válvula controlable separada dispuesta entre dicha salida de dicha bomba y dichos primer y segundo recipientes.

8. El sistema microfluídico de la reivindicación 6, que comprende además un conducto de salida conectado a dicha segunda salida y conectable a un recipiente para recibir fluido bombeado a través de dicha segunda salida y opcionalmente en donde el sistema microfluídico comprende además una línea de desvío conectada a dicha segunda salida y conectable de manera fluida a la fuente del fluido que contiene las entidades diana y una válvula controlable dispuesta entre dicho conducto de salida y dicha línea de desvío para la dirección selectiva de fluido bombeado a través de dicha segunda salida a dicha línea de desvío o al recipiente.

9. El sistema microfluídico de la reivindicación 1, que comprende, además:

un conducto de salida conectado a dicha primera salida y conectable a un recipiente de fluido para recibir fluido bombeado a través de dicha primera salida;

una línea de desvío dispuesta entre dicho conducto de salida y dicha primera entrada y

una válvula controlable para dirigir fluido que fluye a través de dicha primera salida al recipiente de fluido o a dicha línea de desvío.

10. El sistema microfluídico de detección de la reivindicación 1, en donde la superficie de dicha placa en dicha primera cámara se proporciona con un recubrimiento fisiológicamente inerte.

11. Un método para detectar entidades diana en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en que cada entidad diana unida a una perla magnética tiene la dimensión efectiva más pequeña mayor que la dimensión efectiva más grande de cada perla magnética, comprendiendo el método:

hacer fluir el fluido a través de un componente (12) del detector que tiene una primera cámara (16a) de un depósito (16) separada de una segunda cámara (16b) del depósito por una placa (18), definiendo la placa una pluralidad de orificios (50) a su través teniendo cada orificio un tamaño para permitir siempre el paso de la dimensión efectiva más grande de cada perla magnética y con tamaño adicional para evitar siempre el paso de la dimensión efectiva más pequeña de cada entidad diana y

aplicar una fuerza magnética bajo la placa suficiente para sacar las perlas magnéticas no unidas a una entidad diana a través de los orificios a la segunda cámara y suficiente para mantener las entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas contra la superficie de la placa en la primera cámara del depósito.

12. El método de la reivindicación 11, que comprende, además:

después de que se hayan mantenido las entidades diana en la superficie de la placa, modificar la fuerza magnética a un nivel suficiente para permitir la expulsión de las entidades diana de la superficie de la placa y

hacer fluir un líquido no reactivo a través de la primera cámara para expulsar las entidades diana y opcionalmente en donde el paso de modificar la fuerza magnética incluye aplicar una fuerza magnética por encima de la superficie de la placa para arrastrar las entidades diana de la superficie de la placa.

13. El método de la reivindicación 11, que comprende, además:

después de que se hayan mantenido las entidades diana en la superficie de la placa, modificar la fuerza magnética a un nivel suficiente para permitir la expulsión de las perlas magnéticas no unidas de la segunda cámara y

hacer fluir un líquido no reactivo a través de la segunda cámara para expulsar las perlas magnéticas.

14. El método de la reivindicación 11, en que el fluido se hacer fluir a una tasa del orden de mililitros por minuto.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 usado para detectar células tumorales circulantes, CTC, en una muestra de sangre de un paciente, que comprende obtener una muestra de sangre como fluido que contiene las CTC como las entidades diana que se han unido a una o más perlas magnéticas funcionalizadas y una cantidad de perlas magnéticas funcionalizadas no unidas a una CTC.

