

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 439**

51 Int. Cl.:

G01N 21/01 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

G01N 21/05 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

G01N 21/03 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2012 E 12733179 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2723859**

54 Título: **Fotoporación microfluídica**

30 Prioridad:

21.06.2011 GB 201110454

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

23.09.2015

73 Titular/es:

UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY OF ST ANDREWS (100.0%)

**College Gate, North Street
St Andrews, Fife KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**DHOLAKIA, KISHAN;
MARCHINGTON, ROBERT;
ARITA, YOSHIHIKO y
GUNN-MOORE, FRANK**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 546 439 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

Fotoporación microfluídica

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema para la inyección de "agentes de inyección" que podrían incluir agentes químicos, material particulado (por ejemplo nanopartículas, puntos cuánticos) o agentes biológicos (por ejemplo, ADN, ARN, proteínas) en células biológicas, por medio del uso de un campo óptico para la permeabilización celular en conjunción con un flujo de fluido.

Antecedentes

El uso de un haz láser enfocado para crear un poro auto-cicatrizal de un diámetro de sub-micrones en la membrana plasmática de una célula (fotoporación/optoporación), para la introducción selectiva de sustancias impermeables a la membrana (inyección óptica/optoinyección) que incluyen ácidos nucleicos (transfección óptica), es una técnica potente que se aplica mayoritariamente para tratar células únicas. La membrana de una célula sana es impenetrable a las grandes moléculas polares. La capacidad para superar esta barrera e inyectar un material ajeno, tal como ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARNm, ARN de interferencia, un tinte o un fármaco, por ejemplo, en una células biológica viva sin dañar la integridad de la células o el agente, es de interés para un amplio intervalo de aplicaciones en biología y medicina.

Existe una variada gama de métodos para permeabilizar la membrana de una célula para la inserción de material ajeno que incluye: la inserción de pipetas de tamaño micrón (microinyección); aplicación de campos eléctricos (electroporación); inserción balística de nanopartículas recubiertas (pistola genética); transporte de agentes terapéuticos encapsulados en partículas basadas en lípidos (lipofección) o polímeros; suministro vírico; formación de poros o permeabilización utilizando ondas acústicas (sonoporación); y utilizando campos de láser para abrir un poro transitorio en la membrana (fotoporación). De estos, la fotoporación ha demostrado satisfactoriamente en un amplio intervalo de tipos de células animales y vegetales y tiene muchas ventajas. Sin embargo, las estrategias de fotoporación hasta ahora se han limitado a los estudios de bajo rendimiento, a pequeña escala, ya que necesitan dosificación secuencial manual de células individuales.

Un sistema que empieza a afrontar el problema del rendimiento de la fotoporación se describe en Marchington et al. en *Biomedical Optics Express* 1, 2, 527 (2010). Este sistema tiene un chip microfluídico que se utiliza para suministrar las células por medio de un haz de láser de femtosegundos enfocado para la fotoporación, lo que hace posible que las células se dirijan en una estrategia automática. El haz se enfoca a un punto de difracción limitada utilizando un objetivo de microscopio externo, y las células se pasan a través del foco en una dirección ortogonal a la dirección de propagación del láser. Haciendo esto se permite que se alcancen resultados de una célula por segundo. Sin embargo debido a la necesidad de que las células se expongan al haz 1 - 10 milisegundos, el rendimiento sigue siendo limitado.

Otro sistema que intenta afrontar el problema del rendimiento en la fotoporación se describe por Marchington Marchington et al in *Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) and Quantum Electronics and Laser Science Conference (QELS)* 16 May 2010. El sistema tiene un chip microfluídico. En el chip, los pulsos de femtosegundos enfocados con precisión se combinan con el enfoque hidrodinámico para proporcionar un suministro continuo de células al haz láser para la inyección óptica. Se abre un agujero transitorio en la membrana según pasa a través.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un sistema de permeabilización celular microfluídica para permeabilizar una o más células en un flujo de fluido de acuerdo con la reivindicación 1, estando descritas las realizaciones preferidas por las reivindicaciones dependientes 2 a 13. La invención también proporciona un método para permeabilizar una o más células de acuerdo con la reivindicación 14, y preferentemente de acuerdo con la reivindicación 15.

Debido a que el haz de luz y el flujo de fluido son colineales, la dosis de láser necesaria para la fotoporación se puede extender a lo largo de toda la longitud de interacción del campo del láser en vez de estar confinado a un pequeño volumen de interacción. Esto permite un aumento de la tasa de flujo del fluido y por tanto del rendimiento. Una ventaja más es que las células se pueden pasar secuencialmente a través del campo de luz para la poración continua. Esto se puede llevar a cabo en una manera automática de alto rendimiento para la inyección de un gran número de células, con las altas eficacias y viabilidades tras la inyección que son posibles utilizando la fotoporación.

El sistema microfluídico puede tener medios para guiar las células en una región de confinamiento contenida en el flujo de fluido en la parte de permeabilización. Preferentemente, los medios de guía de células se basan en enfoque hidrodinámico. Los medios de guía celular pueden comprender una boquilla tridimensional. El haz de luz puede extenderse sobre un volumen que incluye la región de confinamiento.

Preferentemente, el canal de fluido tiene un "codo en L" o una "curva en S" o una "curva en U", y la fuente óptica se posiciona en la curva.

El canal y la fuente óptica se pueden disponer de forma que el haz de luz sea paralelo a las paredes del canal.

5 El canal y la fuente óptica se pueden disponer de forma que en la parte de permeabilización del flujo celular se mueva en una dirección opuesta a la dirección de propagación del haz de luz.

10 El sistema de microfluídico puede tener medios de variación del perfil de intensidad del haz lumínico. Tales medios pueden incluir una lente axicon y/o un modulador espacial de luz. Los medios de variación del perfil de intensidad del haz lumínico se pueden utilizar para generar un haz de luz no difractante tal como un haz de Bessel. Preferentemente el haz de Bessel una propagación sin variación a lo largo de la longitud de la parte de permeabilización del canal. Debido a esta propagación extendida sin variación del punto focal, el haz de Bessel se puede posicionar a lo largo de la longitud de la curva en S, para una tasa de flujo de fotoporación. El núcleo central del haz de Bessel se repara por sí mismo alrededor de una obstrucción. Esto significa que se pueden porarse / permeabilizarse multitud de células en el flujo simultáneamente (en que cualquier célula alineada con el núcleo central se considera una obstrucción).

20 El sistema de microfluídico puede tener una o más entradas que se proporcionan para introducir uno o más fluidos adicionales en el canal de microfluídico. La una o más entradas se pueden posicionar para permitir que se introduzcan uno o más fluidos adicionales en el canal de microfluídico antes del canal de permeabilización.

La luz puede acoplarse en al canal de permeabilización utilizando una fibra óptica o una guía de onda.

25 El canal puede tener una sección cruzada cuadrada o una sección cruzada circular o una sección cruzada rectangular. El canal puede tener dimensiones seccionales cruzadas en el intervalo de 1-500 μm , por ejemplo, 10-500 μm , opcionalmente 50-100 μm . El canal de microfluídico y/o la fuente óptica se pueden formar en el chip, formando un dispositivo integrado en el chip.

30 La fuente óptica se puede disponer para proporcionar un haz de luz que es tal que la función celular se conserva después de la permeabilización.

