

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 845**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 33/543** (2006.01)

**B01D 29/00** (2006.01)

**G01N 33/49** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.01.2006 E 06717562 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 1838442**

54 Título: **Separación de células usando un microcanal que tiene pilares con una configuración**

30 Prioridad:

**18.01.2005 US 38920**  
**04.05.2005 US 678004 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.01.2014**

73 Titular/es:

**BIOCEPT, INC. (100.0%)**  
**5810 NANCY RIDGE DRIVE**  
**SAN DIEGO, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**TANG, ZHONGLIANG;**  
**BHATT, RAM y**  
**TSINBERG, PAVEL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 437 845 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

Separación de células usando un microcanal que tiene pilares con una configuración

5 Esta invención se refiere a la separación o el aislamiento de biomoléculas diana de líquidos de suministro y, más particularmente, a métodos y aparatos para separar células humanas diana deseadas de fluidos corporales o similares.

10 **Antecedentes de la invención**

El aislamiento y la recogida efectivos de células raras de una población de células heterogéneas sigue siendo de interés, debido a la creciente demanda de poblaciones de células aisladas para su uso en diagnóstico y tratamiento de enfermedades, por ejemplo terapia génica, así como para investigación científica básica. Por ejemplo, células con cambios patológicos, tales como células cancerosas, pueden separarse de una población de células normales más grande y las poblaciones de células limpiadas pueden transplantarse a continuación de vuelta al paciente.

15 La separación de células es un área de desarrollo biomédico y clínico que crece rápidamente, y métodos mejorados de separación de un subconjunto de células deseadas de una población compleja permitirá un estudio y un uso más amplios de células que tienen características relativamente uniformes y definidas. La separación de células también se usa ampliamente en investigación, por ejemplo para determinar el efecto de un fármaco o tratamiento sobre una población de células diana, para investigar rutas biológicas, para aislar y estudiar poblaciones de células transformadas o modificadas de otro modo; etc. Los presentes usos clínicos incluyen, por ejemplo, el aislamiento de células madre hematopoyéticas para la reconstitución de células sanguíneas, particularmente en combinación con quimio- y radioterapia ablativa.

20 La Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada N° 2004/038315 une adaptadores liberables a las superficies lumbales interiores de tubos capilares, con las células unidas deseadas siendo posteriormente liberadas mediante un reactivo de escisión y recuperadas. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada N° 2002/132316 usa dispositivos de microcanal para separar poblaciones de células a través del uso de un campo de gradiente óptico en movimiento. La Patente de Estados Unidos N° 6.074.827 desvela el uso de dispositivos microfluídicos que están  
30 contruidos para tener "canales de enriquecimiento" en los que se usa electroforesis para separar e identificar ácidos nucleicos particulares a partir de muestras. También se menciona el uso opcional de antibióticos u otros fragmentos de unión para retener a un biomaterial diana deseado. La Patente de Estados Unidos N° 6.432.630 desvela un sistema de microflujo para guiar el flujo de un fluido que contiene biopartículas a través de canales donde se empela desvío selectivo, e indica que dichos sistemas pueden usarse para separar células fetales de muestras de sangre materna.

35 La Patente de Estados Unidos N° 6.454.924 desvela dispositivos microfluídicos en los que se hace que líquidos que contienen analitos fluyan generalmente hacia abajo pasadas superficies de muestra dispuestas encima de pilares verticales sobre los que están unidos agentes de captura, con las superficies laterales de dichos pilares habiéndose convertido en hidrófobas para facilitar el flujo en los canales que definen.

40 K. Takahashi et al., J. Nanobiotechnology, 2, 5 (13 de junio de 2004) (6 págs) desvelan sistemas de clasificación de células incorporadas en chip en los que múltiples pasajes de entrada microfluídicos conducen a una región central de clasificación de células con forma de una placa de PDMS (hecha en un molde matriz creado en una resina epoxi fotosensible) que está unida a una placa de vidrio. Electrodo de gel de agar están provistos en la placa de PDMS que facilitan la separación de células no deseadas mediante la aplicación de fuerzas electroestáticas que dirigen estas células al interior de una corriente de desechos continua paralela de tampón, durante su flujo a través de una corta región de confluencia de clasificación de células. Un pre-filtro que usa pilares para atrapar físicamente grandes partículas de polvo también se conoce. La Solicitud Internacional Publicada WO 2004/029221 desvela un dispositivo microfluídico construido de forma similar, que puede usarse para la separación de células, tal como separar eritrocitos fetales de la sangre materna mediante lisis selectiva de eritrocitos maternos. Una muestra que contiene células puede introducirse en un dispositivo de canal microfluídico que separa células completas; éste contiene una pluralidad de obstáculos cilíndricos, con las superficies de los obstáculos teniendo restos de unión, por ejemplo, anticuerpos, acoplados adecuadamente a ellos, restos que se unirán a células en la muestra. La Patente de Estados Unidos N° 5.637.469 desvela dispositivos microfluídicos que tienen una pluralidad de canales de una profundidad de 100 micrómetros o menos en los que restos de unión, tales como anticuerpos, están inmovilizados sobre superficies para capturar biomoléculas de interés que pueden ser analizadas *in situ*. La Patente de Estados Unidos N° 5.147.607 enseña el uso de dispositivos para llevar a cabo inmunoensayos, tales como ensayos en sándwich, donde anticuerpos se movilizan en microcanales. Puede estar provista una zona ahuecada en el microcanal que contiene un grupo de protuberancias que se extienden hacia arriba desde la superficie inferior del canal y en las que están inmovilizados los anticuerpos.

65 Las anteriores referencias, brevemente descritas, proporcionan pruebas de que existe una búsqueda continua de métodos de separación mejorados para aislar células u otros biomateriales de fluidos corporales o similares. El documento US 6.368.871 desvela un aparato y un método para la manipulación de materiales, incluyendo

partículas, células, macromoléculas, tales como proteínas, ácidos nucleicos y otros restos, en muestras de fluido.

El documento EP 1 371 419 desvela un método y un dispositivo para determinar la presencia o la cantidad de un analito en la muestra de ensayo.

El documento EP 1 413 346 desvela un aparato de separación y un proceso para fabricar un aparato de separación. El aparato de separación tiene una zona de separación de muestras que comprende una serie de huecos definidos en una pared interna de un pasaje de flujo a través del cual pasa una muestra.

## Sumario de la invención

La invención, en su forma más amplia, se define en las reivindicaciones independientes.

La presente invención proporciona un aparato de microflujo tal como se expone en la reivindicación 1 y un método tal como se expone en la reivindicación 16:

1. Un aparato de microflujo que comprende:

un cuerpo (11) que tiene una trayectoria de flujo que comprende un medio de entrada (15), un medio de salida (19), y un microcanal (13) que tiene una región de recogida (17) que se extiende entre dichos medios de entrada y de salida,

en el que dicha región de recogida (17) incluye una pluralidad de pilares verticales (23) sustancialmente perpendiculares a una superficie de base (22) y alineados transversales a la trayectoria de flujo y dispuestos en una configuración de matriz irregular y aleatoria por toda la anchura de la región de recogida, de modo que no puede haber un flujo en línea recta a través de la región de recogida y que las corrientes de flujo directo son alteradas, constituyendo los pilares una pieza con la superficie de base (22) de dicho microcanal y proyectándose desde ésta,

en el que el volumen total de dichos pilares es del 15 % al 25 % del volumen total de dicha región de recogida (17).

16. Un método de captura de una molécula diana en una muestra que comprende hacer que una masa de líquido que contiene dicha muestra fluya a través de dicho microcanal (13) del aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de dicho microcanal está revestida con un agente de secuestro capaz de unirse a la biomolécula diana.

Algunos aspectos de la presente memoria descriptiva se desvelan a continuación:

La presente divulgación desvela un aparato de microflujo para recuperar células raras u otras biomoléculas diana a partir de cantidades relativamente pequeñas de fluidos corporales o similares, que incorpora al menos un dispositivo de microcanal construido especialmente. Dicho dispositivo está construido usando un sustrato que está formado con una trayectoria de flujo similar a un canal que incorpora una pluralidad de pilares fijos transversales en una región de recogida; estos pilares constituyen una pieza con el sustrato y se extienden entre las superficies superior e inferior del canal. Los pilares están dispuestos en una configuración de matriz irregular particular para alterar el flujo en línea recta a su través y de forma importante para romper el flujo directo regular a través de la matriz, garantizando de este modo colisiones con los pilares y promoviendo torbellinos y remolinos en un fluido corporal u otro líquido que se está haciendo fluir a lo largo de esta trayectoria de flujo a través de la región de recogida. Los pilares varían en tamaño, por ejemplo diámetro de sección transversal. Agentes de secuestro que están seleccionados para capturar las biomoléculas diana deseadas y recogerlas de este modo dentro de la región de recogida del microcanal se unen apropiadamente a las superficies de los pilares transversales y todas las demás superficies por toda la región de recogida. Preferentemente un pozo de suministro está provisto en una ubicación aguas arriba del microcanal que conduce a la región de recogida. Se ha descubierto que, orientando el aparato de microflujo de modo que esté inclinado con respecto a la horizontal, puede conseguirse una separación de células más completa como resultado de vectores de fuerza creados por la gravedad.

En un aspecto particular, la presente divulgación desvela un método para separar biomoléculas, tales como células, para una muestra de fluido corporal u otro líquido, método que comprende hacer que dicha muestra que contiene biomoléculas diana fluya aguas abajo a lo largo de una trayectoria de flujo en el dispositivo de microflujo desde una entrada hasta una salida, trayectoria de flujo que comprende una disposición de microcanal que incluye una región de recogida de sección transversal expandida, mientras se orienta el dispositivo de modo que dicha región de recogida de la trayectoria de flujo esté alineada en un ángulo de aproximadamente 30° a aproximadamente 60° con respecto a la horizontal, separando biomoléculas diana de la muestra que fluye (a) interrumpiendo el flujo en línea recta del líquido a través de dicha región de recogida, como resultado de bloquear dicho flujo con una pluralidad de pilares separadores ubicados en dicha región, pilares que constituyen una pieza con una superficie superior o inferior de dicho microcanal y se extienden desde ésta hasta la superficie opuesta del mismo, extendiéndose dichos pilares transversales a dicha trayectoria de flujo y estando ubicados en una configuración irregular que se extiende lateralmente por dicha región de recogida e impide el flujo en línea recta y el flujo directo a su través, y todas las superficies de dicha región de recogida incluyendo dichos pilares que tienen agentes de secuestro portados sobre

ellos, y (b) capturando biomoléculas diana descubiertas en la muestra de líquido que fluye sobre superficies en la región de recogida uniendo las moléculas diana a los agentes de secuestro como resultado de la alteración del flujo por dichos pilares irregulares y vectores de fuerza que son el resultado de la gravedad, vectores que están alineados en un ángulo agudo con dicha superficie inferior de dicha región de recogida, y descargando el resto de la muestra de líquido a través de la salida.

En otro aspecto particular, la presente divulgación desvela un aparato de microflujo para separar biomoléculas, tales como células, de una muestra de fluido corporal u otro líquido, aparato que incluye un dispositivo que comprende un cuerpo que tiene una trayectoria de flujo definida en su interior a través de la cual puede hacerse fluir a dicha muestra que contiene biomoléculas diana, teniendo el cuerpo un pasaje de entrada a dicha trayectoria de flujo, un pasaje de salida de él, y una disposición de microcanal que se extiende entre dichos pasajes de entrada y de salida, y una placa de cierre, dicha disposición de microcanal incluye una región de recogida que tiene superficies superior e inferior, una de las cuales es proporcionada por dicha placa de cierre, y una pluralidad de pilares separadores transversales, constituyendo dichos pilares una pieza con una de dichas superficies superior e inferior de dicha región de recogida y extendiéndose lateralmente por dicha trayectoria de flujo hasta la otra de dichas superficies proporcionadas por dicha placa de cierre, estando dichos pilares ubicados en una configuración irregular para interrumpir flujo en línea recta y flujo directo de líquido a través de dicha región, portando dichas superficies de dicha región de recogida, que incluyen dichos pilares, agentes de secuestro que se unirán con biomoléculas diana, y estando dicha entrada alineada en un ángulo de entre aproximadamente  $120^\circ$  y aproximadamente  $150^\circ$  con respecto a dicha trayectoria de flujo a través de dicha región de recogida, con lo que una muestra puede suministrarse de forma sustancialmente vertical hacia abajo a través de dicha entrada mientras que dicho cuerpo está alineado con dicha trayectoria de flujo a aproximadamente un ángulo de  $30^\circ$  a  $60^\circ$  con respecto a la horizontal y con lo que dicha configuración irregular de dichos pilares y vectores de fuerza que resultan de la gravedad causan una captura eficaz de biomoléculas diana en dicha región de recogida, particularmente sobre la superficie inferior de la misma.

En un aspecto particular adicional, la presente divulgación desvela un aparato de microflujo para separar biomoléculas, tales como células, de una muestra de un fluido corporal u otro líquido, aparato que comprende un cuerpo que tiene una trayectoria de flujo definida como una cavidad en una superficie plana de la misma a través de la cual puede hacerse fluir a dicha muestra que contiene biomoléculas diana, teniendo la trayectoria de flujo un medio de entrada, un medio de salida, y una disposición de microcanal que se extiende entre dichos medios de entrada y de salida, disposición de microcanal que incluye una región de recogida con una pluralidad de pilares separadores transversales ubicados en dicha región, y un medio de placa de cierre que tiene una superficie plana que topa con dicha superficie plana del cuerpo y cierra dicha cavidad para la trayectoria de flujo, constituyendo dichos pilares una pieza con una superficie de base de dicha región de recogida y proyectándose desde ésta para extenderse hasta la superficie de dicho medio de placa de cierre, estando dichos pilares dispuestos en una configuración irregular que se extiende lateralmente por dicha trayectoria de flujo en dicha región de recogida para interrumpir el flujo en línea recta y el flujo directo de líquido a través de dicha región, y estando todas dichas superficies de dicha región de recogida que incluye dichos pilares revestidas con un hidrogel permeable hidrófilo y portando agentes de secuestro que se unirán con biomoléculas diana, con lo que la alteración de flujo directo por toda dicha región de recogida como resultado de dicha configuración irregular de dichos pilares crea la captura eficaz de biomoléculas diana sobre dichas superficies en dicha región de recogida.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una vista en perspectiva de un sustrato para el dispositivo de microflujo en el que se ha fabricado una región de recogida que contiene pilares simplificada en un microcanal.