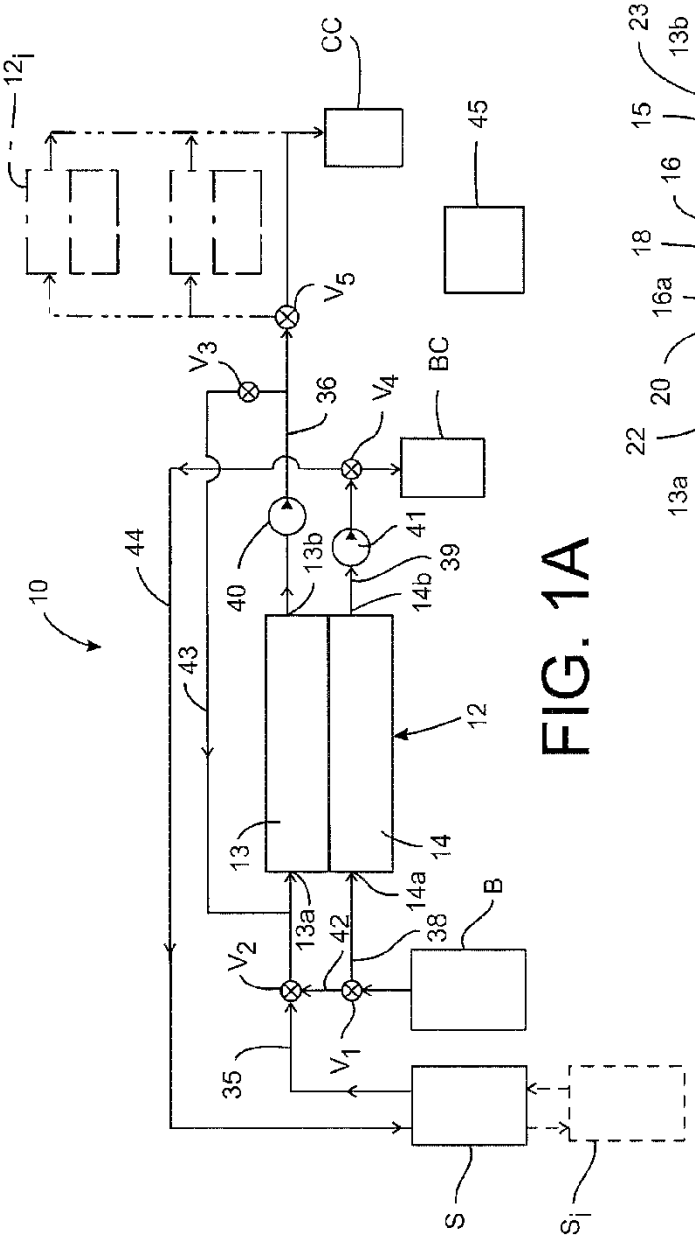


FIG. 1A

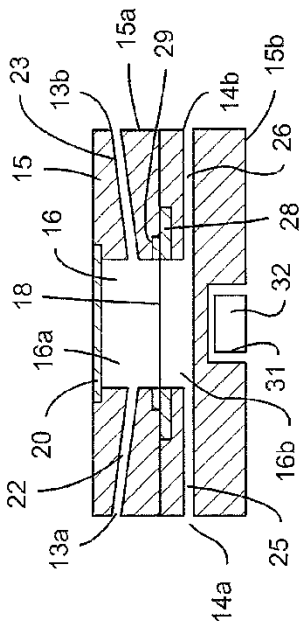


FIG. 2

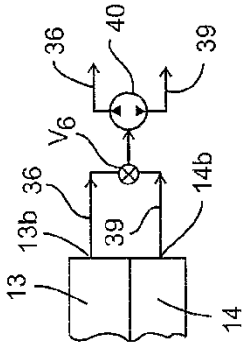


FIG. 1B

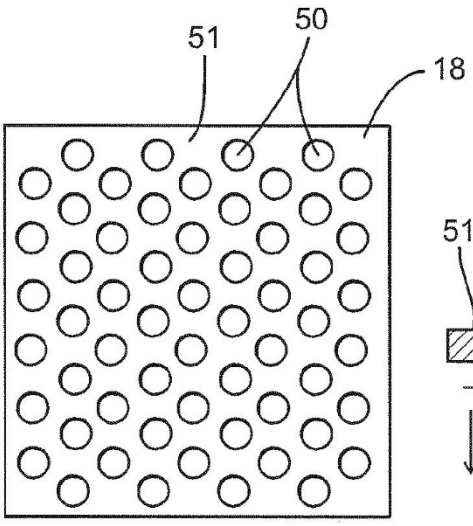