35 Como ejemplos no limitantes, el sistema se puede utilizar para permear membranas de células biológicas (animales, vegetales o fúngicas), bacterias, secciones de tejido o células múltiples unidas, organismos vivos multicelulares microscópicos, vesículas extracelulares (por ejemplo, exosomas), orgánulos subcelulares (por ejemplo, mitocondrias, núcleos, cloroplastos, endosomas, vesículas), lípidos y micelas artificiales, gotículas lipídicas, y versiones artificiales o modificadas de cualquiera de estas partículas enumeradas. El intervalo de tamaños de las partículas que se podrían permear podría variar dese 10 nanómetros a 1 milímetro.

40 De acuerdo con la presente invención, se proporciona un método para permeabilizar una o más células en un flujo de fluido que comprende la exposición de las células del fluido a un haz de luz que es colineal con la dirección del flujo de fluido. Preferentemente, el haz de luz es un haz de Bessel.

45 El método puede comprender la introducción de uno o más fluidos adicionales en el flujo de fluido antes de la exposición lumínica.

Breve descripción de los dibujos

50 Varios aspectos de la invención se describirán en este momento solo a modo de ejemplo y con referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

La Figura 1 es una vista esquemática de un sistema de fotoporación con un chip microfluídico con una geometría de canal de curva en S;

55 La Figura 2 es una vista esquemática de una actualización para producir un haz de Bessel utilizando una lente axicon;

La Figura 3 es una vista esquemática de un sistema de fotoporación con un chip microfluídico con una geometría de canal de curva en S y una lente para transmitir un haz de Bessel en el canal;

La Figura 4 es una vista esquemática de otro sistema de fotoporación con un chip microfluídico con una geometría de canal de curva en S y una lente para emitir un haz de Bessel en el canal;

60 La Figura 5 es una vista esquemática de un sistema más de fotoporación con un chip microfluídico y una geometría de canal de curva en S y una lente para emitir un haz de Bessel en el canal;

La Figura 6 es una vista esquemática de otro sistema más de fotoporación con un chip microfluídico y una geometría de canal de curva en S, con un sistema de suministro de fibra óptica,

65 La Figura 7 es una vista esquemática de un sistema de fotoporación con un chip microfluídico con una geometría de canal de curva en S, con un sistema de suministro de fibra óptica y un elemento para dar forma al haz.

La Figura 8 es una vista esquemática de una actualización óptica para la fotoporación de microfluídico;

La Figura 9 muestra los gráficos del pico de intensidad y tamaño de núcleo contra la distancia que se obtiene para el haz de Bessel con la actualización de la Figura 8;

La Figura 10 es una vista esquemática del chip microfluídico con un canal de poración con curva en S;

5 La Figura 11 muestra una vista en corte del interior de una junta en T que alinea un capilar de muestra (a la izquierda) con un flujo de tampón (arriba);

La Figura 12 muestra un gráfico del porcentaje de partículas que pasan a través de la región central del canal (en 15 μm) contra la relación del flujo tampón-muestra;

La Figura 13 muestra las perlas en un canal de microfluídico sin flujo de tampón (a la izquierda), con una relación de flujo tampón/muestra de 210:30 ulhr^{-1} ;

10 La Figura 14 muestra las eficacias de inyección óptica de las células HL-60 con yoduro de propidio, y

La Figura 15 muestra la fase de contraste de la imagen de HL-60 (a la izquierda) y la fluorescencia PI que se observa en las mismas células (a la derecha).

Descripción específica

15 La Figura 1 muestra un chip microfluídico 10 que tiene una entrada de muestra 12, una salida de muestra 14 y un canal de flujo de fluido 16 que tiene una geometría de curva en S que produce que la dirección del flujo de fluido cambie según se mueve el fluido a través del canal 16, una lente 18 que se utiliza para enfocar o emitir un campo óptico en una sección de poración 20 del canal de fluido 16. El haz láser se acopla en el canal de poración 20 colineal a la dirección del flujo de fluido. Un medio fluido que contiene las células y posiblemente un agente que se va a inyectar en las células fluye a través del canal de fluido 16. Una vez en el canal de poración 20, el haz láser se utiliza para permeabilizar las membranas de las células según se mueven a la salida de muestras 14.

25 Se puede utilizar cualquier haz láser adecuado en la disposición de la Figura 1. Sin embargo, en una realización preferida, se utiliza un haz de Bessel. Los haces de Bessel son no difractivos y por lo tanto de propagación invariable. También son auto-reparables, y si se obstruyen parcialmente en algún punto, se reformarán el eje del haz en un punto más abajo.

30 La Figura 2 muestra una disposición óptica para la emisión de un haz de Bessel. El haz de Bessel se genera por una lente axicon 22 que tiene un cono de ángulo α . Las ópticas de emisión 24 tienen dos lentes con longitudes focales f_1 y f_2 . Las lentes se proporcionan para emitir y redimensionar el haz de Bessel en el chip microfluídico 10. En particular, en la disposición que se muestra en la Figura 2, el núcleo del haz de Bessel se reduce por el factor f_2/f_1 . La combinación de las lentes y el cono en ángulo α , determina el radio final del núcleo del haz de Bessel y su longitud de propagación invariable.

35 La Figura 3 muestra las últimas lentes f_2 en el sistema de emisión en la Figura 2 que enfoca un haz de Bessel en el canal de poración 20 de un chip microfluídico con curva en S. La distancia z indica la longitud de no difracción del núcleo del haz de Bessel. La distancia z dividida por la velocidad de flujo en una región del núcleo del haz da una medida de la duración de la dosis de fotoporación. Por la extensión de la distancia z , se puede aumentar la tasa de flujo.

45 La Figura 4 muestra un sistema de poración microfluídica similar a los que se habían descrito anteriormente, pero con dos entradas de tampón 25, 26 que alimentan la curva en S corriente abajo de la entrada de la muestra 12, pero antes del canal de poración 20. Las entradas de tampón 24, 26 permiten que fluyan uno o más tampones para incorporarse para proporcionar el enfocado de flujo (enfocado hidrodinámico) de la muestra para confinar las células en el centro del canal 16 en una o dos dimensiones. Esto permite el enfoque hidrodinámico para proporcionar el confinamiento de la muestra en una o dos dimensiones. El confinamiento podría proporcionarse combinando múltiples corrientes de fluido, como se muestra, o por medio de campos eléctricos. Las lentes f_2 emitan un haz de Bessel en el canal de poración 20 con diámetro del núcleo invariable por encima de la longitud z .

50 La Figura 5 muestra otro sistema más de poración microfluídica similar a los que se han descrito anteriormente, pero con una entrada de inyección de reactivo 28 para permitir que se inyecte un reactivo en la corriente de la curva en S a partir de la entrada de la muestra 12, pero antes del canal de poración 20. Como antes, las lentes f_2 emiten un haz de Bessel en el chip 10, con una invariancia del diámetro del núcleo por encima de la longitud z . Dependiendo de la constante de difusión de la inyección del agente, se puede necesitar un mezclado en el chip de elementos para la mezcla homogénea del agente con las células.