La figura 2 es una vista en detalle aumentada que muestra una parte de la región de recogida de la figura 1 donde están ubicados los pilares con configuración.

La figura 3 es una vista de sección transversal frontal del sustrato de la figura 1 tomada a lo largo de la línea 3-3 con una placa de cubierta unida a su superficie inferior.

La figura 4 es una vista en perspectiva esquemática de un aparato que incorpora dos válvulas con un sustrato tal como se muestra en general en la figura 1 a través de la inclusión de una placa intermedia.

La figura 5 es una vista de sección transversal tomada a lo largo de la línea 5-5 de la figura 4.

La figura 6 es una vista en planta esquemática que muestra un sustrato del tipo mostrado en la figura 1, en el que están fabricadas bombas como parte del aparato de microflujo.

La figura 7 es una vista esquemática de una parte de un sustrato en el que está incorporado un micromezclador en la región de suministro.

La figura 8 es una representación esquemática de anticuerpos unidos a través de una región de recogida mediante la aplicación de un revestimiento hidrófilo.

Las figuras 9 y 10 son representaciones esquemáticas de química que pueden usarse para unir covalentemente agentes de secuestro, por ejemplo, anticuerpos, por toda una región de recogida usando un revestimiento hidrófilo, junto con representación de la posterior captura de células diana deseadas.

La figura 11 es un diagrama de flujo que ilustra las etapas de una operación de recuperación de células utilizando dicho dispositivo de separación de células con pilares con configuración.

La figura 12 es una vista en perspectiva de una realización alternativa de un aparato de microflujo en el que se ha fabricado una región de recogida que contiene pilares en un dispositivo de microcanal diseñado para

funcionamiento en un plano inclinado con respecto a la horizontal.

La figura 13 es una vista inferior de la parte del cuerpo del dispositivo de microflujo de la figura 12.

La figura 14 es una vista de sección transversal frontal, de tamaño aumentado, tomada a lo largo de la línea 14-14 de la figura 12.

5 La figura 15 es una vista esquemática que muestra el aparato de la figura 12 en uso.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 Básicamente se proporciona un aparato que incluye un dispositivo que tiene un cuerpo o sustrato 11 que tiene una trayectoria de flujo definida en su interior que incluye al menos un microcanal 13 que tiene una región de recogida 17, trayectoria de flujo que está unida a una entrada de muestra 15 y una salida de líquido 19. Tal como se menciona a continuación en el presente documento, la trayectoria de flujo puede incluir varios microcanales, dispuestos en serie, cada uno de los cuales tiene una dicha región de recogida. Como alternativa, un microcanal puede tener más de una región de recogida, dispuestas en serie, y también puede haber más de una entrada y más de una salida, todas bien conocidas en la presente técnica. Además, éste puede formar parte de un aparato microfluídico integrado construido sobre un chip, un disco o similares; en dicho aparato, sustancialmente todos los MEMS (sistemas micro-electro-mecánicos) o componentes necesarios para llevar a cabo recuperación de células y/o diagnóstico de biomoléculas aisladas a partir de una muestra, pueden incorporarse como parte de una unidad única, compacta y de fácil manejo.

15 La figura 1 es una vista en perspectiva del cuerpo o sustrato 11 que está formado con una trayectoria de flujo que incluye un microcanal 13 al que se le suministra el líquido de muestra a través de una abertura o pozo 15 que sirve como entrada o punto de ingreso y una abertura 19 que sirve como salida. La sección transversal de la región de recogida 17 es mayor que la de una sección de entrada 18 que conduce a su interior desde la abertura de entrada 15. La sección de entrada contiene un par de divisores/soportes alineados axialmente 21 justo aguas arriba de donde se ensancha en el extremo de la región 18 para entrar en la región de recogida 17. Estos divisores centrales rompen el flujo en dos trayectorias y sirven para distribuir el flujo de líquido más uniformemente a medida que es suministrado al extremo de entrada de la región de recogida 17. La región de recogida 17 contiene una pluralidad de pilares verticales 23 que están alineados transversales con respecto a la trayectoria de flujo del líquido y dispuestos en una configuración irregular, generalmente aleatoria por toda la anchura de la parte de la región de recogida del canal de flujo. La configuración de los pilares es tal que no puede haber flujo en línea recta a través de la región de recogida y que las corrientes de flujo directo son alteradas, garantizando que existe un buen contacto entre el líquido que se hace fluir a lo largo de la trayectoria de flujo y las superficies de los pilares. Los pilares constituyen una pieza con la base plana 22 de la región de recogida 17 y se extienden perpendicular a ella, presentando superficies que son verticales con respecto a una trayectoria horizontal de líquido que se está haciendo fluir a través del canal de flujo del sustrato 11. Preferentemente, estos se extienden hasta y están fijados en sus superficies del extremo libres mediante unión a la superficie de una placa de cierre plana enfrentada 27 que es paralela a la superficie de base 22 y que cierra el canal de flujo, tal como se describe en detalle a continuación en el presente documento. Agujeros de entrada y de salida 24a y 24b pueden perforarse a través de dicha placa de cierre, pero preferentemente están formados en el sustrato 11. Otro divisor/soporte de flujo 21a está ubicado en la salida de la región de recogida.

20 Tal como se conoce bien en la esta técnica, un sustrato puede estar formado con una trayectoria de flujo que incluye un par de microcanales paralelos, cada uno de los cuales tiene una región de recogida. Ésta podría usarse en una disposición de flujo en serie, o podría usarse en funcionamiento de flujo en paralelo. El flujo puede conseguirse mediante bombeo, por ejemplo usando una bomba de jeringa o similar, o mediante vacío que arrastraría líquido a través de un depósito en un pozo de entrada proporcionado por un agujero de entrada de gran diámetro 24a. Preferentemente, está incluido dicho pozo que tiene una capacidad para contener de aproximadamente 50  $\mu$ l a aproximadamente 500  $\mu$ l de muestra de líquido.

25 El diseño de los canales de flujo es tal que, a caudales a través del dispositivo dentro de un intervalo razonable, por ejemplo inyección de sangre materna usando una bomba de jeringa de infusión de Harvard Apparatus convencional para crear un flujo en la región de recogida a una velocidad de aproximadamente 0,05 a 5 mm por segundo, existe alteración sustancial del flujo directo a través de la región sin crear turbulencia; esto es el resultado de la disposición aleatoria de pilares de diferentes tamaños y la separación relativa de los pilares por toda la región de recogida. Un flujo no directo relativamente suave sin puntos muertos se consigue a un caudal líquido promedio preferido de entre aproximadamente 0,1 y 2 mm/segundo, y más preferentemente el caudal promedio se mantiene entre aproximadamente 0,2 y 1 mm/segundo y se consigue mediante succión desde un pozo de entrada de tamaño definido.

30 Generalmente, el sustrato 11 puede estar hecho de cualquier material aceptable en laboratorio adecuado, tal como silicio, sílice fusionada, vidrio y materiales poliméricos. Puede ser deseable usar un material que es opcionalmente transparente, particularmente cuando se desea emplear opcionalmente una función de diagnóstico. En su realización más sencilla, el sustrato que porta el microcanal fabricado se sella con una placa 27 que tiene una superficie plana que topará con la superficie enfrentada del sustrato 11, tal como se representa en la figura 3. Dicha placa puede esta fabricada a partir del mismo material o puede ser simplemente una placa de cubierta sólida hecha de vidrio; sin embargo, una placa de regulación de flujo intermedia 25 puede estar incluida, tal como se explica a

5 continuación en el presente documento. Los plásticos impermeables macizos adecuados que pueden usarse incluyen polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), policarbonato, poliestireno, polietilenteraftalato, así como otras resinas poliméricas bien conocidas para uso de material de laboratorio aceptable. Dichos sustratos con configuración pueden fabricarse usando cualquier método conveniente tal como los seleccionados entre técnicas de moldeo y colada convencionales.

10 Los sustratos pueden fabricarse convenientemente a partir de materiales poliméricos usando una estructura de molde matriz o negativo, que puede crearse en un fotosensible negativo grueso, usando litografía óptica, tal como se conoce bien en la presente técnica y se describe en el artículo J. Nanobiotechnology. Por ejemplo, la capa de construcción puede estar formada a partir de una mezcla de fotosensible de resina epoxi de grado estándar disponible en el mercado (EPON SU-8) y endurecedor (SU-8 2025), que puede hilarse sobre sustratos de torta de silicio a 2000 rpm para proporcionar, por ejemplo, una película de 40 ó 50  $\mu\text{m}$  de grosor de dicho fotosensible. El grosor determina la altura de la trayectoria de flujo en la región de recogida. La película es sometida a horneado previo a la exposición durante 3 minutos a 60  $^{\circ}\text{C}$  y a continuación 7 minutos a 95  $^{\circ}\text{C}$  en una placa caliente a nivel de forma precisa para garantizar un grosor uniforme en toda ella, y las muestras resultantes se enfrían a temperatura ambiente. Un alineador *Karl Suss Contact Mask Aligner* se usa para exponer a una película con la configuración deseada para la trayectoria de flujo en el dispositivo definitivo. La película se hornea posteriormente a continuación a 65  $^{\circ}\text{C}$  durante 2 minutos y a continuación a 95  $^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos antes de que se revele en un revelador comercial SU-8 durante 5 minutos, con agitación ligera aplicándose durante el revelado. Esto crea un molde con configuración negativa en el fotosensible de epoxi que se usa a continuación como molde matriz para replicación de sustratos con configuración de pilares en PDMS u otra resina polimérica adecuada.

25 Como ejemplo, una composición de PDMS se prepara a partir de una mezcla de un prepolímero de PDMS y un agente de curado (kit Sylgard 184, Dow Corning) a una relación en peso de 10:1. La mezcla se somete a un vacío para evacuar burbujas que pueden formarse durante el mezclado, antes de verterlo sobre el molde matriz de resina epoxi, que está ubicado en una cavidad de profundidad deseada para crear un sustrato de grosor deseado. El molde matriz puede estar opcionalmente revestido previamente con una fina capa (-50 nm) de un metal adecuado (por ejemplo oro) para mejorar la liberación de la réplica de PDMS después del curado. El curado del sustrato de PDMS puede llevarse a cabo a 80  $^{\circ}\text{C}$  durante 90 minutos; sin embargo, subcurando inicialmente el PDMS, puede ser posible facilitar la posterior funcionalización de la región de recogida que incluye las superficies de pilar tal como se describe a continuación en el presente documento.

35 La disposición y las dimensiones del microcanal 13 y de los pilares con configuración 23 en la región de recogida 17 se determinan mediante la máscara usada en la etapa de exposición de la fabricación del molde matriz. La profundidad del microcanal 13 está controlada por el grosor de la capa de SU-8 del molde matriz, que se determina mediante las condiciones de revestimiento giratorio. La figura 2 proporciona una vista superior del microcanal 13 que muestra un detalle de los pilares 23 en la región de recogida 17 en una disposición generalmente aleatoria preferida.

40 En realizaciones alternativas, podrían perforarse o crearse de otro modo agujeros 24 en la superficie plana, sin discontinuidades de la superficie de una réplica de PDMS liberada o en la placa de cubierta para proporcionar conexiones de entrada y de salida. En el primer caso, podría acoplarse con un simple cubreobjetos de microscopio u otra placa plana adecuada, tal como una pieza plana y fina de PDMS, que proporcionaría una placa de cubierta o base impermeforada para el sustrato. Después de someter a los dos componentes a limpieza por plasma durante dos minutos, las dos superficies limpias se colocan inmediatamente en contacto superficial, sin tocar las superficies enfrentadas, que a continuación se vuelven selladas mediante reacción superficial tal como se conoce bien en la presente técnica, formando una junta permanente y cerrando la trayectoria de flujo microfluídico.

50 Si se desea integrar la gestión de flujo incorporada en chip en dicho aparato, puede fabricarse de forma similar un molde matriz de SU-8 diferente que incorpora cavidades para elementos de regulación de flujo, tales como válvulas neumáticas y similares. Una placa o capa de regulación de flujo 25 producida a partir de dicho molde matriz se laminaría en primer lugar sobre el sustrato del microcanal 11 (véase las figuras 4 y 5), y se laminaría a su vez sobre una placa de cierre plana 27. El empleo de dichos componentes de regulación de flujo y otros MEMS en un aparato de microflujo se muestra en las Patentes de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.074.827 y 6.454.924. Alineando cuidadosamente dicha placa de regulación de flujo 25 con un sustrato que porta un microcanal 11 y a continuación hibridando durante una noche a 80  $^{\circ}\text{C}$ , se fabrica una estructura compuesta. A continuación, las cavidades en la placa de regulación de flujo 25 se cierran mediante una placa plana o cubreobjetos de vidrio 27 usando la misma técnica descrita anteriormente. Como opción adicional, una segunda placa de regulación de flujo podría laminarse sobre la primera placa 25, empleando la misma técnica, si se desea incorporar controles aún más sofisticados y procesamiento opcional.

60 Por ejemplo, mecanismos de regulación de flujo incorporados en chip podrían proporcionarse en un sistema multicanal formado en un sustrato 11 disponiéndolos en una capa de regulación de flujo 25 que se sellaría al sustrato. Un sistema sencillo se ilustra en las figuras 4 y 5 donde pasajes 24a y 24b conducen a la entrada y la salida. El suministro de aire a las válvulas neumáticas 29 puede ser mediante agujeros perforados o formados adecuadamente de otra forma 30 que se extienden a través del sustrato 11 en la placa 25. La placa de regulación de flujo 25 o el sustrato 11 podrían contener opcionalmente pasajes de suministro alternativos que podrían suministrar

líquido a la entrada 15 y también podría incluir un pasaje de salida o retirada alternativo, tal como se conoce bien en la presente técnica.