FIG. 3

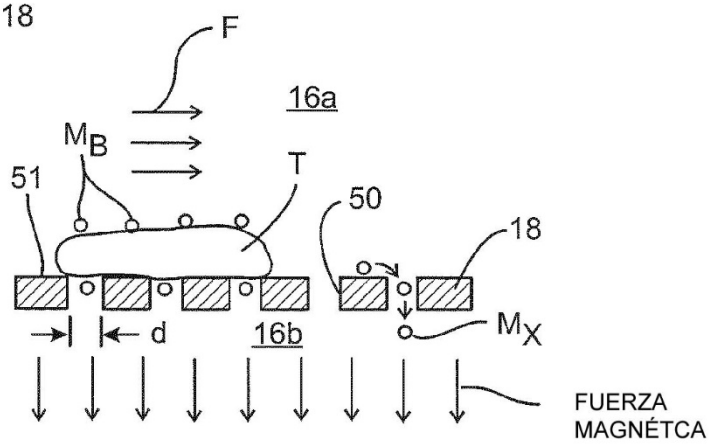


FIG. 4

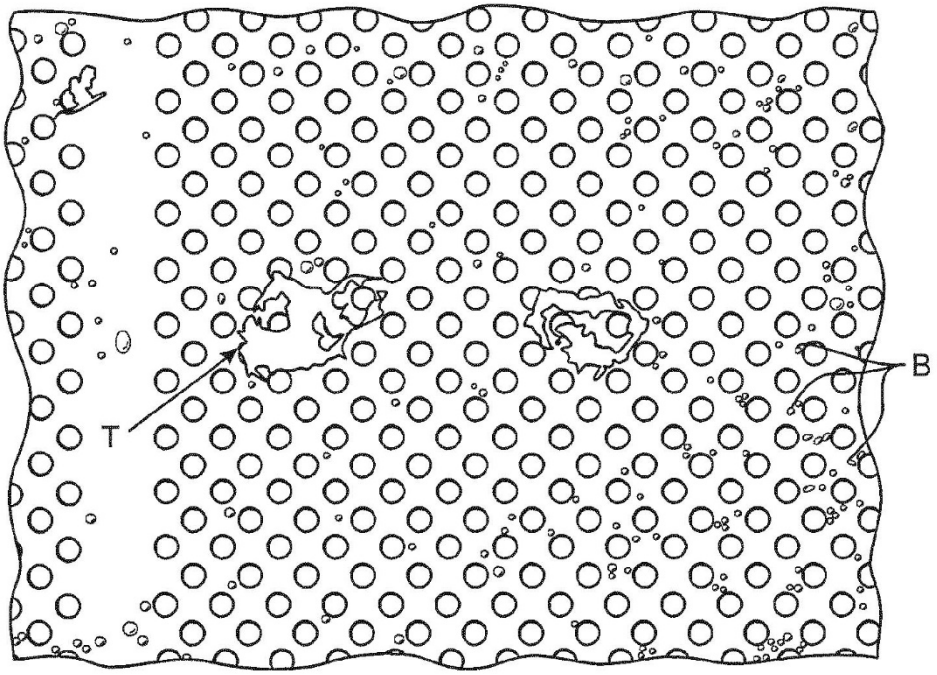


FIG. 6

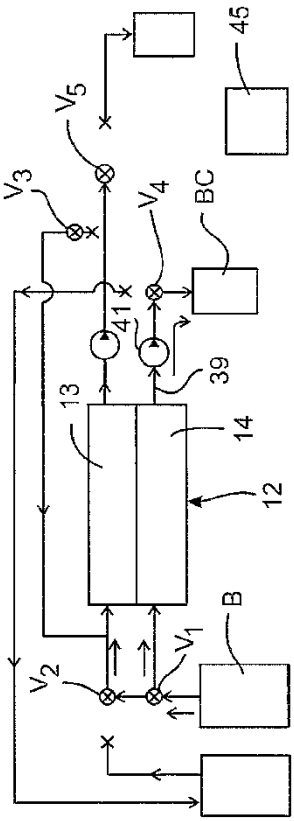


FIG. 5A

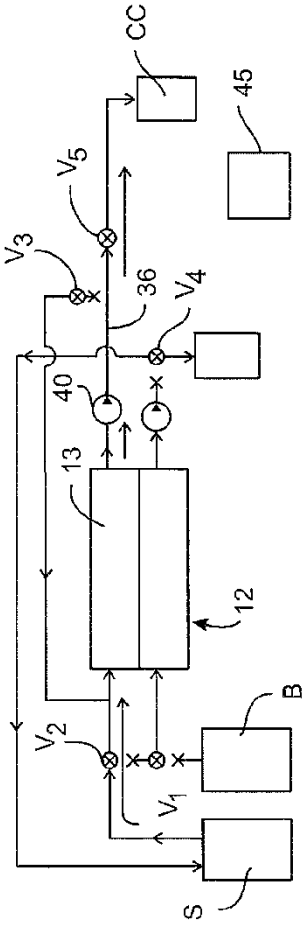