60 Se podrían incluir entradas para otros agentes tales como fijadores, tinciones de viabilidad, fármacos, colorantes fluorescentes, antibióticos, o múltiples inyecciones de agentes, por ejemplo. Una entrada para un líquido inmiscible, tal como silicona o aceite mineral se podrían incluir para encapsular células en gotículas, por ejemplo gotículas basadas en agua (que contienen una o más células) en un medio basado en aceite. Tal sistema de gotículas podría ser capaz del consumo del agente reducido, el suministro preciso de las concentraciones de l reactivo a las gotículas y mejorar la homogeneidad del reactivo, por ejemplo. Controlando el espaciado de las gotas, se podría manipular el espaciado de múltiples células en la parte de permeabilización del canal.

65 La Figura 6 muestra una fibra óptica 30 para el suministro de luz láser a un chip microfluídico doblado en S 10. El

- 5 haz láser se acopla a la fibra óptica 30, que suministra luz al chip 10. La fibra 30 suministra la luz directamente al canal microfluídico 16. De manera alternativa, más elementos para dar forma al haz y/o directores de ondas se pueden proporcionar en el chip para dar forma y/o dirigir la luz al canal de poración 20. Una lente 32 podría utilizarse para acoplar la luz a la fibra, o alternativamente se podría utilizar un láser en trenza (donde la fibra se une a la faceta del láser). En otra realización, los directores de onda se incluyen internos en el chip para el suministro de luz a múltiples regiones internas en el chip, y los elementos que dan forma al haz se utilizan para crear haces de Bessel, o múltiples puntos focales.
- 10 La Figura 7 muestra un chip 10 con una fibra óptica 30 para el suministro de luz al chip 10 y un elemento que da forma al haz 34 entre la fibra 30 y el canal de fluido 15 para producir varias formas de haz. La fibra 30 podría remplazarse con una guía de onda, permitiendo circuitos ópticos más complicados, tales como los que suministran la luz en múltiples regiones del chip. En este caso una fibra óptica se puede utilizar para suministrar la luz del láser a los directores onda.
- 15 En todos los ejemplos descritos anteriormente, las dimensiones del canal microfluídico deberían ser mayores que las partículas o células que se van a fotoporar para evitar que ocurran bloqueos. El aumento del tamaño del canal reduce la tensión tangencial sobre las células, pero también reduce la probabilidad de que las células se solapen con el haz de fotoporación, aumentando así las necesidades para el enfoque de las células. El tamaño máximo para el canal se determina por el número de Reynolds. Un número de Reynolds bajo es deseable para obtener un determinado flujo de células laminar libre de turbulencias, para la dosificación controlada de láser. Dimensiones del canal de 50-100 μm son apropiadas para la fotoporación de células de mamífero con diámetros hasta de 25 μm . Si se incorpora el confinamiento de células, por medio de enfoque hidrodinámico, por ejemplo entonces es importante el tamaño del flujo celular confinado (por medio del cambio de la relación de las tasas de flujo de la muestra y el tampón) más que las dimensiones totales del canal.
- 20 El tamaño del haz óptico que se va a suministrar al canal de flujo también es una consideración. En el caso del haz de Bessel, las dimensiones de la sección transversal del canal deberían ser mayores que las del diámetro del anillo más externo del haz de Bessel, de forma que no difracte y así trancar la longitud de propagación. La desmagnificación del haz de Bessel podría permitirle ajustarse a un canal más pequeño pero estos es a expensas de la longitud de propagación y el diámetro del núcleo.
- 25 El perfil de sección transversal del canal de flujo normalmente es circular o cuadrado. Un perfil circular produce un perfil de flujo parabólico simétrico radialmente. Un perfil de flujo similar se crea utilizando el canal de flujo cuadrado. Un perfil rectangular produce un perfil de flujo de la sección transversal que tiene a estar más próximo al flujo "tipo clavija" de Hele-Shaw, que podría permitir que muchas células fluyan en paralelo a velocidades de flujo del fluido casi idénticas. Combinado con una fotoporación láser iluminando a lo largo de un plano, se podrían proporcionar resultados de dosificación de láser muy grandes.
- 30 Con respecto al perfil lateral del canal de flujo de fluido, en el punto de entrada del haz debería ser plano para permitir que el haz entre sin impedimentos, exceptos las pérdidas debidas a las reflexiones de Fresnel (que podrían opcionalmente minimizarse con revestimientos anti-reflexión adecuados y/o índice de coincidencia).
- 35 El confinamiento de las células en una región (por ejemplo el centro) del canal de flujo, para el solapamiento optimo entre el láser y las células en movimiento, se podría conseguir utilizando varios métodos, tales como enfoque hidrodinámico, como se ha expuesto anteriormente. Otras técnicas par confinamiento celular se basan en los efectos de inercia del flujo de Dean; enfoque dirigido por campo eléctrico, tales como la dielectroforesis, o la fuerza directora de Bernouilli hacia el centro del canal del flujo debido al perfil de flujo parabólico, por ejemplo.
- 40 El flujo de fluido se puede dirigir por uno o varias bombas disponibles o métodos para internar en el chip. Esto podría ser por bombeo de fluido externo utilizando bombas jeringas, bombas peristálticas, bombas directoras de presión, o alimentación por gravedad (efecto sifón), o flujo dirigido interno en el chip se podrían generar utilizando campos eléctricos para el flujo dirigido electrocinético del fluido y/o partículas. Los campos ópticos podrían utilizarse para dirigir partículas alrededor del chip utilizando fuerzas de gradiente y/o dispersión, lo que podría aumentarse con partículas dieléctricas para aumentar el contraste total entre la célula (y partícula dieléctrica) y el medio circundante.
- 45 La dirección del flujo del fluido y la dirección de propagación del haz óptico podría ser el mismo o el contrario.
- 50 Se pueden utilizar varias fuentes ópticas para el proceso de fotoporación, por ejemplo una fuente de láser de femtosegundos, tal como un láser de Titanio: Zafiro, para el suministro de dosis de femtosegundos a las células. Sin embargo, un amplio intervalo de otras fuentes han demostrado fotoporar células satisfactoriamente, incluyendo onda continua, fuentes de picosegundos, y nanosegundos. Además, se podría utilizar cualquier fuente adaptada para proporcionar un haz que se puede utilizar para formar un poro auto curable en una célula.
- 55 Las fuentes femtosegundos se cree que interactúan con la membrana celular por medio de un proceso multi-fotón, y como tal proporciona un alto grado de confinamiento con mínimo daño colateral a la célula, y con una mínima duración de la dosis. Los parámetros típicos para la fotoporación de femtosegundos son uno o más de 1-100 dosis de milisegundos de luz a 780-800 nm, con una duración del pulso de 50-500 fs a una frecuencia de repetición de 80

MHz, con una potencia media de entre 1 mW y 100 mW, por ejemplo de 40-100 mW que se contiene en un punto focal de 1-2 μm (núcleo central) sobre la membrana celular. Para el caso del haz de Bessel, la potencia óptica total se multiplica por el número de anillos con el fin de obtener una potencia óptica comparable en el núcleo central. De manera ideal, para las fuentes de femtosegundos pulsadas la potencia media del núcleo central del haz de Bessel debería estar en el rango de 1 mW a 100 mW.