5 Tal como se ha mencionado, una disposición en la que se proporcionan dos regiones de recogida conectadas en serie, tiende a diferentes métodos de funcionamiento y uso. Por ejemplo, cuando se va a tratar un líquido de muestra que potencialmente contiene dos subpoblaciones diferentes de biomoléculas diana o células de interés, un tipo de agente de secuestro puede unirse a los pilares en una región o cámara de recogida, y un tipo diferente de agente de secuestro puede unirse a pilares en una cámara de recogida aguas abajo. Como alternativa, en un caso en el que las células diana son extremadamente raras, podría ser deseable unir los mismos agentes de secuestro a los pilares en ambas cámaras de recogida para aumentar la probabilidad de ser capaces de capturar casi el 100 % de las células en la muestra de líquido.

15 Desde un punto de vista de la construcción, algunos componentes adicionales que podrían incorporarse opcionalmente en dicho aparato se ilustran en las figuras 6 y 7. La figura 6 muestra un microcanal similar al representado en la figura 1 en el que disposiciones de bomba de tipo peristáltico se incorporan en una región del pasaje de entrada y una región del pasaje de salida que flanquean a la cámara de recogida. Se ilustra una disposición de microcanal 13' que incluye una entrada 15', una cámara de recogida 17' y una salida 19' en la que una disposición de bombeo integrada 41 se construye mediante la incorporación de tres válvulas de membrana diseñadas especialmente ubicadas en un pasaje de entrada 18' que conduce a la cámara de recogida. La representación esquemática es de una disposición similar a la mostrada en las figuras 4 y 5 donde la aplicación de aire u otro gas a alta presión a un pasaje 30' que conduce a lado de presión de la membrana de cada válvula en una capa o placa de regulación de flujo hace que esa membrana se expanda, apretando al líquido en la región adyacente del microcanal con el que está asociada. Programando una unidad de control para accionar las tres válvulas en secuencia, de izquierda a derecha, se establece un movimiento en onda, con lo que el líquido en la región de entrada 18' del microcanal es bombeado a la derecha y a través del dispositivo de recogida 17'. Si se desea, una disposición de bombeo de tipo peristáltico similar 43 también se incorpora en la región del pasaje de salida 45 que conduce aguas abajo desde la cámara de recogida 17'.

30 Como otra potencial alternativa, una disposición de micromezclado se ilustra en la figura 7. Se ilustra un micromezclador 51 que incluye una trayectoria circular 53 que conduce a un pasaje de suministro 55, que podría ser un pasaje de entrada que conduce a una cámara de recogida en un sustrato, tal como se ha descrito anteriormente. Un par de canales de entrada 57a y 57b están provistos para suministrar líquidos a la trayectoria circular 53, y el flujo de líquido a través de las trayectorias 55, 57a y 57b está controlado mediante válvulas neumáticas 59. Tres válvulas neumáticas adicionales 61 están situadas en el propio pasaje y constituyen una bomba de tipo peristáltico 63 del tipo descrito anteriormente. La disposición proporciona una manera eficaz de micromezclar dos líquidos en el propio sustrato antes del suministro a una cámara de recogida o similar. Por ejemplo, llenando la trayectoria circular 53 con algún líquido procedente de un canal de entrada 57a y con algún tampón procedente del canal de entrada 57b, el mezclado puede realizarse accionando las tres válvulas 61 en secuencia para bombear el líquido alrededor del anillo provisto en la trayectoria circular; de este modo, el líquido puede mezclarse minuciosamente antes de la descarga a través de un pasaje de suministro 55.

45 La superficie polimérica de la región con pilares con configuración puede derivatizarse de diversas maneras para permitir la unión sobre todas las superficie de agentes de secuestro que son específicos para las células diana deseadas u otras biomoléculas. Por ejemplo, después del tratamiento con plasma y el cierre del sustrato que porta el microcanal, una solución del 1 al 50 % en volumen de un silano con funciones amino (por ejemplo una solución al 10 % de Z-6020 de Dow Corning), o un silano con funciones tio, en etanol puede inyectarse en el microcanal para llenar la región 17 entre las aberturas 15 y 19, y el microcanal inundado 13 puede dejarse incubarse a continuación durante 30 minutos a temperatura ambiente. La derivatización puede realizarse en un polímero no completamente curado, tal como PDMS, antes del cierre de la región del microcanal con la placa. En tal caso, tal como se ha mencionado anteriormente, una alternativa es subcurar ligeramente el sustrato de PDMS y a continuación completar el curado después de fijar la placa de sellado y tratar con el silano sustituido u otro reactivo de funcionalización. Por ejemplo, una etapa de calentamiento final de aproximadamente 90 minutos a de aproximadamente 50 a 90 °C podría usarse para completar el curado después del tratamiento con el Z-6020. Como alternativa, uno o dos días a temperatura ambiente también completarían el curado. Dicho tratamiento de derivatización también puede realizarse antes del cierre de la región del microcanal debido a que la derivatización de la superficie plana enfrentada no es una consecuencia real. La trayectoria de flujo se purga a continuación con etanol, y el microcanal está listo para la unión de los agentes de secuestro de biomoléculas.

60 La expresión agente de secuestro se usa para referirse a material capaz de interactuar de manera específica con una biomolécula diana para secuestrar físicamente a la diana. Estos agentes de secuestro pueden incluir ácidos nucleicos, tales como ADN, ARN y APN que se unen a proteínas; generalmente se emplean agentes de secuestro no de hibridación que comprenden material biológico, tal como proteínas, por ejemplo receptores, péptidos, enzimas, inhibidores de enzimas, sustratos enzimáticos, inmunoglobulinas (particularmente anticuerpos), antígenos, lectinas, proteínas modificadas, péptidos modificados, ADN bicatenario, aminos biógenos y carbohidratos complejos. También pueden usarse moléculas sintéticas, por ejemplo fármacos y ligandos sintéticos diseñados para tener actividad de unión específica de este tipo. Por proteínas o polipéptidos "modificados" se entiende aquellas proteínas

o péptidos que tienen uno o más aminoácidos dentro de la molécula alterados por la adición de nuevos restos químicos, mediante la retirada de restos químicos existentes o mediante alguna combinación tanto de retirada como de adición. Esta alteración puede incluir modificaciones tanto naturales como sintéticas. Las modificaciones naturales pueden incluir, aunque no se limitan a, fosforilación, sulfatación, glucosilación, adición de nucleótidos, y lipidación. Las modificaciones sintéticas pueden incluir, aunque no se limitan a, adaptadores químicos para facilitar la unión al hidrogel, y microestructuras, nanoestructuras, por ejemplo puntos cuánticos (*quantum dots*), u otros materiales sintéticos. Además, la modificación puede incluir la retirada de restos funcionales existentes, por ejemplo grupos hidroxilo, sulfhidrilo o fenilo, o la retirada o alteración de cadenas laterales nativas o la estructura principal de amida polipeptídica. Los ejemplos de carbohidratos complejos incluyen, aunque no se limitan a, oligosacáridos naturales y sintéticos lineales y ramificados, polisacáridos modificados, por ejemplo glucolípidos, peptidoglicanos, glucosaminoglicanos o especies acetiladas, así como oligosacáridos heterólogos, por ejemplo N-acetilglucosamina o especies sulfatadas. Ejemplos de complejos carbohidratos de origen natural son quitina, ácido hialurónico, sulfato de queratina, condroitina sulfato, heparina, celulosa y restos de carbohidratos descubiertos en proteínas modificadas tales como albúmina e IgG. Las combinaciones de dos o más de dichos agentes podrían estar inmovilizadas en los pilares, y dichas combinaciones podrían añadirse como una mezcla de dos entidades o pueden añadirse secuencialmente.

Los agentes de secuestro pueden inmovilizarse directa o indirectamente sobre los pilares, y los pilares pueden pre-tratarse y/o revestirse para facilitar la unión. La inmovilización indirecta se prefiere claramente y contempla el empleo de un agente o sustancia intermedia que se une en primer lugar al pilar; además, puede ser deseable usar pares de acoplamiento para enlazar el agente de secuestro al agente intermedio. Por ejemplo, estreptavidina, o un anticuerpo dirigido contra un anticuerpo de otra especie, podría unirse al agente intermedio, que se acoplaría a continuación a un Ab biotinilado o a un Ab de dicha otra especie. Dicha disposición permite una producción genérica de dichos dispositivos de microflujo que podrían usarse a continuación para capturar diversas células de diferentes muestras o para realizar un enriquecimiento negativo.

El uso de Ab como agentes de secuestro puede preferirse para separación de células, y su unión se describe en las Patentes de Estados Unidos Nº 5.646.404 y 4.675.286 y en toda la técnica anterior. Por ejemplo, procedimientos para unión no covalente se describen en la Patente de Estados Unidos 4.528.267. Procedimientos para unir covalentemente anticuerpos a soportes sólidos también son descritos por Ichiro Chibata en *IMMOBILIZED ENZYMES*; Halstead Press: Nueva York (1978) y en A. Cuatrecasas, *J. Bio. Chem.* 245: 3059 (1970). Kawata et al., *J. Exp. Med.*, 160: 653 (1984) desvela un método para aislar poblaciones de células placentarias detectando células diana usando Ab específicos de células, por ejemplo anticuerpos monoclonales contra trofoblastos humanos (anti-Trop-1 y anti-Trop-2). La Patente de Estados Unidos Nº 5.503.981 identifica tres Ab monoclonales más que pueden usarse para este fin.

El anticuerpo se une preferentemente a las superficies sólidas del pilar indirectamente, tal como mediante el uso de una capa de superficie o un revestimiento de adaptadores largos a los que a continuación se unen los Ab. Por ejemplo, la superficie puede revestirse en primer lugar con un agente bifuncional o polifuncional, tal como una proteína; el agente se acopla a continuación con el anticuerpo usando un agente de acoplamiento, por ejemplo, glutaraldehído. El anticuerpo puede unirse eficazmente también aplicando el anticuerpo en solución acuosa a una superficie que ha sido revestida con una capa que tiene isocianato libre o grupos equivalentes, tales como un isocianato de poliéter, o el anticuerpo podría estar acoplado a un material hidroxilado mediante bromuro de cianógeno. Se prefiere particularmente el uso de una capa de hidrogel a base de poliuretano hidrófilo que tiene grupos de isocianato libres, que se describe a continuación en el presente documento en relación con la figura 9, o el uso de un adaptador hidrófilo de longitud sustancial, tal como uno de PEG, poliglicina, tal como se describe a continuación en el presente documento en relación con la figura 10.

Los agentes de secuestro seleccionados son dirigidos hacia la captura específica de la biomolécula de interés, biomoléculas diana que pueden ser cualquiera de una amplia variedad de células, así como proteínas, virus, carbohidratos y similares; sin embargo, se cree que la invención muestra eficiencias particulares y tiene ventajas particulares en separación de células. Aunque el término "célula" se usa en toda esta solicitud, debe entenderse que incluye fragmentos y/o remanentes de células que llevarían del mismo modo los ligandos de superficie específicos para los agentes de secuestro. Se seleccionan agentes de secuestro apropiados, tal como se conoce en la presente técnica, que tendrían afinidad específica elevada para conseguir dicha especificidad deseada con las biomoléculas diana. Tal como se ha mencionado anteriormente, dichos dispositivos de microflujo también pueden usarse para enriquecimiento negativo dirigiéndolos a células contaminantes conocidas.

Cuando se usa anticuerpos (Ab), estos se unen adecuadamente, preferentemente a través de dichos agentes intermedios, usando cualesquiera mecanismos bien conocidos en la presente técnica. Por ejemplo, los Ab pueden tratarse con 2-aminotiolano para tiolarlos, y los Ab tiolados resultantes se conjugan con pilares que han sido tratados con PEG-maleimida; como alternativa, los Ab pueden unirse de forma covalente directamente a un revestimiento hidrófilo apropiado que tiene grupos isocianato o grupos tiocianato reactivos.

Con los anticuerpos u otros agentes de secuestro en su lugar en toda la región de recogida con pilares con configuración, el dispositivo de microcanal está listo para usarlo. Un fluido corporal, tal como una muestra de sangre

u orina, o algún otro líquido pretratado que contenga la población de células diana, se hace fluir a lo largo de una trayectoria de flujo a través de la región de recogida 17, tal como siendo descargado cuidadosamente desde una bomba de jeringa estándar en un pasaje de entrada 24a que conduce a la entrada 15 para dicho dispositivo de microcanal o arrastrado por una bomba de vacío o similar a su través desde un depósito de muestra proporcionado por un pasaje de entrada de diámetro a relativamente grande 24a que sirve también para contener el volumen deseado de muestra para un ensayo. La abertura 24a puede contener un accesorio (no se muestra) para acoplarse con el tubo conectado a dicha bomba de jeringa cuando ésta se usa. La bomba puede accionarse para conseguir un flujo de aproximadamente 0,5-10  $\mu\text{l}/\text{minuto}$  a través de aparato. Dependiendo del fluido corporal, u otro líquido que contiene células que se va a tratar y/o analizar, una etapa de pretratamiento puede usarse para reducir su volumen y/o para empobrecerlo en biomoléculas no deseadas, tal como se conoce en la presente técnica.

Para incrementar potencialmente la eficacia global de un método de separación de células, puede ser deseable recoger la muestra que sale de la salida 19 y hacer que fluya a través del dispositivo de microcanal más de una vez; dicho tratamiento repetido puede ser particularmente útil cuando las células son particularmente raras y, por lo tanto, son probablemente muy pocas en número en la muestra. Sin embargo, debido a la elevada eficacia de captura conseguida mediante el aparato, se espera que dicho flujo repetido rara vez sea necesario. Como alternativa, podrían usarse dos cámaras de recogida unidas en serie tal como se ha mencionado anteriormente. Además, si están siendo procesados volúmenes algo más grandes de muestras de fluidos corporales, podrían usarse dos o más microcanales en paralelo en un sustrato.