FIG. 5B

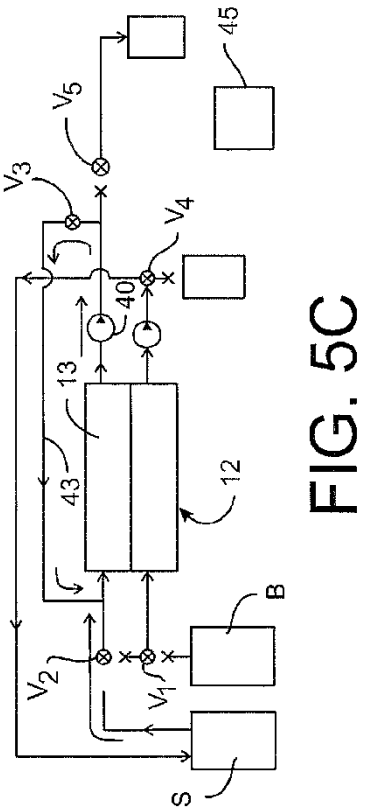

45
V5
V3
V4
40
13
43
12
B
V2
V1
S

FIG. 5C

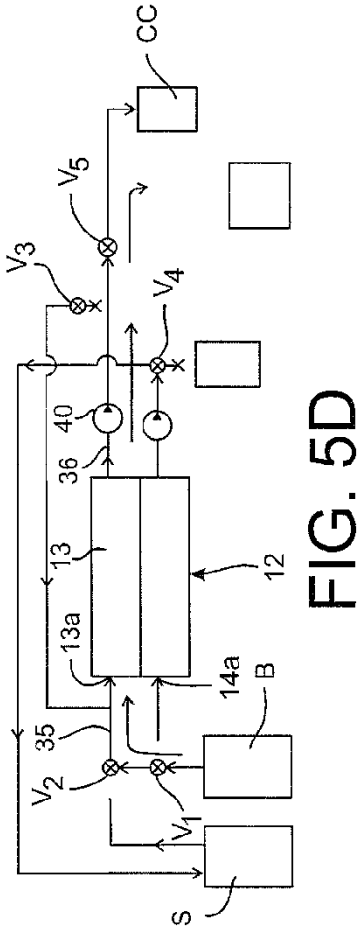

CC
V5
V3
V4
40
36
13
13a
12
14a
B
35
V2
V1
S

FIG. 5D