La duración de la dosis es el tiempo que la célula reside en el campo óptico, y se relaciona con la velocidad del flujo, pero también es función de la potencia óptica y el tamaño del punto focal del haz exacto (tamaño del núcleo central). La dosis óptica exacta y la potencia se deben determinar empíricamente para un sistema determinado, agente de inyección, y tipo celular. Si la duración de la dosis o la intensidad óptica es demasiado baja, puede que no ocurra la permeabilización, o si es demasiado alta, se puede producir un daño en las células dando lugar a la muerte celular. Además, la duración de la dosis y/o la intensidad óptica /potencia se seleccionan para permitir la permeabilización pero evitando el daño celular. Opcionalmente, se incluye un obturador ente la fuente de láser y el canal microfluídico, permitiendo que las dosis de láser tengan una puerta de tiempo, para controlar más del efecto de fotoporación. Las fuentes no láser, tales como LED o lámparas de descarga podrían también satisfacer los parámetros ópticos necesarios para la fotoporación. Por ejemplo, se podría utilizar un LED azul/violeta. En este caso la potencia de haz medio podría estar en el intervalo de 1 mW a 10 mW con una dosis de irradiación del orden de 0,1-5 segundos. Todas las fuentes mencionadas se podrían utilizar en modo de onda continua.

La dirección de las células con el láser se puede conseguir por varias maneras. El control de la confluencia de la muestra celular capacitaría a las células para entrar en el canal de permeabilización de una en una, con el campo óptico estando en continuamente. De manera alternativa, se podría utilizar un mecanismo desencadenado. Esto podría utilizar un proceso de imagen, excitación de fluorescencia y detección, o dispersión de la luz, para detectar la presencia de una célula. Una vez que se detecta la célula entonces el haz de fotoporación se podría desencadenar con un retraso de tiempo adecuado para dirigirse a la célula detectada. Si se utiliza un haz de Bessel, la propiedad de auto curación apropiada del yayo se podría utilizar para permitir que pasen grandes números de células que pasen a través del canal de permeabilización, sin causarles distorsión del haz que de otra manera alterase la permeabilización. Tal sistema podría operarse de tres modos: el haz de poración siempre está encendido, de forma que cuando las células se mueven en el canal de poración están inmediatamente expuestas, el haz podría desencadenarse al detectar una célula; o con el control adecuado sobre el espaciado celular, una tasa de desencadenado específico podría fijarse para corresponder con la frecuencia de células que pasan en el canal de poración.

La forma del haz se podría utilizar para alterar el perfil del campo óptico en el canal. Estos podría incluir el uso de un elemento óptico difractor para multiplicar el haz para producir puntos focales múltiples, y lentes para enfocar. Se podrían utilizar lentes Fresnel ya que son altamente compactas y se fabrican altamente compactas y más fácilmente en estructuras lab-on-un-chip. Se podrían posicionar múltiples lentes a lo largo de la longitud de un canal para producir una matriz de puntos focales.

El sistema de la invención se ha utilizado satisfactoriamente para inyectar células con un colorante. La inyección óptica de alto rendimiento de células de mamífero se demostró en células de leucemia promielocítica humanas (HL-60) y células ováricas de hámster chino (CHO-K1). Se determinó la eficacia de la inyección utilizando el colorante impermeable a la membrana celular, yoduro de propidio (PI), y posteriormente viabilidad celular utilizando con calcio AM (CAM).

Se cultivaron células H-60 en RPMI-1640 (Sigma Aldrich) y se cultivaron las células en Medio de Eagle Modificado (MEM). Además del medio de cultivo se utilizaron un 10 % de suero fetal bovino (FCS, Globepharm), $20 \mu\text{gml}^{-1}$ de estreptomycin (Sigma Aldrich) y $20 \mu\text{gml}^{-1}$ de penicilina para ambas líneas celulares. Las células se cultivaron en matraces T25 y se incubaron en una atmósfera humidificada con un 5 % de CO_2 a 37°C . Estas células se subcultivaron rutinariamente tres veces por semana.

El yoduro de propidio es un tinte de ácido nucleico y es impermeable a la membrana para las células vivas, viables. Se capta por las células cuando la membrana se ha comprometido y posteriormente se une al ADN con lo que muestra un aumento de fluorescencia de 20-30 veces con un máximo de emisión de 617 nm. La captación de PI está presente en ambas células inyectadas y células comprometidas de otra manera, es decir, células que están muertas o dañadas y tiene una membrana que es permeable con respecto a sus equivalentes sanas. Se utilizó el calcio-AM (CAM) para ensayar la viabilidad celular. El CAM es tinte permeable a la membrana que se convierte en calcéina en la célula y da fluorescencia con un pico de emisión a 530 nm. El sistema microfluídico estaba lleno con opti-MEM que contenía el producto a inyectar, PI a una concentración de $1,5 \mu\text{M}$. El opti-MEM se calentó a 37°C antes de su uso en el chip para disminuir las posibilidades de la formación de burbujas de gas.

En el caso de las células HL-60, que crecen en suspensión, se obtuvieron alícuotas a partir 100-400 μl de células confluentes de la reserva en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. El tubo de microcentrífuga se llenó con opti-MEM y se centrifugó en una micro-centrífuga a 500 rcf durante 5 minutos. Las células se aclararon de nuevo en opti-MEM recién preparado Nantes de suspenderse finalmente en opti-MEM que contiene PI ($1,5 \mu\text{M}$). Se midió la confluencia

celular en este punto utilizando un hemocitómetro antes de cargarse en una jeringa de 25 μl . Se utilizó una densidad celular típica de $1,2 \times 10^6$ células/ml en cada ejecución. Se prepararon dos placas de cultivo celular que contenían 400 μl de Opti-MEM SE añadieron 7,5 μM de la suspensión celular final a una placa para el control de referencia. La otra placa se utilizó para recolectar células de la salida del sistema microfluídico.

5 El equipo experimental se muestra en la Figura 8. Se utilizó un láser de femtosegundos de Ti: Zafiro en modo bloqueado (Chameleon, Coherent, Inc, $\lambda=800$ nm, duración del pulso 140 fs con una tasa de repetición de 80 MHz) para la inyección óptica. Una placa de media onda y un divisor de haces se utilizaron en conjunto para atenuar el haz láser a la potencia deseada. Una axicon con un ángulo abierto de 5° se utilizó para generar un haz de Bessel.
10 Se generó el haz de Bessel utilizando un telescopio de desmagnificación de 8 x, con un núcleo central de 1,9 μm de ancho y una longitud de propagación de 170 μm como se muestra en la Figura 9. La eficacia del sistema óptico se midió que era del 80,2 % desde antes del primer telescopio a la muestra plana.

15 Un chip microfluídico se posicionó en la ruta del haz de Bessel de manera que el haz de Bessel acoplado en el centro de la sección poración/permeabilización del canal microfluídico colineal a la dirección del flujo de fluido. En la sección de poración/permeabilización, las células se guiaban a lo largo del canal y a lo largo de la longitud del núcleo del haz de Bessel. En esta sección, el flujo celular se mueve en una dirección opuesta a la dirección de propagación del haz láser.