Los agentes de secuestro (por ejemplo Ab) están unidos a la base, la superficie enfrentada, los pilares y las paredes laterales de la región de recogidas en los microcanales; sin embargo, dichas superficies de pared lateral no son particularmente eficaces para capturar células como lo es la base, la superficie enfrentada y los pilares que alteran el flujo. Se ha determinado que el flujo de líquido que contiene células u otras biomoléculas a través de incluso una luz confinada da como resultado que las células estén principalmente presentes en la región de la corriente de flujo central donde el esfuerzo cortante del flujo es el mínimo; como resultado, la captura en las paredes laterales que portan agentes de secuestro es bastante escasa en comparación con la captura sobre superficies en las regiones inmediatas donde los pilares transversales han alterado el flujo directo. En estas regiones, los agentes de secuestro que pueden asumir sus configuraciones tridimensionales nativas como resultado de acoplamiento apropiado son sorprendentemente eficaces.

Una vez completado el flujo de la muestra de líquido a través del dispositivo, las células diana habían, si estuvieran presentes, sido capturadas dentro de la región de recogida, y la purga se lleva a cabo en primer lugar con tampones para retirar todo el biomaterial extraño que hubiera formado parte de la muestra y que no ha sido capturado fuertemente por los anticuerpos u otros agentes de secuestro en la región de recogida. Se espera que dicha purga con tampones eficaces deje solamente las células diana unidas en la región de recogida en el dispositivo de microcanal, habiendo retirado todo el material unido de forma inespecífica.

Una vez que la purga con el tampón se ha completado, si el objetivo del método de tratamiento es la recogida de células en solitario, las células capturadas se liberan a continuación adecuadamente. Tal como se menciona a continuación en el presente documento, en algunos casos, puede desearse que algunos análisis se lleven a cabo *in situ*. Por ejemplo, las células pueden contarse mientras están unidas, o pueden lisarse y a continuación someterse a PCR en la cámara de recogida o aguas abajo.

Cuando se va a realizar la liberación, puede usarse cualquier método conocido en la presente técnica, tal como mecánico (por ejemplo flujo de fluido elevado), químico (por ejemplo cambio de pH) o mediante el uso de agentes de escisión enzimática o similares. Por ejemplo, puede aplicarse un reactivo para escindir el agente de secuestro o para escindir el enlace entre el agente y las células para liberar a las células diana de la región de recogida. Por ejemplo, tripsina o una enzima de enfoque específico puede usarse para degradar los Ab y/o los antígenos de la superficie celular. Métodos específicos tanto para unir Ab o similares como a continuación retirar eficazmente ligandos capturados se describen en la Patente de Estados Unidos N° 5.378.624. Por ejemplo, si las células han sido secuestradas mediante el uso de anticuerpos que son específicos para características de superficie de las células raras, la liberación puede realizarse mediante tratamiento con una solución que contiene tripsina u otra proteasa adecuada, tal como Proteinasa K. Como alternativa, puede usarse una colagenasa para realizar la liberación de otros agentes de secuestro, o un puede usarse adaptador escindible de forma específica para unir el agente de secuestro. Durante dicha escisión, la salida del microcanal está conectada a un depósito u otro colector, y la corriente de descarga que porta las células raras liberadas se recoge para análisis adicional. El dispositivo de microcanal puede estar fabricado con más de un pasaje de salida en la salida y con válvulas para regular qué salida está abierta; esto permite que se use un pasaje para la descarga de desechos durante las etapas preliminares y a continuación un pasaje de salida diferente para dirigir el corriente de células diana a un recipiente de recogida.

Se ha descubierto que la colocación y la forma de los pilares 23 en la región de recogida con pilares con configuración 17 pueden diseñarse para una dinámica de fluidos óptima y una mejora de la captura de células diana a través de sus características superficiales específicas. De forma muy general, en la mayoría de los casos, la forma preferida de la sección transversal horizontal de los pilares fijos transversales 23 evita ángulos afilados que podrían promover la unión inespecífica a las superficies transversales de los pilares. Los pilares 23 tienen superficies

exteriores rectilíneas y tienen preferentemente una forma de sección transversal generalmente circular o de polígono regular de 6 o más lados. Formas alternativas que podrían usarse son forma de lágrima donde la punta está en el extremo aguas abajo y ligeramente curvada, o forma oval; sin embargo, si se desea más impacto, podría usarse una forma cuadrada. La configuración de los pilares debe crear una configuración de flujo en la corriente de líquido que mejore la captura de células diana por los agentes de secuestro unidos a las superficies de los pilares, la base y la superficie enfrentada. Para conseguir este fin, se ha descubierto que los pilares deben ser de diferentes tamaños y estar dispuestos en una configuración aleatoria establecida. Sorprendentemente, una configuración aleatoria de pilares 23 de diferentes tamaños de sección transversal, por ejemplo pilares de sección transversal circular de al menos aproximadamente 3 ó 4 tamaños diferentes, de aproximadamente 70 a aproximadamente 130 micrómetros de diámetro, en una región de recogida de aproximadamente 100 micrómetros de alto y de aproximadamente 2 a 4 mm de ancho, parece promover una captura particularmente eficaz de células a partir del flujo de una muestra de líquido, cuando el espacio de separación mínimo entre pilares es de 50 a 70  $\mu\text{m}$  y preferentemente de aproximadamente 60  $\mu\text{m}$ .

Se prefiere particularmente que el área de sección transversal de los pilares, que tienen paredes laterales formadas por líneas paralelas que son perpendiculares a la base, sea tal que ocupen entre y de aproximadamente el 15 al 25 % del volumen de la región de recogida. Preferentemente la configuración de los pilares será tal que ocupen aproximadamente el 20 % del volumen de la región de recogida, dejando un volumen vacío para el flujo de líquido de aproximadamente el 80 %. La configuración aleatoria particular de ubicaciones de pilares mostrada en la figura 2 parece mejorar particularmente la tendencia de las células a ser capturadas por los agentes de secuestro en estas regiones donde el flujo directo ha sido alterado eficazmente. Los pilares 23 están sustancialmente separados entre sí, por ejemplo por al menos aproximadamente 60 micrómetros, y pilares de diferentes tamaños están ubicados preferentemente aguas arriba y aguas abajo unos con respecto a otros.

Pilares más pequeños pueden crear regiones de remolino aguas abajo de pilares más grandes, y como resultado de la configuración de flujo que se genera, las superficies en las proximidades, y particularmente la superficie inferior de la región de recogida, mostrarán una eficacia particular para capturar células diana. Tal como se muestra en la figura 2, cualquier línea recta que se extienda longitudinalmente con respecto a la trayectoria de flujo en una ubicación a más de aproximadamente 100 micrómetros de una pared lateral intersectará con una pluralidad de pilares. Tal como se ha mencionado anteriormente, los pilares constituyen una pieza con la superficie de base 20 del sustrato y están preferentemente fijados en sus extremos opuestos o libres a la superficie enfrentada, es decir una placa de regulación de flujo 25 o una placa de cierre plana 27.

Tal como se ha indicado anteriormente, los agentes de secuestro, tales como anticuerpos, pueden unirse en toda la región de recogida de tal manera que sean capaces de funcionar de forma más eficaz revistiendo las superficies con (a) una fina capa de una sustancia de hidrogel hidrófilo particular o (b) adaptadores hidrófilos, tales como PEG, poliglicina o similares de un peso molecular de al menos aproximadamente 1.000 daltons, que tienen preferentemente un PM de aproximadamente 2.000 a 100.000 daltons, y más preferentemente entre aproximadamente 3.000 y 50.000 daltons. Se prefiere particularmente el empleo de (a), es decir el revestimiento de hidrogel permeable hidrófilo que es un polímero funcional con isocianato que contiene PEG, PPG o un copolímero de los mismos que se polimeriza mediante enlaces de uretano y que contiene grupos de isocianato reactivos. Un hidrogel preferido utiliza una molécula de PEG de tres ramas de peso molecular de aproximadamente 6.000 que se crea mediante la adición de óxido de etileno a glicerol. El poliol resultante se hace reaccionar con diisocianato de isoforona y trimetilol propano para preparar un prepolímero. Una mezcla del prepolímero con tampón, disolvente y otros componentes apropiados para una aplicación particular se reticula *in situ* sobre superficies de la región de recogida en el dispositivo de microflujo. En la figura 8 se muestra esquemáticamente una representación de una región de recogida dentro de un microcanal en el que hay una pluralidad de pilares 61 de diámetro variable que están dispuestos aleatoriamente para alterar el flujo directo a través de la cámara, en la que cada uno de los pilares 61 y las superficies planas enfrentadas porta un revestimiento exterior 63. Los agentes de secuestro 65 en forma de anticuerpos se representan estando unidos a los revestimientos de hidrogel permeable hidrófilo sobre los pilares; como resultado, conservan su conformación tridimensional nativa, inalterada por la unión al hidrogel que es principalmente agua y, por lo tanto, bastante deformable.

La figura 9 se proporciona como una representación esquemática de química que puede emplearse cuando se usa un revestimiento de hidrogel permeable hidrófilo 49 del carácter preferido, tal como en la figura 8. Se muestran secuencias representativas de unión de agentes de secuestro, es decir, anticuerpos, a todas las superficies por toda la región de recogida. El punto 1 de la figura 9 muestra una superficie después de derivatización con amino mediante tratamiento con un aminosilano o similar. A esta etapa le sigue el uso de leche desnatada para revestir con caseína las superficies, véase el punto 2. El punto 3 representa la superficie revestida después de que se ha llevado a cabo el revestimiento. Un prepolímero que contiene PEG de un peso molecular de aproximadamente 3400 que está rematado en el extremo con diisocianato de tolueno se disuelve en un disolvente orgánico miscible en agua, preferentemente un disolvente aprótico tal como una mezcla de NMP y  $\text{CH}_3\text{CN}$ . El polímero preferentemente contiene tri- o polioles funcionales superiores, por ejemplo PEG y PPG, y puede contener isocianato trifuncional. A continuación se prepara una solución acuosa que contiene aproximadamente el 98,5 por ciento en peso de agua, solución que es bombeada a través del microcanal de modo que las superficies de los pilares y las superficies enfrentadas de la región de recogida queden revestidas con este revestimiento de hidrogel hidrófilo, como resultado

de la reacción de algunos de los grupos rematados en el extremo con isocianato en las superficies derivatizadas con amina. El resultado final se representa en el punto 3 en la figura 9, que en este caso es un hidrogel que se crea como resultado de la reacción inicial con agua y después la formación de enlaces urea.

5 El punto 4 representa la adición de anticuerpos que tendrán grupos amino en superficie. Pueden unirse directamente a dichos revestimientos de hidrogel permeable hidrófilo de los pilares, tal como se muestra en el punto 5, mediante unión covalente de las aminas de los Ab a grupos isocianato o tiocianato portados por el revestimiento hidrófilo. Como alternativa, los anticuerpos pueden tiolarse en primer lugar tal como se representa en el punto 6 de la figura 9, y estos anticuerpos tiolados se suministran a continuación en solución acuosa a las cámaras de recogida, donde se unirán fácilmente, a su vez, covalentemente a los grupos isocianato de los polímeros revestidos, véase el punto 7.

10 Tal como se representa en los puntos 8 y 9 en la figura 9, cuando las células en una muestra de líquido a la que se le está haciendo fluir a través de la cámara de recogida, como resultado del flujo directo alterado, entran en contacto con los pilares y/o las superficies enfrentadas, los antígenos en las superficies celulares específicos para los anticuerpos se vuelven conjugados a ellos, capturando eficazmente a las células.

15 La figura 10 se proporciona como una representación esquemática de química que puede emplearse cuando un polímero lineal de PEG o PPG alargado, en lugar de un hidrogel, se usa para ligar un agente de secuestro, particularmente un anticuerpo, a las superficies en una región de recogida. El polímero lineal se selecciona para ser de una longitud tal que el anticuerpo sea capaz de asumir su configuración tridimensional nativa en un entorno acuoso donde se está llevando a cabo la captura. El punto 1 de la figura 10 muestra la superficie después de la derivatización con amino mediante tratamiento con un aminosileno o similar. Esta etapa viene seguida de nuevo por el uso de sólidos de leche desnatada para revestir con caseína las superficies, tal como se ha descrito anteriormente. Después del lavado, todas las superficies se tratan con un PEG o PPG lineal que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 2000, y preferentemente al menos aproximadamente 3000, que tiene un resto de NHS en un extremo y un resto de maleimidilo en el extremo opuesto. El resto de éster de N-hidroxi-succinimidilo reacciona fácilmente con los grupos amino en las superficies para proporcionar un revestimiento de al menos aproximadamente 1 micrómetro de grosor. Después de la incubación adecuada, el microcanal se drena y se lava con un tampón adecuado, dejando a las superficies revestidas con maleimido-PEG tal como se representa mediante el punto 3 de la figura 10. El punto 4 representa anticuerpos que son específicos para trofoblastos y que tienen inherentemente grupos amino en superficie. Los anticuerpos se tiolan preferentemente usando un reactivo adecuado, tal como el reactivo de Traut, hasta alcanzar el punto representado como punto 5 en la figura 10. El anticuerpo tiolado se conjuga a continuación con los pilares revestidos con maleimido-PEG mediante introducción del anticuerpo tiolado purificado en el microcanal en una solución tamponada y permitiéndole incubarse adecuadamente. El microcanal se lava a continuación con un tampón adecuado, y se obtiene la disposición conjugada representada como el punto 6.

35 El punto 7 de la representación esquemática de la figura 10 muestra la captura de un trofoblasto mediante un anticuerpo que está ligado a una superficie mediante el agente de acoplamiento de PEG lineal.

40 Una construcción alternativa más preferida de un aparato de microflujo se ilustra en las figuras 12-15. Se muestra el dispositivo de microflujo 71 que se parece al mostrado en las figuras 1-3, pero que está construido para aprovechar la gravedad para crear un flujo uniforme, para mejorar el contacto entre un líquido que está siendo tratado y las superficies interiores del dispositivo en la región de recogida, y para minimizar la unión de las células diana en regiones fuera de la cámara de recogida, tales como la entrada y la salida. A este respecto, el aparato está diseñado para su uso inclinado a un ángulo de entre aproximadamente 30° y 60° con respecto a la horizontal, preferentemente a aproximadamente 45°. Por consiguiente, el dispositivo incluye un cuerpo o sustrato 73 que incluye un microcanal 75 que se extiende a su través desde un pasaje de entrada 77 hasta un pasaje de salida 79, con una región de recogida 81 que está ubicada entre ambos que incluye una región de entrada 83 y una región de salida 85 como anteriormente. La región de recogida 81 está formada como un hueco o una cavidad en una superficie plana 87 del cuerpo, y la propia región de recogida tiene una superficie de base plana 89 que es sustancialmente paralela a la superficie 87 del cuerpo. Una pluralidad de pilares 91, tal como se ha descrito anteriormente, se extienden desde la superficie de base 89, perpendiculares a ella, al nivel de la superficie plana del cuerpo 87, junto con divisores de flujo en las regiones de entrada y de salida.

55 Excepto por la orientación de los pasajes de entrada y de salida 83, 85, la construcción del dispositivo 71 es esencialmente la misma que la descrita anteriormente en el presente documento con respecto a aquellos dispositivos representados en las figuras 1-5. Tal como se muestra en las figuras 12 y 14, la cavidad que constituye el microcanal 75 está cerrada con una placa maciza plana 93 que es preferentemente de mayores dimensiones que el cuerpo 73 para facilitar el manejo del aparato completado durante el tratamiento y el análisis de una muestra de líquido. La placa de cierre plana 93 puede estar hecha de vidrio o un material polimérico impermeable adecuado, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La placa 93 puede estar revestida con una capa del mismo material polimérico que aquel a partir del cual se cuele, se moldea o se construye adecuadamente de otra forma el cuerpo. Más preferentemente, se usa un polímero de PDMS, y si se usa un cubreobjetos de vidrio convencional de aproximadamente 25 mm por 75 mm, éste puede estar revestido con una capa o una película fina 95 de PDMS, tal como se indica en la figura 12. La unión de la placa de cierre 93 podría fijar su superficie plana a las

superficies del extremo de los pilares 91, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento, o simplemente se les podría dejar que topen sustancialmente.

Tal como se ve de la mejor manera en la figura 14, el pasaje de entrada 77 está alineado en un ángulo agudo de 30° y 60° con respecto a la superficie de la cara plana del microcanal que es paralela a la trayectoria de flujo a su través; más preferentemente a un ángulo de entre 40° y 50° y de la forma más preferente a aproximadamente 45° con respecto a ésta. Esta disposición permite que la muestra de suministro sea suministrada verticalmente hacia abajo al interior del aparato de microflujo 71, tal como se muestra esquemáticamente en la figura 15, con el aparato sujeto a lo largo de su borde superior a la superficie oblicua de una base 96 mediante una placa 98 de modo que la trayectoria de flujo a su través está inclinada con respecto a la vertical, por ejemplo a aproximadamente 45°. Por lo tanto, la muestra de suministro llenará la ancha región de entrada 83 a la región de recogida 81, y la gravedad ayuda a mantener la región de recogida, donde están ubicados los pilares, llena y promoviendo un flujo lento y uniforme deseado a su través. De forma más importante, dado que el flujo de líquido será de forma lineal a través de la cámara en una dirección paralela a las superficies superior e inferior, y dado que las células son más pesadas que el tampón acuoso líquido en el que están siendo transportadas, la gravedad creará un vector de fuerza sobre estas células diferente del vector de flujo del líquido de transporte. Como resultado, además de la alteración de flujo directo que se crea mediante la configuración aleatoria de pilares de diferentes tamaños en la región de recogida, existe un vector adicional que hace que las células escapen de la corriente de flujo y se adhieran a una superficie mediante unión a un agente de secuestro. Se ha descubierto que este efecto mejora sustancialmente la recogida de células incluso cuando existe un flujo relativamente lento a través de la región de recogida.

Los pasajes de entrada y de salida 77, 79 están ubicados preferentemente en el mismo plano vertical, y la orientación del pasaje de salida es, preferentemente, a aproximadamente 90° con respecto a éste. Por lo tanto, cuando el aparato 71 está sujeto a la base 96, tal como se muestra en la figura 15, con el pasaje de entrada 77 vertical, el pasaje de salida 79 es horizontal. Esto permite que la muestra que contiene las células y otros biomateriales a los que no se han unido los Ab salgan horizontalmente, facilitando de este modo su retirada y minimizando la unión inespecífica dentro del canal de flujo y la sedimentación en la región de salida.

La figura 15 también representa el método preferido actualmente de ejecución de un tratamiento en el que una muestra se suministra verticalmente al interior del pasaje de entrada al aparato de microflujo, y el pasaje de salida 79 está conectado mediante tubos adecuados al lado de succión de una bomba de jeringa o similar, lo que a continuación facilita el flujo de muestra a través del aparato al caudal deseado. El caudal se controla cuidadosamente de modo que la muestra de líquido se retira a un ritmo tal que la velocidad promedio de flujo de líquido en la región de recogida está entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 1 mm/segundo, preferentemente entre aproximadamente 0,2 y aproximadamente 0,8 mm/segundo y más preferentemente entre aproximadamente 0,25 y aproximadamente 0,5 mm/segundo, que se ha descubierto que maximiza la captura de las células diana como resultado de la alteración del flujo de los pilares y los vectores de fuerza resultantes de la gravedad. Se ha descubierto que mayores velocidades son menos eficaces y pueden dañar a las células delicadas que podrían buscarse. Aunque el aparato se ilustra en su forma más sencilla, debe entenderse que diversas válvulas y componentes auxiliares, tal como se conocen en estos dispositivos de MEMS y tal como se ha descrito en general anteriormente en el presente documento, pueden incorporarse junto con el dispositivo de microflujo 71.

Los siguientes ejemplos ilustran el uso eficaz de dispositivos de microcanal prototipos de este tipo para secuestrar células de trofoblastos de un extracto de moco del cuello uterino. El método global se perfila en el diagrama de flujo adjunto como la figura 11. Debe entenderse, por supuesto, que los ejemplos son meramente ilustrativos de solamente ciertas realizaciones de la invención y que no constituyen limitaciones al alcance de la invención que está definido por las reivindicaciones que se adjuntan al final de esta descripción.

### Ejemplo 1

El dispositivo de microflujo para separar biomoléculas se construye usando un sustrato prototipo tal como se ilustra en general en la figura 1. El sustrato está formado por PDMS y está unido a una placa de vidrio plana para cerrar el canal de flujo. Las superficies interiores a través de la región de recogida se derivatizan incubando durante 30 minutos a temperatura ambiente con una solución al 10 % en volumen de Z-6020 de Dow Corning. Después de lavar con etanol, son tratadas con leche desnatada a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora para producir un fino revestimiento de caseína. Después de lavar con etanol al 10 % en agua, se realiza un tratamiento para revestir el interior con un hidrogel permeable formado a partir de un prepolímero de trioles de PEG rematados con isocianato, PM promedio de 6000, usando 1 parte en peso de prepolímero con respecto a 6 partes de disolvente orgánico, es decir acetonitrilo y DMF, y mezclándolo con agua y haciéndolo fluir a través del canal, tal como se ha descrito con respecto a la figura 9.

Para este ensayo, se desea aislar trofoblastos de una muestra de moco del cuello uterino, y se seleccionan anticuerpos para Trop-1 y Trop-2 que son específicos para ligandos portados por las superficies exteriores de trofoblastos que son de origen fetal. Se disolvió anticuerpo (0,1 mg) en 100 µl de borato sódico 0,2 M/NaCl 0,15 M que contenía EDTA 5 mM (pH 8,3) y se hizo reaccionar con 5 µl de reactivo de Traut 40 mM a temperatura ambiente durante una hora para realizar la tiolación. El exceso de reactivo de Traut se hace reaccionar con 10 µl de glicina

100 mM seguido por la purificación del anticuerpo tiolado sobre la membrana del dispositivo Centricon-30™. La tiolación se confirmó mediante procedimientos de laboratorio convencionales.

5 Aproximadamente 5 microgramos en total del anti-Trop-1 y 2 tiolado en solución acuosa, a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml, se suministran al dispositivo de microflujo pretratado, y la solución se deja incubar durante 2 horas a 25 °C. Después de este periodo de incubación, el canal de flujo se lava abundantemente con PBS/BSA al 1 % para dar superficies revestidas de anticuerpo que a continuación se usaron para intentar aislar células de trofoblastos fetales.

10 Se diluyó moco del cuello uterino de mujeres embarazadas (8-12 semanas de gestación) a 10 ml con medio de HAM (InVitrogen) y se trató con ADNsa (120 unidades) a 37 °C durante 30 minutos. Después de filtrar a través de un colador celular de 100 µm, las células se centrifugaron a 1500 RPM durante 30 minutos. El sedimento celular se resuspendió en medio de HAM (100 µl) y se hizo pasar a través del microcanal revestido con Trop-1 y Trop-2 enganchando el dispositivo de separación de microflujo al tubo de salida desde una bomba de jeringa de Harvard  
 15 Apparatus que se llena con aproximadamente 50 microlitros de esta suspensión celular de extracto de moco del cuello uterino. La bomba de jeringa es accionada para producir un flujo continuo lento del líquido de muestra a través del dispositivo de microflujo a temperatura ambiente a una velocidad de aproximadamente 10 µl/min. Durante este periodo, los Ab Trop-1 y Trop-2, que se han unido a las superficies en la región de recogida donde está ubicado la configuración aleatoria de pilares transversales, capturan trofoblastos que están presentes en la muestra. Después  
 20 de que toda la muestra ha sido suministrada por la bomba de jeringa, se lleva a cabo un lento lavado abundante con un tampón acuoso de PBS/BSA al 1 %. Aproximadamente 100 µl de este tampón acuoso se suministra a través del dispositivo a lo largo de un periodo de aproximadamente 10 minutos, lo que retira eficazmente todo el biomaterial unido de forma inespecífica del canal de flujo en el dispositivo. A continuación se llevan a cabo dos lavados adicionales, cada uno con aproximadamente 100 µl del PBS al 1 % más BSA al 1 % durante un periodo de  
 25 aproximadamente 10 minutos.

En este momento, en la medida en que el dispositivo está hecho de material ópticamente transparente, puede realizarse un examen microscópico de los efectos de la captura, tal como usando microfotografía. Las células unidas se tiñeron con citoqueratina 7 y citoqueratina 17 que son específicos para células capturadas que son de origen  
 30 trofoblástico. Contando células en dichas microfotografías, se estima que sustancialmente el 97 % de los trofoblastos que se estima que están presentes en la muestra han sido capturadas en la región de recogida con pilares con configuración, lo que se considera que es un resultado realmente excelente.

En una repetición de este procedimiento a través de las etapas de captura y lavado, en lugar de teñir *in situ*, los trofoblastos capturados se liberan haciendo que una solución de 100 µl de una solución al 0,25 % de tripsina fluya lentamente a través del canal de flujo a 27 °C durante un periodo de 20 minutos. Este reactivo causa la digestión de los Ab, liberando los trofoblastos el interior del flujo acuoso donde pasan a través de la salida y son recogidos. El análisis de las células recogidas mediante tecnologías basadas en PCR y FISH muestra que son, de hecho, los trofoblastos los que pueden ser las dianas para los Ab que se emplearon.  
 40

## Ejemplo 2

Otro dispositivo de microflujo para separar biomoléculas se construye usando un sustrato prototipo tal como se describe en el ejemplo 1. Las superficies interiores del sustrato se derivatizan, se lavan con etanol y se tratan con leche desnatada tal como en el ejemplo 1. Después del lavado con etanol al 10 % en agua, se realiza un tratamiento usando el prepolímero, BSA y anticuerpos Trop-1 y Trop-2 en tampón borato. Se usan 1 mg/ml de solución acuosa de anticuerpo en borato sódico 100 mM a pH 8,0 que contenía BSA. La formulación específica comprende 100 mg del mismo prepolímero en Acn/DMF; 350 µl de mezcla de anticuerpo a 0,25 mg/ml en tampón borato; y 350 µl de BSA a 1mg/ml en tampón borato, y contiene aproximadamente el 2 % en peso de polímero.  
 50

Los anticuerpos no están tiolados, y aproximadamente 5 microlitros en total de la solución en hidrogel acuosa de Trop-1 y 2 se suministran al dispositivo de microflujo pretratado. La solución se deja incubar durante aproximadamente 30 minutos a 25 °C, y después de este periodo de incubación, el canal de flujo se lava abundantemente con aceite mineral que se empuja lentamente al interior del canal de flujo para desplazar y empujar fuera el exceso de hidrogel. Esto da como resultado un canal de flujo lleno de aceite que tiene una fina capa de revestimiento de hidrogel que separa el aceite del material de PDMS. Después de 3 horas, el hidrogel se ha curado completamente, y el aceite se elimina lavando con una solución 1x PBS/Tween al 0,1 %. El dispositivo se llena a continuación con solución 1x PBS para preservar los Ab.  
 55

Moco del cuello uterino de mujeres embarazadas se diluye, se trata, se filtra, se centrifuga y se resuspende en 100 µl de medio de HAM. La muestra de suspensión celular líquida se hace pasar a través del microcanal revestido con Trop-1 y Trop-2 usando una bomba de jeringa de Harvard Apparatus, tal como en el ejemplo 1. Después de que toda la muestra es suministrada por la bomba de jeringa, se lleva a cabo un lento lavado abundante con un tampón acuoso de PBS/BSA al 1 %. Aproximadamente 100 µl de este tampón acuoso se suministran a través del dispositivo durante un periodo de aproximadamente 10 minutos para retirar eficazmente todo el biomaterial unido de forma  
 60

inespecífica del canal de flujo en el dispositivo. A continuación se llevan a cabo dos lavados adicionales, cada uno con aproximadamente 100 µl de PBS al 1 % más BSA al 1 % durante un periodo de aproximadamente 10 minutos.