20 La Figura 10 muestra el chip microfluídico. Tiene una sección de poración /permeabilización de 500 μm de largo situada tras una ventana de 170 μm de espesor a través de la cual se dirige el haz de Bessel no difractante. El chip se creó a partir de tres placas unidas térmicamente con dimensiones de canal de 100 μm x 100 μm (Translume, Inc.). Los canales eran cuadrados en una sección transversal a través del chip, excepto en los puertos de entrada y salida donde se incluía una hendidura circular de 250 μm de profundidad, para acomodar el diámetro de un catéter PEEK (Upchurch, 1561). Se fijaron nanopuertos (Upchurch) a la entrada y la salida para conectar los catéteres microfluídicos con mínimos volúmenes muertos. El chip se mantuvo en una posición vertical tal que la curva en el canal se orientara paralela a la plataforma óptica y al haz de Bessel. Un microscopio fabricado a medida se utilizó para la imagen a lo largo del canal de fotoporación y para ayudar con el alineamiento.

30 El enfoque hidrodinámico de dos dimensiones se conseguía utilizando una boquilla tridimensional construida a partir de partes comerciales disponibles (A.Terray y S.J.Hart, Lab on a chip, 2010, 10, 1729-31). El dispositivo se construyó fijando un capilar de sílice (OD 360 μm , ID 50 μm) con una microfórmula utilizando un epoxi de dos partes. El capilar se alojó entonces en una junta en T a partir del ensamblaje de una entrada micromedidora. Se muestra en la Figura 11 una vista del corte de la unión de enfocado del flujo. Como el capilar se extiende más allá de la unión y es más estrecho que el canal que le rodea, una capa de flujo es libre para rodear la boquilla capilar. Se conectó el catéter PEEK al brazo restante de la unión donde la muestra enfocada se suministraba al chip microfluídico.
35

El ensamblaje de la boquilla permite la formación de un flujo de núcleo, que contiene las células de muestra y se dirige en el flujo de la capa externa. Ajustando las tasas de flujo relativas de las capas del núcleo y la capa de flujo, el grado de confinamiento de la muestra se puede controlar. La velocidad de las partículas a lo largo del canal puede controlarse también cambiando la tasa de flujo combinada. Los flujos del núcleo y la capa se controlaban utilizando dos bombas de jeringa (Harvard Apparatus, Pico Plus). Se utilizó una jeringa ajustada con gas de 25 μl y otra de 100 μl (Hamilton) con las bombas de jeringa para controlar el flujo de la muestra y del tampón, respectivamente.
40

45 El dispositivo de enfocado hidrodinámico se ensayó con perlas de polímero de 4 μm en solución. Se ensayó un intervalo de relaciones de flujo, como se muestra en las Figuras 12 y 13. Utilizando una cámara de alta velocidad (Fastec Imaging), se grabó un corto segmento de vídeo. Se analizaron los vídeos entonces para registrar la posición de cada esfera de polímero con respecto al centro del canal. Estos datos se utilizaron entonces para deducir la probabilidad de células (normalmente $\sim 20\text{-}25$ μm de diámetro) que pasan a través del centro del canal y por tanto a través del núcleo del haz de Bessel. Sin enfoque hidrodinámico, el 7 % de las perlas fluían en 15 micrones del centro del canal. El aumento de la relación de flujo núcleo/tampón hasta 1:7 mostraba un aumento de 10 veces con el 72 % de partículas pasando a través de la misma región (Figura 12).
50

Para cada experimento de inyección óptica, el sistema microfluídico se lavó con 5 % decon 90, agua filtrada mili-Q y un 70 % de etanol antes de secarse con aire filtrado utilizando una bomba peristáltica. El chip y los catéteres se llenaron con solución de Opti-MEM que contenía PI utilizando la bomba peristáltica. Esta bomba se desconectó entonces y se reemplazó con un puerto par inyección con jeringa y una jeringa de 100 μl que contenía solución Opti-MEM adicional para el flujo de tampón. Se tuvo cuidado de no introducir burbujas de aire en el sistema.
55

60 Una vez que la jeringa de muestra que contenía las células estaba en posición, las bombas de jeringa se pusieron en marcha a una tasa de flujo fijo (30 $\mu\text{l h}^{-1}$ para la muestra y 210 $\mu\text{l h}^{-1}$ para el flujo de tampón) y se expuso el chip al haz de Bessel. Normalmente un minuto tras el inicio de la bomba de jeringa, las células eran visibles fluyendo a través de la región de fotoporación del chip con buena localización en el centro del canal. Una placa de cultivo celular con el fondo de cristal (FluoroDish, World Precision Instruments Inc.) que contenía Opti-MEM se utilizó como vaso de recolección a la salida. Tras otros 15 minutos, las bombas y el láser se apagaron.
65

Una vez que las células pasaron a través del sistema microfluídico durante quince minutos, se recolectaron y se comprobó la señal a yoduro de propidio positivo. La fluorescencia de las células se observó utilizando una lámpara de mercurio con un filtro TRITC (Nikon). Se contaron aproximadamente 200 células por placa. Para comprobar la viabilidad de las células, se añadió calcio-AM a cada placa con una concentración de 1 μ M. Las células se devolvieron a la incubadora durante 20 minutos antes de comprobar la viabilidad celular utilizando un filtro cúbico FITC. Además de una placa control en la boquilla, las ejecuciones experimentales se llevaron a cabo en ausencia de haz de Bessel para confirmar la inyección de PI era un efecto óptico más que debido a la tensión tangencial infringida por el sistema microfluídico.

La Figura 14 muestra las eficacias de la inyección óptica de las células HL-60 y CHO-K1 con yoduro de propidio. Como se ha señalado anteriormente, aproximadamente 200 células se contaron en cada muestra para obtener el porcentaje de células que expresaban PI. La inyección viable es la eficacia de la inyección corregida por la viabilidad de la célula. Las barras de error son el error estándar de la medio (N = 10 para HL-60, N = 3 para CHO-K1).

A una tasa de flujo constante (30 μ l h^{-1} para el flujo de la muestra y 210 μ l h^{-1} para el flujo de tampón), se midió la velocidad celular en 7,4 mm s^{-1} en un segmento recto del canal. Para las célula HL-60, se recolectaron normalmente en la región de 9000 células dando un rendimiento medio de 10 células/s. Esto corresponde con una dosis de tiempo potencial, el tiempo que se toma en atravesar la longitud de propagación del haz de Bessel, de aproximadamente 23 ms. Bajo esas condiciones, 26,6 \pm 3,6 % de células, mostraban fluorescencia PI en comparación con 5,0 \pm 0,5 % del control de referencia. No se observaba ninguna diferencia entre el control de referencia a las células que fluían a través de chip en ausencia del haz de Bessel. Tras corregir la viabilidad de las células tras el flujo a través del chip. La eficacia de inyección viable se encontró que era 20,4 \pm 4,2 %. La Figura 15 muestra una imagen en fase de contraste de las células HL-60 tratadas (a la izquierda) y la fluorescencia PI observada de las mismas células (derecha).

Las células CHO-K1 también se inyectaron ópticamente satisfactoriamente utilizando el sistema microfluídico. Como las células CHO son de una línea celular adherente, se necesita una etapa adicional en la preparación de las células para crear una suspensión celular. Las células se suspendieron añadiendo 1 ml de Tripsina-EDTA e incubando las células durante 5 minutos. Esta suspensión se aclaró entonces con opti-MEM por medio de centrifugación como se ha descrito previamente. Bajo el mismo flujo microfluídico y condiciones de láser, se alcanzó un eficacia de inyección de 34,2 \pm 13,1 % con una eficacia correlativa de 31,0 \pm 9,5 %.

El uso de un equipo experimental que tiene una sección de poración/permeabilización en que, las células fluyen a lo largo de un haz "no difractante", permite que se utilicen mayores velocidades de flujo a la vez que se mantienen dosis adecuadas para la inyección óptica de de sustancias impermeables a la membrana celular. Esto ha dado lugar a un aumento del orden de magnitud en el rendimiento en comparación con la estrategia ortogonal previa para la fotoporación microfluídica (R.F. Marchington et al, Optics Express, 2010, 1,33-36). Como la dosis de tiempo está gobernada por la velocidad de las células a través del canal, este se puede cambiar fácilmente alterando las tasas de flujo total a la vez que se mantiene un buen confinamiento en la región central del canal.

Un experto apreciará que son posibles variaciones en las disposiciones desveladas sin alejarse de la invención. Por ejemplo, se podrían incorporar otras funcionalidades en el mismo chip como las ópticas de poración. En particular, la fluorescencia interna en el chip se podría utilizar para distinguir satisfactoriamente las células inyectadas o controlar la viabilidad celular (utilizando un tinte de viabilidad tal como el yoduro de propidio o la calceína AM por ejemplo, y se podría opcionalmente introducirse en el chip). Se podría utilizar una clasificación activada por fluorescencia (FACS) u otras técnicas de clasificación para fraccionar las células antes o después del procedimiento de fotoporación. La mezcla de fluido y/o las regiones de filtrado en el chip también se pueden proporcionar. En consecuencia la descripción anterior de las realizaciones específicas se hace solo a modo de ejemplo y no con fines de limitación. Será claro para el experto que se pueden realizar modificaciones menores sin cambiar significativamente la operación descrita.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un sistema microfluídico de permeabilización celular para la permeabilización de una o más células en un flujo de fluido, comprendiendo el sistema un canal microfluídico (16) para la canalización de al menos una célula en un flujo de fluido y una fuente óptica que genera un haz de luz para la permeabilización de al menos una célula, en donde canal microfluídico (16) comprende una parte de permeabilización (20), en la cual, en uso, las células se permeabilizan, que se caracteriza por que el canal (16) y la fuente están dispuestos de manera que, en uso, el haz de luz y el flujo de fluido son colineales en dicha parte de permeabilización (20) del canal (16).
- 10 2. Un sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende medios de dirección de células para dirigir las células a una región de confinamiento contenida en el flujo de fluido en la parte de permeabilización (20).
- 15 3. Un sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 2, en el que los medios de dirección de las células se basan en el enfoque hidrodinámico y/o los medios de dirección celular comprenden una boquilla tridimensional.
4. Un sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en el que el haz de luz se extiende sobre un volumen que incluye la región de confinamiento.
- 20 5. Un sistema microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal de fluido (16) tiene una curva y el haz de luz se acopla al canal (16) en la curva.
6. Un sistema microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal de fluido (16) tiene "forma de L" o "forma de S" o "forma de U".
- 25 7. Un sistema microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal (16) y la fuente óptica están dispuestos de tal manera que, en la parte de permeabilización (20), el flujo celular se mueve en una dirección opuesta a la de propagación del haz de luz.
- 30 8. Un sistema microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende medios para variar el perfil de intensidad del haz de luz.
9. Un sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el medio de variación del perfil de intensidad de luz incluye lentes axicon (22) y/o un modulador espacial de luz.
- 35 10. Un sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en el que los medios de variación del perfil de intensidad del haz de luz son operables para generar un haz de luz no difractante.
- 40 11. Un sistema microfluídico de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el haz de luz no difractante es un haz de Bessel que es invariante en su propagación a lo largo de la longitud de la parte de permeabilización (20) del canal (16).
12. Un sistema microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se proporcionan una o más entradas (25, 26) para introducir uno o más fluidos adicionales en el canal microfluídico (16).
- 45 13. Un sistema microfluídico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal microfluídico (16) y la fuente óptica están internos en el chip formando un dispositivo interno en el chip integrado.
- 50 14. Un método de permeabilización de una o más células en un flujo de fluido en un sistema microfluídico **que se caracteriza por que** dicho método comprende la exposición de las células en un fluido a un haz de luz que es colineal con la dirección del flujo de fluido.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 14, en que el haz de luz es un haz de Bessel.