A continuación se realiza un examen microscópico de los efectos de la captura usando microfotografía, después de teñir las células unidas con citoqueratina 7 y citoqueratina 17. Contando las células en dichas microfotografías, se determina que se consigue una excelente captura de los trofoblastos que se estima que están presentes en la muestra.

### Ejemplo 3

Otro dispositivo de microflujo para separar biomoléculas se construye usando un sustrato prototipo tal como se describe en el ejemplo 1. Las superficies interiores del sustrato se derivatizan, se lavan con etanol, y se tratan con leche desnatada tal como en el ejemplo 1.

Después del lavado con etanol al 10 % en agua, se realiza un tratamiento usando 10 µl de NHS-policiglicina 2,5 mM (PM promedio de aproximadamente 4500) en 0,2 MOPS/NaCl 0,5 M, pH 7,0, incubando a temperatura ambiente durante 2 horas con bombeo suave de la solución atrás y adelante en el canal para proporcionar agitación. El microcanal se lava tres veces con 500 µl de tampón MOPS a pH 7,0 para obtener canales revestidos de maleimido-poliGly.

Los anticuerpos Trop-1 y Trop-2, que son específicos para ligandos portados por las superficies exteriores de los trofoblastos se tratan tal como en el ejemplo 1 para tiolarlos.

Aproximadamente 5 microgramos en total de anti-Trop-1 y 2 tiolados en solución acuosa, a una concentración de aproximadamente 0,25 mg/ml, se suministran al dispositivo de microflujo pretratado, y la solución se deja incubar durante 2 horas a 25 °C. Después de este periodo de incubación, el canal de flujo se lava abundantemente (3 veces) con un 1 % de PBS/BSA para proporcionar las superficies revestidas de anticuerpo que a continuación se usan para intentar aislar células de trofoblastos fetales.

Moco del cuello uterino de mujeres embarazadas se diluye, se trata, se filtra, se centrifuga y se resuspende en 100 µl de medio de HAM. La muestra de suspensión celular líquida se hace pasar a través del microcanal revestido de Trop-1 y Trop-2 usando una bomba de jeringa de Harvard Apparatus. Después de que toda la muestra es suministrada por la bomba de jeringa, se lleva a cabo un lento lavado abundante con un tampón acuoso de PBS/BSA al 1 %. Aproximadamente 100 µl de este tampón acuoso se suministran a través del dispositivo durante un periodo de aproximadamente 10 minutos para retirar eficazmente todo el biomaterial unido de forma inespecífica del canal de flujo en el dispositivo. Dos lavados adicionales se llevan a cabo a continuación, cada uno con aproximadamente 100 µl de PBS al 1 % más BSA al 1 % durante un periodo de aproximadamente 10 minutos.

A continuación se realiza un examen microscópico de los efectos de la captura usando microfotografía después de teñir las células unidas con citoqueratina 7 y citoqueratina 17. Contando las células en dichas microfotografías, se determina que se consigue una buena captura de los trofoblastos que se estima que están presentes en la muestra.

### Ejemplo 4

Una pluralidad de dispositivos de microflujo, similares a los empleados en el ejemplo 1 y tal como se muestra en la figura 3, se forman para poner a prueba la mejora que resulta del funcionamiento a 45° en oposición a la horizontal. La eficacia mejorada de dicho dispositivo de microflujo dispuesto de forma angular 71 se ensaya empleando un líquido de suministro que emplea una mezcla de células BeWo y Jurkat. Las células BeWo se seleccionan debido a que expresan antígenos de Trop-1 y Trop-2, mientras que las células Jurkat no expresan ninguno y, por lo tanto, sirven como células de control negativo. La superficie interior del dispositivo de microflujo 71 se pretrata y a continuación se reviste con un hidrogel permeable tal como se describe en el ejemplo 2 usando Anti-Trop-1 y Anti-Trop-2 en solución acuosa en la formulación de revestimiento. El interior del dispositivo de microflujo se llena con la solución de revestimiento de Ab y se le permite incubar durante aproximadamente 30 minutos a 25 °C. Se lleva a cabo un lavado abundante usando aceite mineral y a continuación tampón PBS tal como en el ejemplo 2.

Se prepara suficiente solución de suministro de ensayo para seis series del ensayo; ésta contiene aproximadamente 3.000 células BeWo y aproximadamente 3.000 células Jurkat en un tampón BSA/PBS al 1 %. La solución de suministro se divide en seis partes alícuotas, con cada una de las partes alícuotas conteniendo aproximadamente 500 células BeWo y aproximadamente 500 células Jurkat. Tres de los dispositivos de microflujo idénticos 71 se disponen horizontalmente, y se hace fluir a una parte alícuota del líquido de suministro de células mixtas a través de cada uno como resultado de la succión suministrada por una bomba de vacío. Se usan tres caudales diferentes para los tres dispositivos de ensayo: caudales de 1 µl/min, de 5 µl/min y de 10 µl/min.

Después del flujo a través de estos tres dispositivos de ensayo, se llevó a cabo el lavado con un tampón de PBS, y cada dispositivo individual se examinó a continuación mediante microscopía. Cada uno de los dos grupos de células

capturadas se contó por separado de forma manual mediante microscopía. Con respecto a las células BeWo diana, se descubrió que, al caudal más bajo, aproximadamente el 47 % de las células BeWo fueron capturadas en la región de entrada y solamente aproximadamente el 32 % en el canal de recogida, con el resto residiendo en la región de salida. Al caudal de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ , el porcentaje de células BeWo capturadas en la región del canal de recogida caía ligeramente a aproximadamente el 27 % y, aunque se seguían capturando más células en la región de entrada, el porcentaje mayor de células recogidas en la región de salida. Al caudal más elevado a través del dispositivo en la orientación horizontal, solamente el 10 % de las células BeWo son capturadas en la región del canal de recogida, mientras que aproximadamente el 65 % de las células se recogen en la región de salida. Con respecto a las células Jurkat, al caudal más bajo, aproximadamente el 20-25 % de las células se capturaron en cada una de las regiones de entrada y del canal, y al caudal medio, solamente aproximadamente el 10 % de las células Jurkat fueron capturadas en la región del canal de recogida. Tal como se esperaba, la cantidad de estas células que se recogen en la región de salida aumenta con cada aumento de caudal, donde todas las células que no están retenidas en el dispositivo se recogen como una mezcla.

El experimento se realiza a continuación usando tres dispositivos de microflujo idénticos más, con cada uno orientado a 45° desde la vertical. En este momento, se usan caudales de 1, 3 y 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . La mejora en la captura de células deseadas de células BeWo en la región del canal de recogida es sorprendente. Al caudal más bajo, aproximadamente el 75 % de las células BeWo son capturadas ahora en la región del canal de recogida. Este valor aumenta hasta aproximadamente el 82 % al caudal medio de 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ , y permanece a aproximadamente el 60 % al caudal más elevado ensayado de 5  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Por otro lado, aunque la unión inespecífica de las células Jurkat en la región de recogida es relativamente alta al caudal más bajo, es decir aproximadamente al 45 %, cae a solamente aproximadamente el 15 % a 3  $\mu\text{l}/\text{min}$ , y menos del 5 % al caudal más elevado. Por consiguiente, la mejora de rendimiento a la orientación a 45° frente a la horizontal es muy sustancial cuando funciona a caudales de aproximadamente 3-5  $\mu\text{l}/\text{min}$ , recogiendo más del 80 % de las células en lugar de solamente aproximadamente el 27 %. Los cálculos muestran que, funcionando a un caudal que es igual a una velocidad a través de la región de la cámara de recogida de aproximadamente 0,27 mm/segundo, se obtiene un excelente recogida de las células diana, con una contaminación mínima por células unidas de forma inespecífica.

Aunque la invención se ha descrito con respecto a ciertas realizaciones preferidas que constituyen el mejor modo conocido actualmente por el inventor para llevar a cabo esta invención, debe entenderse que diversos cambios y modificaciones tal como sería obvio para un experto en la materia pueden realizarse sin alejarse del alcance de la invención que se define en las siguientes reivindicaciones. Por ejemplo, aunque se han descrito ciertos materiales preferidos para la fabricación de la sustancia en la que están definidos los microcanales, existe un amplio intervalo de materiales estructurales que pueden emplearse tal como se conoce bien en la presente técnica siendo adecuados para dispositivos de laboratorio tales como este. Aunque generalmente se ha hecho hincapié en la separación de células fetales de una muestra de sangre materna o trofoblastos de un extracto de moco del cuello uterino, debe entenderse que la invención es útil para separar una amplia diversidad de células de sangre, por ejemplo eritrocitos nucleados, linfocitos y similares, células madre metastásicas, células madre, etc.; además, otros materiales biológicos, por ejemplo proteínas, carbohidratos, virus, etc., también podrían separarse de una muestra de líquido. Cuando la muestra contiene subpoblaciones específicas de células, las células diana a capturar pueden ser un grupo de células no deseadas a separar de las células raras o similares. Además, una vez que las células diana se han recogido, también pueden lisarse *in situ* para proporcionar el ADN celular, que puede recogerse para análisis aguas abajo o, como alternativa, someterse a PCR dentro de la cámara de recogida. La solicitud publicada de Estados Unidos 2003/0153028 enseña el lisado de dichas células unidas para obtener el ácido nucleico que se libera. Si hay dos subpoblaciones diferentes de células diana en una muestra, pueden unirse diferentes agentes de secuestro a los pilares en un par cámaras de recogida aguas arriba y aguas abajo. En otra situación, un género de células puede recogerse en primer lugar en una cámara de recogida aguas arriba, liberarse y a continuación cribarse de nuevo en una cámara aguas abajo para aislar un subgénero de células.

**REIVINDICACIONES**

1. Un aparato de microflujo que comprende:

5 un cuerpo (11) que tiene una trayectoria de flujo que comprende un medio de entrada (15), un medio de salida (19) y un microcanal (13), que tiene una región de recogida (17) que se extiende entre dichos medios de entrada y de salida,  
 en el que dicha región de recogida (17) incluye una pluralidad de pilares verticales (23) sustancialmente  
 10 perpendiculares a una superficie de base (22) y alineados transversales a la trayectoria de flujo y dispuestos en una configuración de matriz irregular y aleatoria por toda la anchura de la región de recogida de modo que no pueda haber ningún flujo en línea recta a través de la región de recogida y que corrientes de flujo directo sean alteradas, constituyendo los pilares una pieza integral con la superficie de base (22) de dicho microcanal y proyectándose desde éste,  
 15 en el que el volumen total de dichos pilares es del 15 % al 25 % del volumen total de dicha región de recogida (17).

2. El aparato de la reivindicación 1, en el que dicha configuración aleatoria de pilares (23) comprende pilares de diferentes tamaños de sección.

20 3. El aparato de la reivindicación 1, en el que dichos pilares (23) tienen de 70 µm a 130 µm de diámetro.

4. El aparato de la reivindicación 1, en el que la distancia mínima entre dos de dichos pilares (23) es de 50 µm a 70 µm.

25 5. El aparato de la reivindicación 1, en el que el aparato de microflujo está inclinado con respecto a la horizontal.

6. El aparato de la reivindicación 1, en el que el cuerpo (11) tiene una superficie plana (27) y el microcanal (13) está ubicado en una cavidad del cuerpo por debajo de la superficie plana.

30 7. El aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de dicho microcanal (13) está revestido con una capa de hidrogel permeable hidrófilo.

8. El aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de dicho microcanal (13) está revestida con una capa de hidrogel permeable hidrófilo que comprende un polímero de PEG, PPG con una función de isocianato o un copolímero de los mismos que se polimeriza mediante enlaces uretano y que contiene grupos isocianato reactivos.  
 35

9. El aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de dicho microcanal (13) está revestida con un agente de secuestro.

40 10. El aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de dicho microcanal (13) está revestida con un agente de secuestro seleccionado entre el grupo constituido por ácido nucleico, proteína, receptores, péptidos, enzimas, inhibidores de enzimas, sustratos enzimáticos, inmunoglobulinas, antígenos, lectinas, proteínas modificadas, péptidos modificados, ADN bicatenario, aminas biógenas y carbohidratos complejos.

45 11. El aparato de la reivindicación 1, en el que un agente de secuestro está acoplado a la superficie de dicho microcanal (13) mediante un adaptador.

12. El aparato de la reivindicación 1, en el que un agente de secuestro es un anticuerpo acoplado a la superficie de dicho microcanal (13) mediante un adaptador hidrófilo o una capa de hidrogel que tiene grupos isocianato libres.  
 50

13. El aparato de la reivindicación 1, en el que dicho medio de entrada incluye un pozo de suministro capaz de contener una muestra de líquido.

55 14. El aparato de la reivindicación 1, en el que dicho microcanal (13) se sella con una placa (27) fijada a los extremos libres de dichos pilares (23).