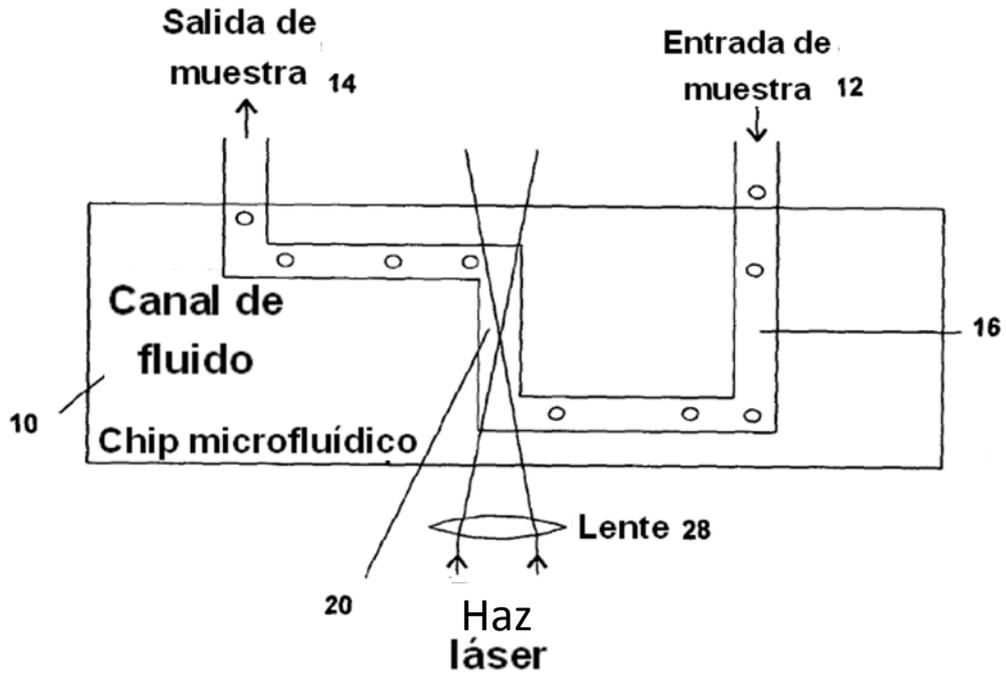


Figura 1

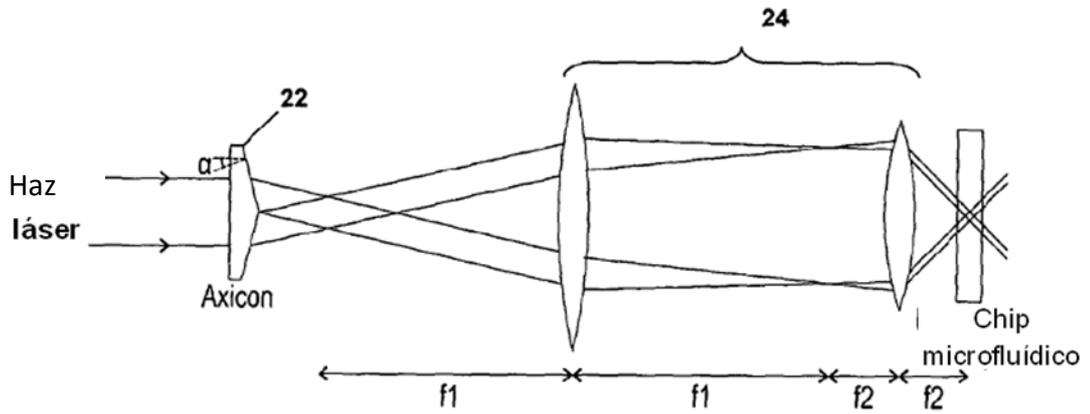


Figura 2

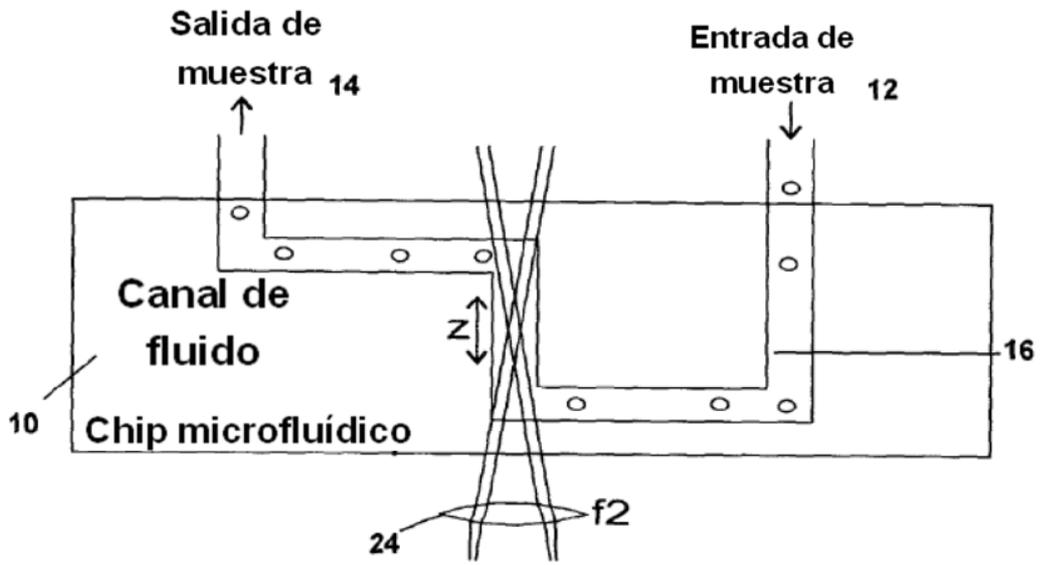


Figura 3

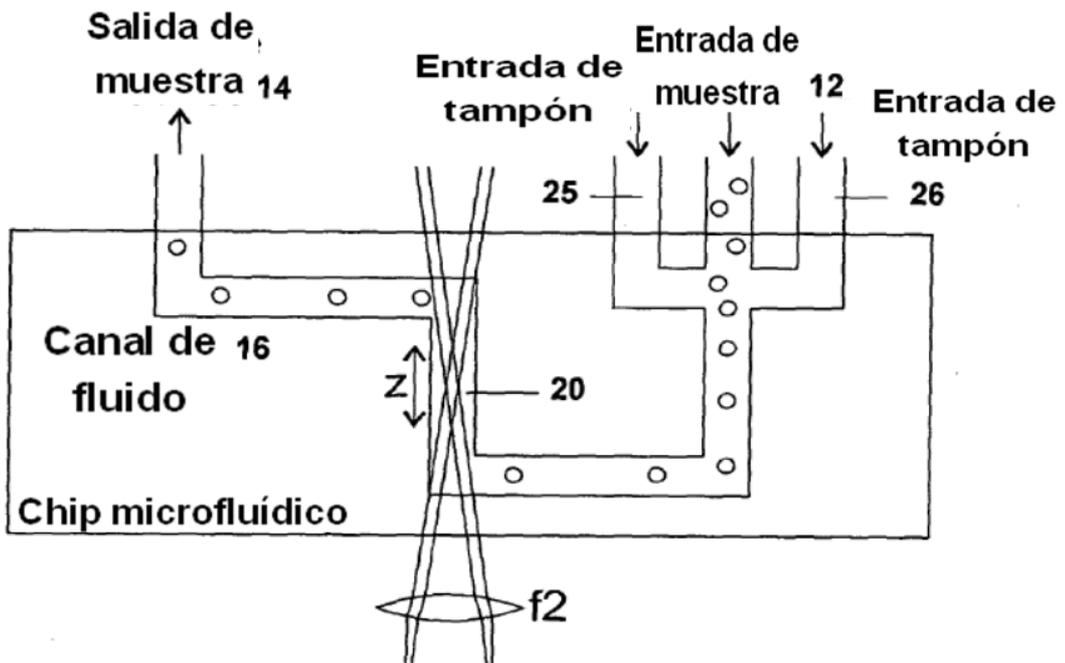


Figura 4

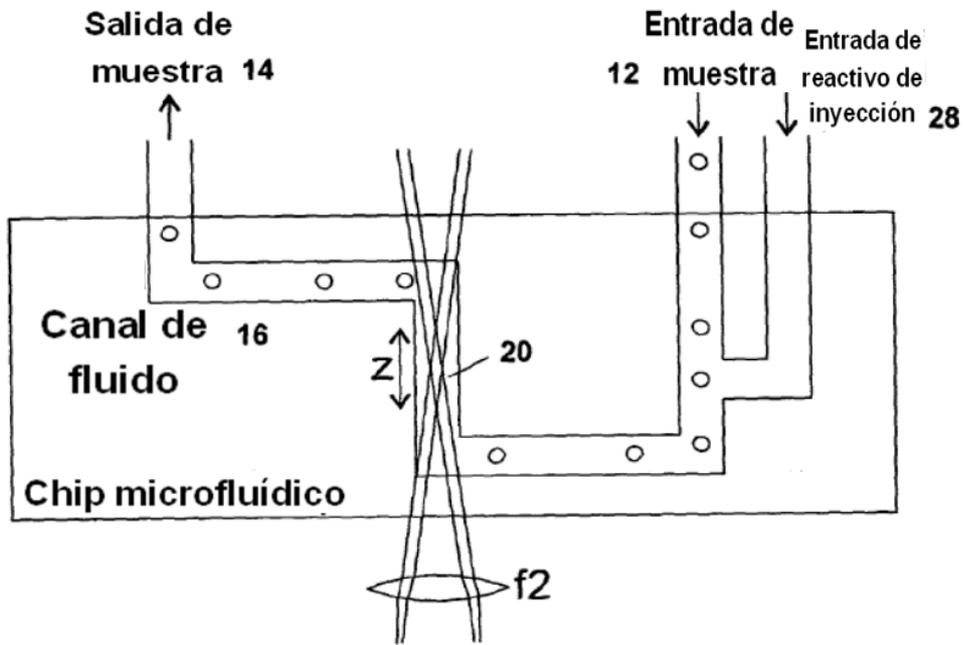