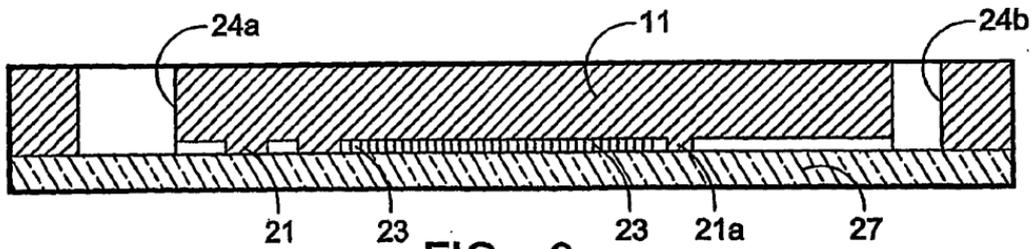
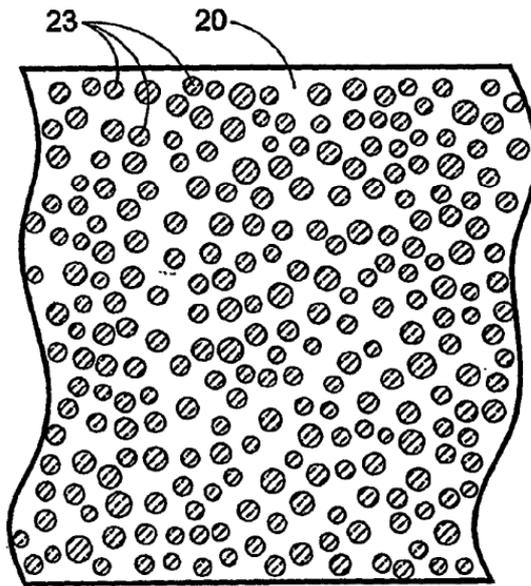
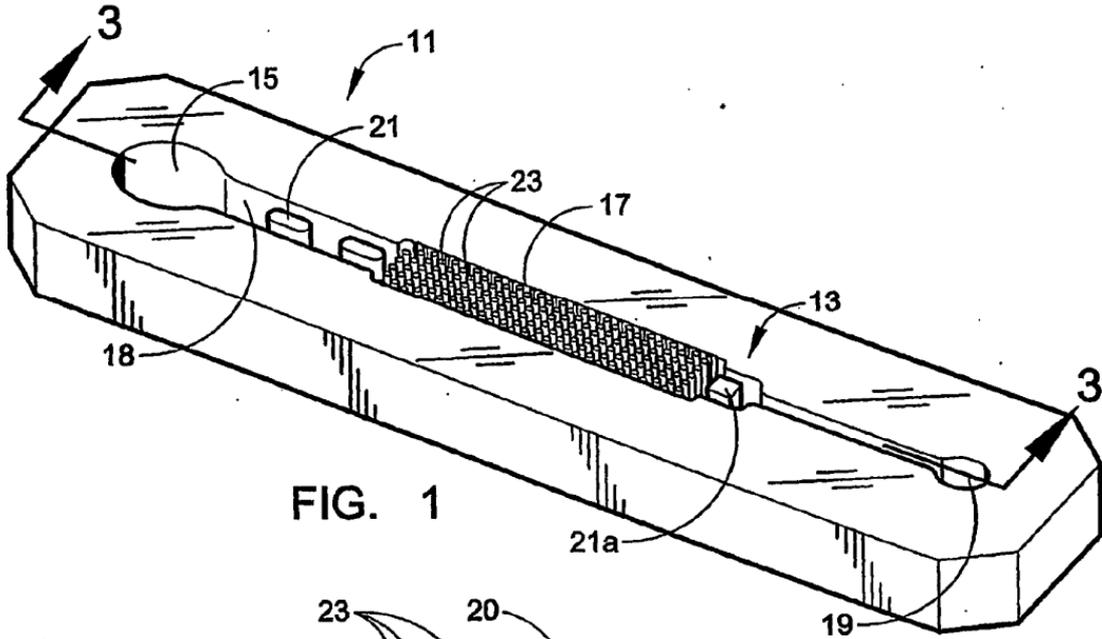
15. El aparato de la reivindicación 1, en el que la trayectoria de flujo proporcionada por dichos pilares (23) promueve torbellinos y remolinos.

60 16. Un método de captura de una molécula diana en una muestra que comprende hacer que una masa de líquido que contiene dicha muestra fluya a través de dicho microcanal (13) del aparato de la reivindicación 1, en el que la superficie de dicho microcanal está revestida con un agente de secuestro capaz de unirse a la biomolécula diana.

65 17. El método de la reivindicación 16, en el que la molécula diana es una célula presente en la sangre.

18. El método de la reivindicación 16, en el que la molécula diana es una célula cancerosa metastásica.

19. El método de la reivindicación 16, en el que la molécula diana es una célula fetal de una muestra de sangre materna o un trofoblasto de extracto de moco del cuello uterino.
- 5 20. El método de la reivindicación 16, en el que la masa de líquido que contiene dicha muestra fluye a través de dicho microcanal (13) a una velocidad de 0,2 mm a 1 mm por segundo.



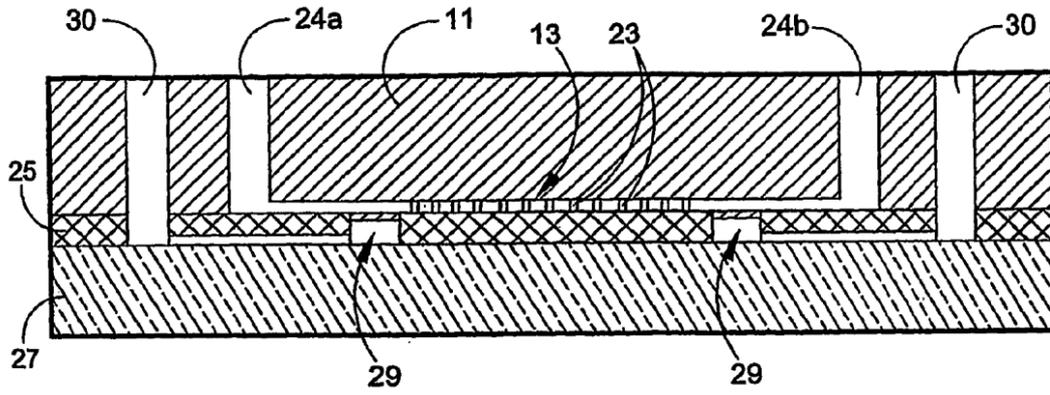


FIG. 5

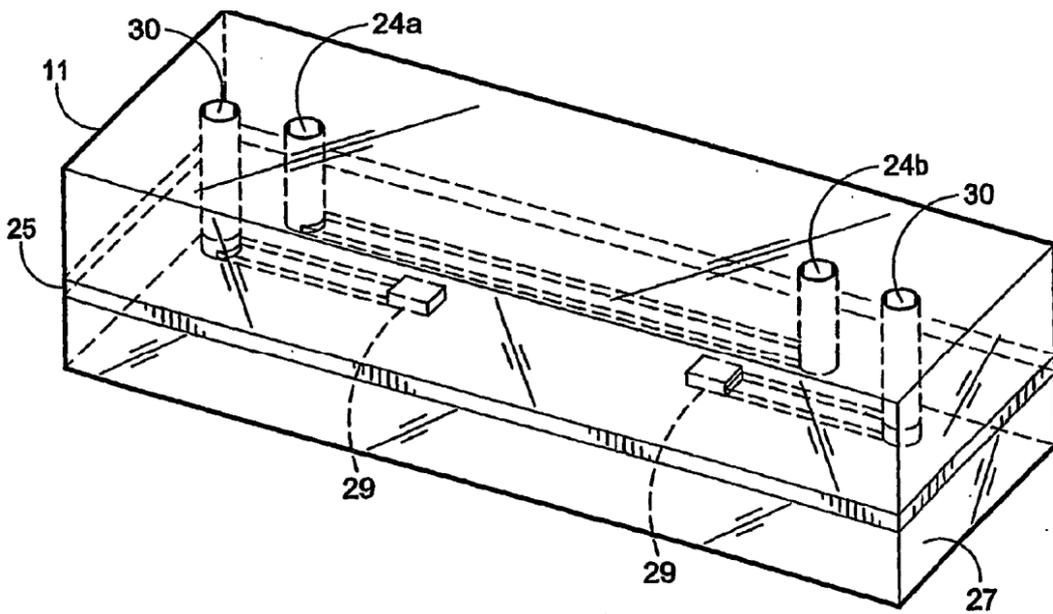


FIG. 4

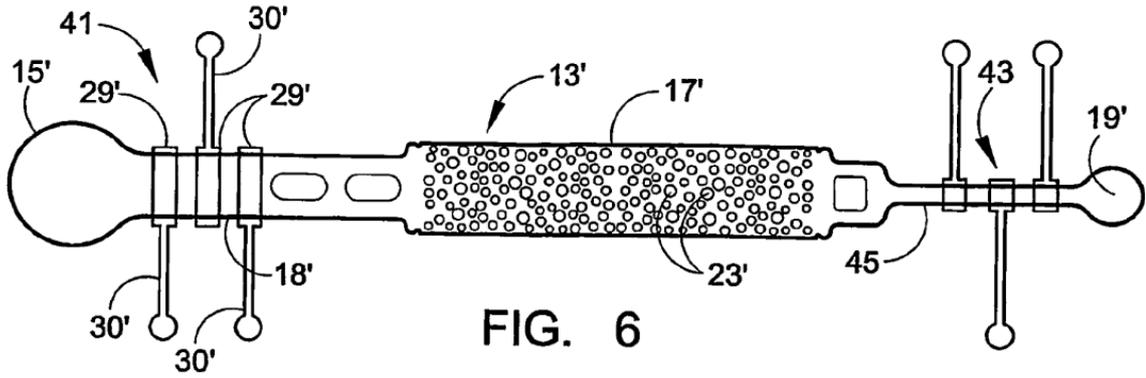


FIG. 6

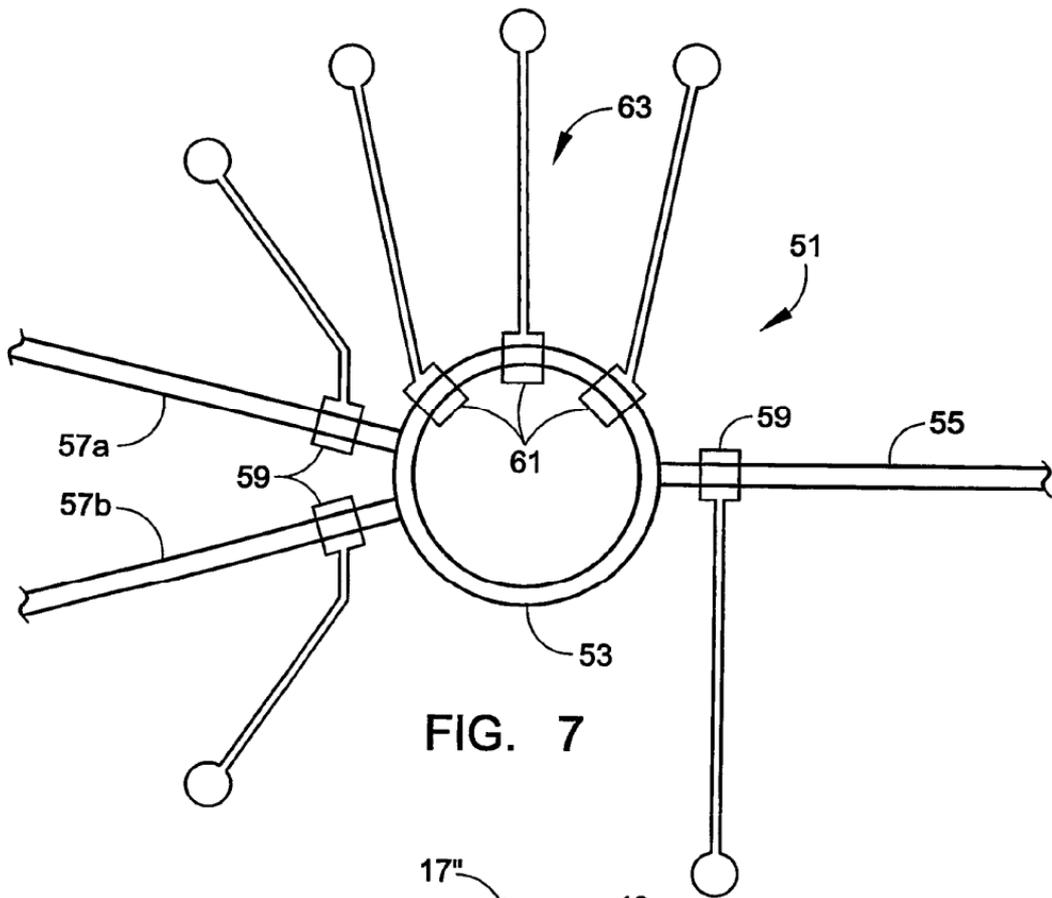


FIG. 7

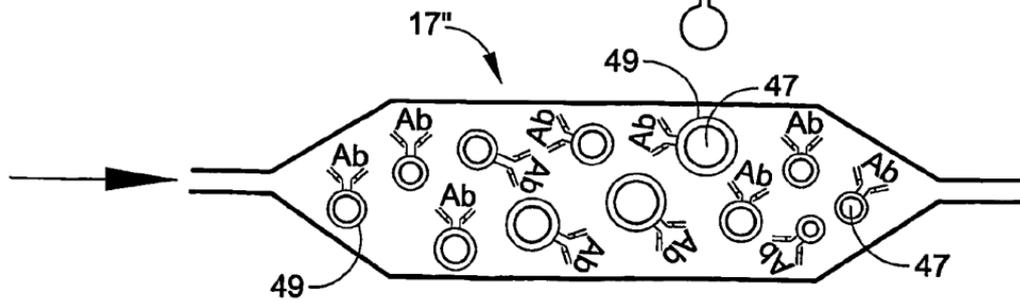
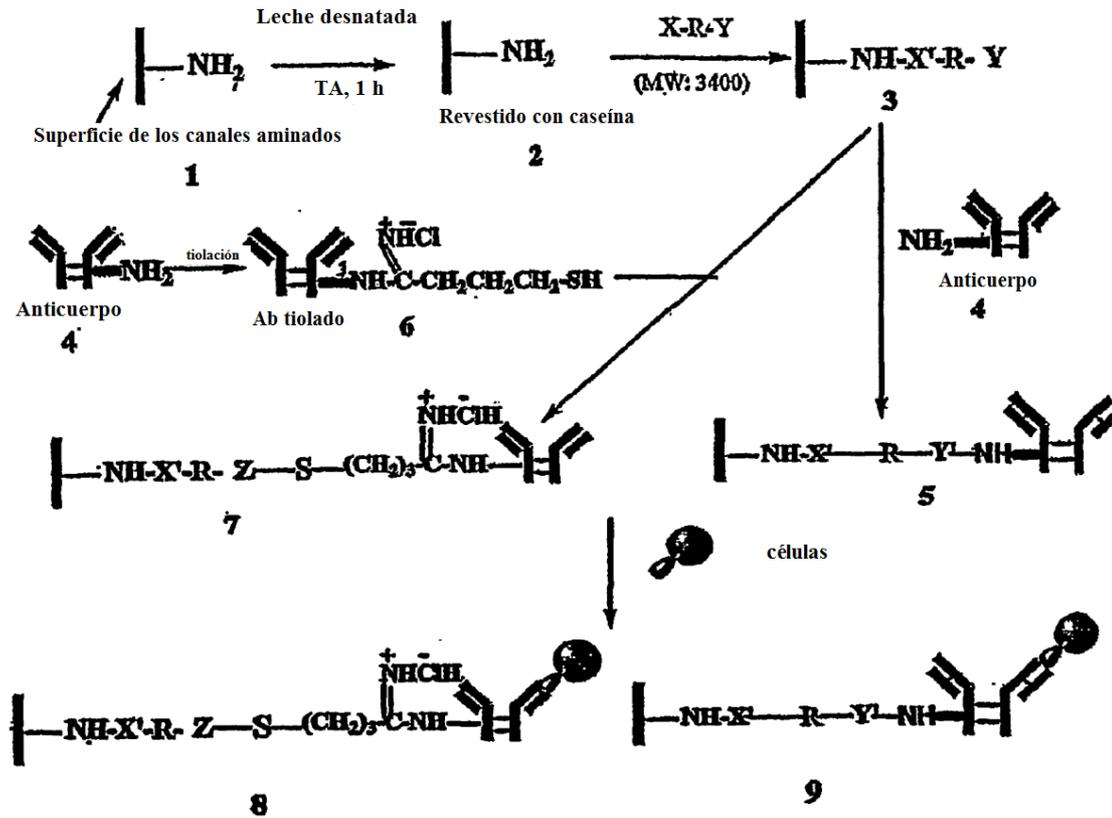


FIG. 8



X = Y = NCO, NCS

R = (CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>

Donde n = 2-200

R = Polímero tridimensional que incluye aunque no se limita a hidrogel, ácidos nucleicos, péptidos proteínas y enzimas

X = COOH, CHO, NHS, ICH<sub>2</sub>CHO- Y = Maleimido, SH, Halo-CH<sub>2</sub>CO-

FIG. 9

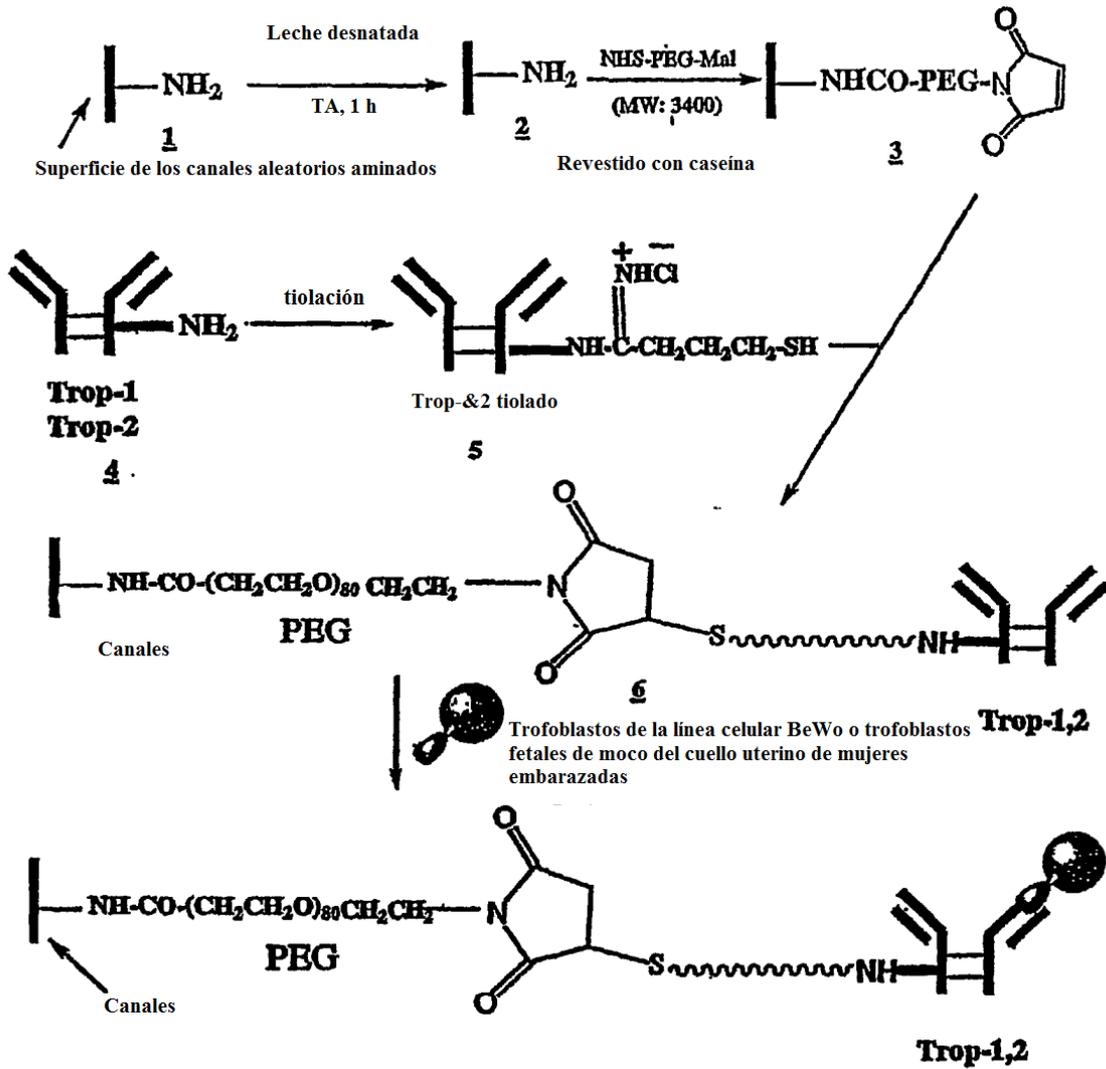
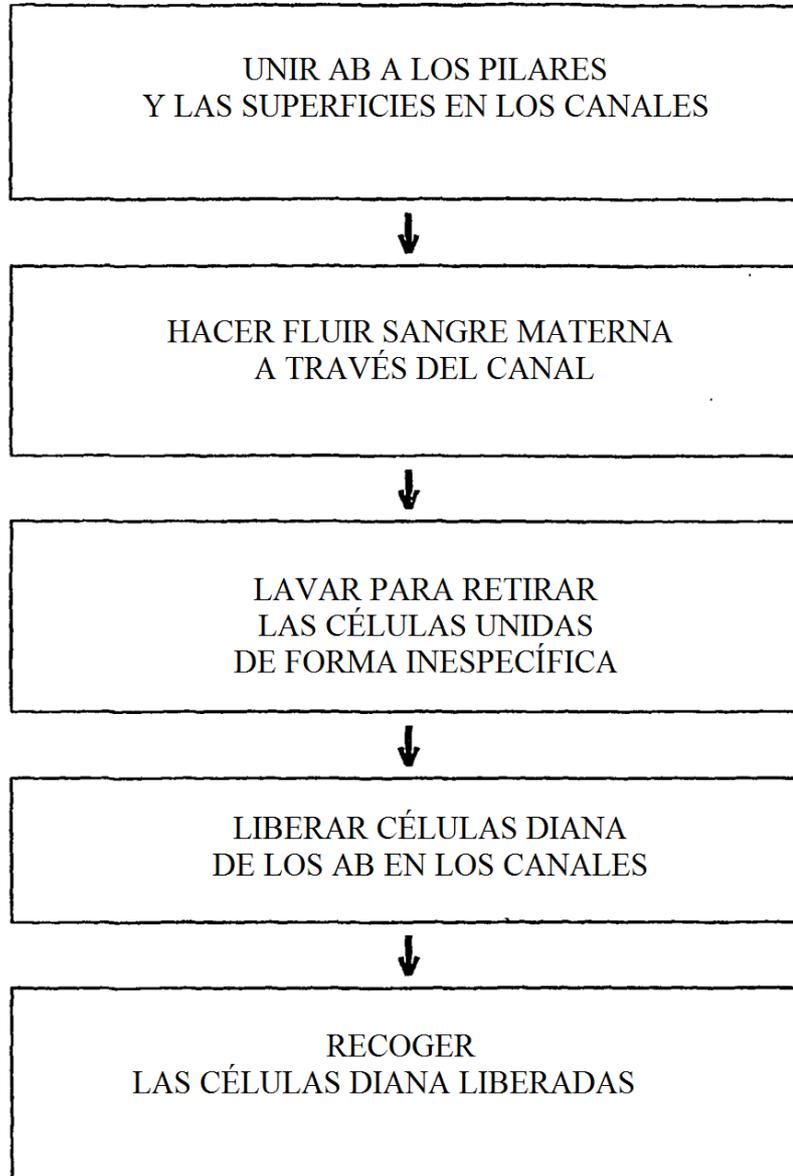


Figura: Esquema del revestimiento de canales con anticuerpos

FIG. 10



**Figura 11**

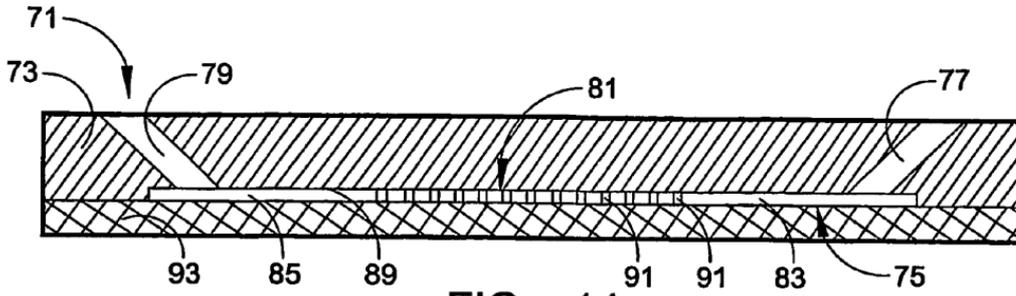


FIG. 14

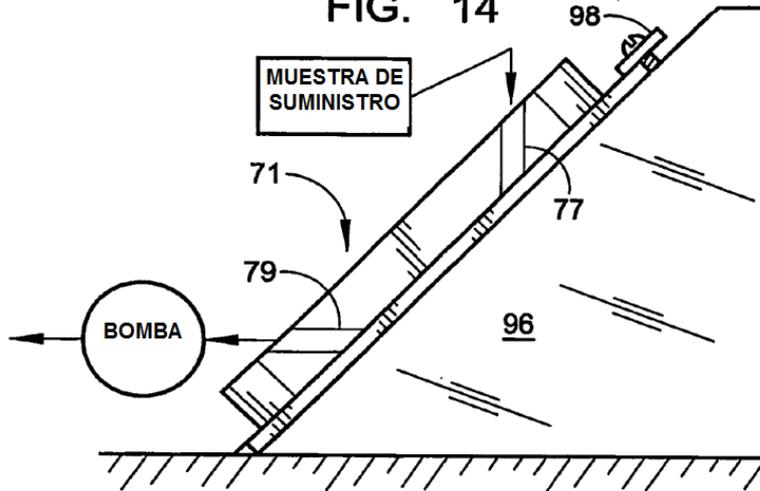


FIG. 15

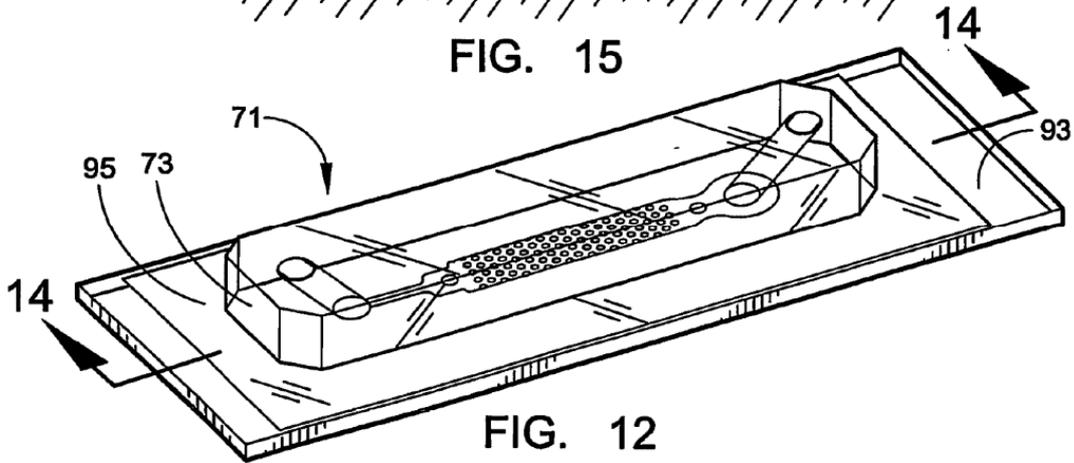


FIG. 12

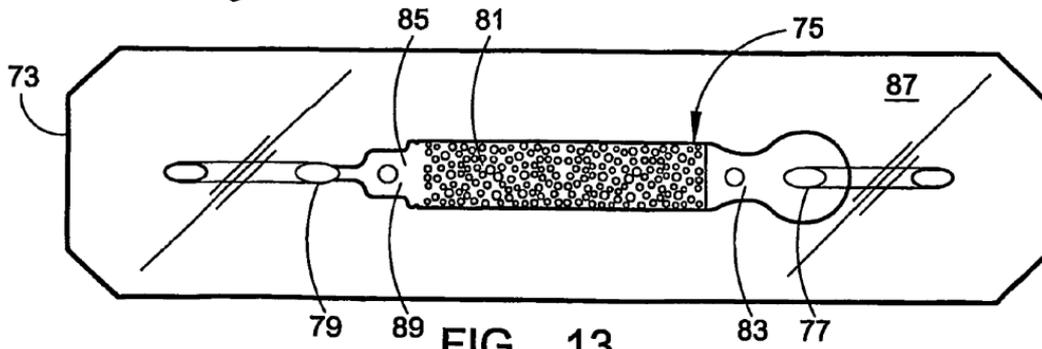


FIG. 13