Figura 5

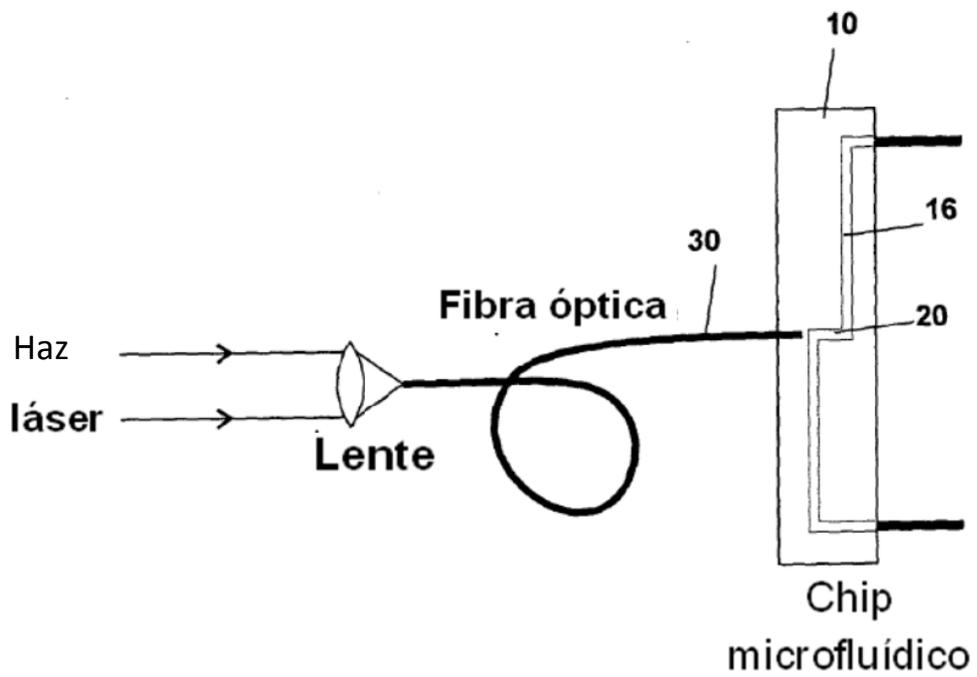


Figura 6

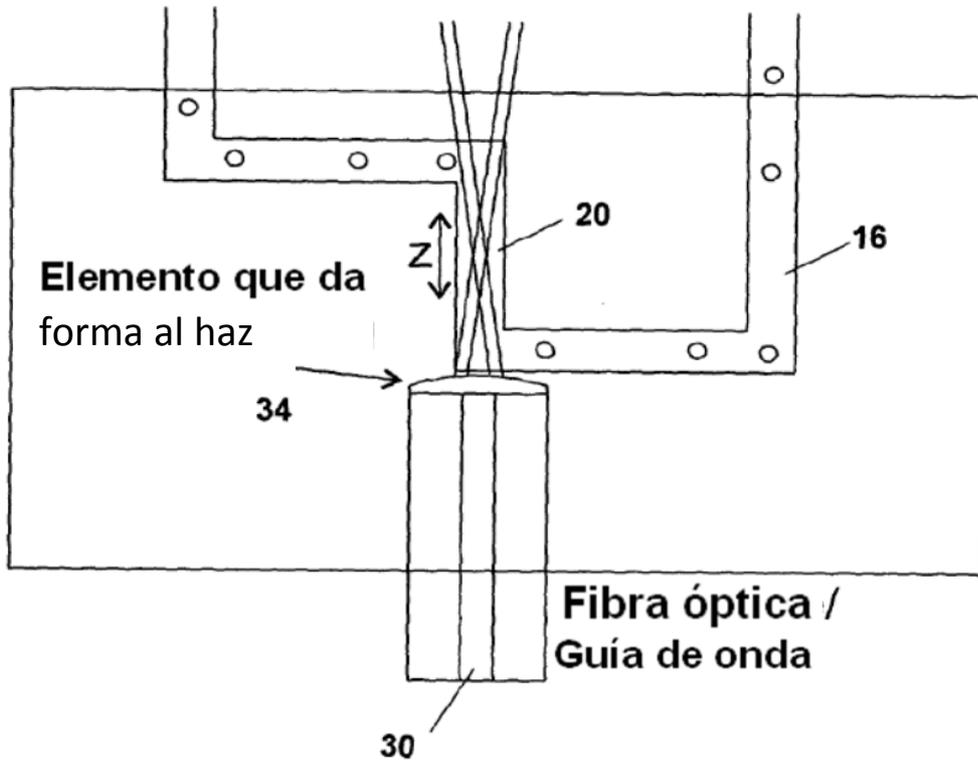


Figura 7

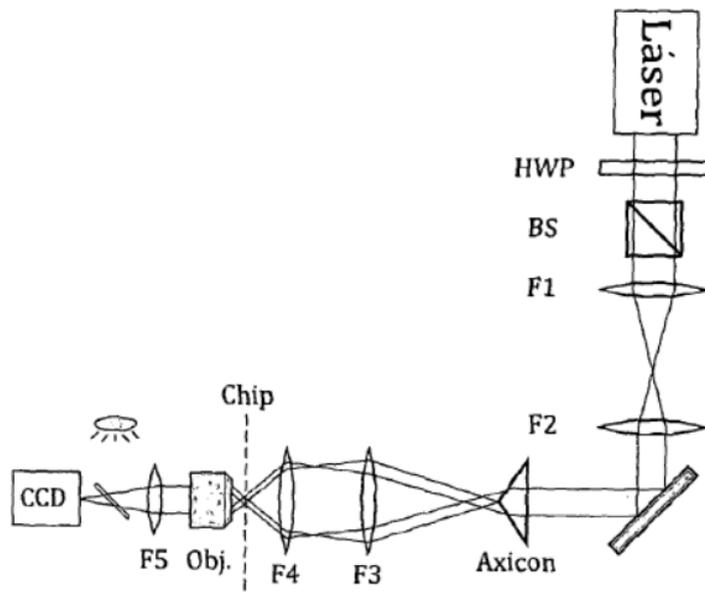


Figura 8

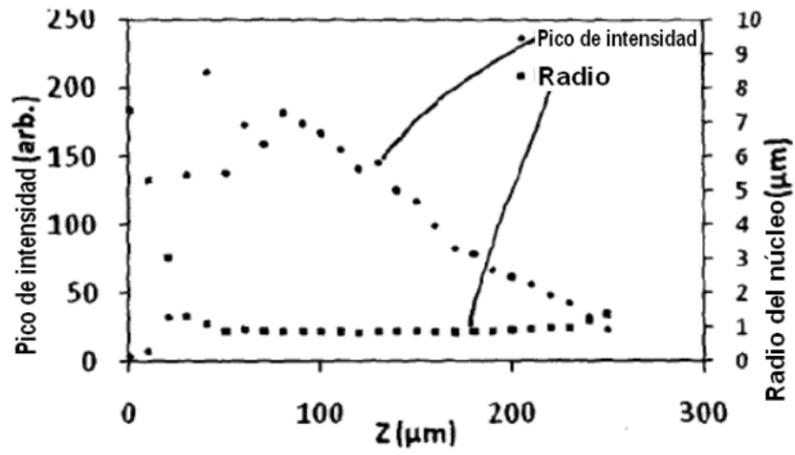


Figura 9

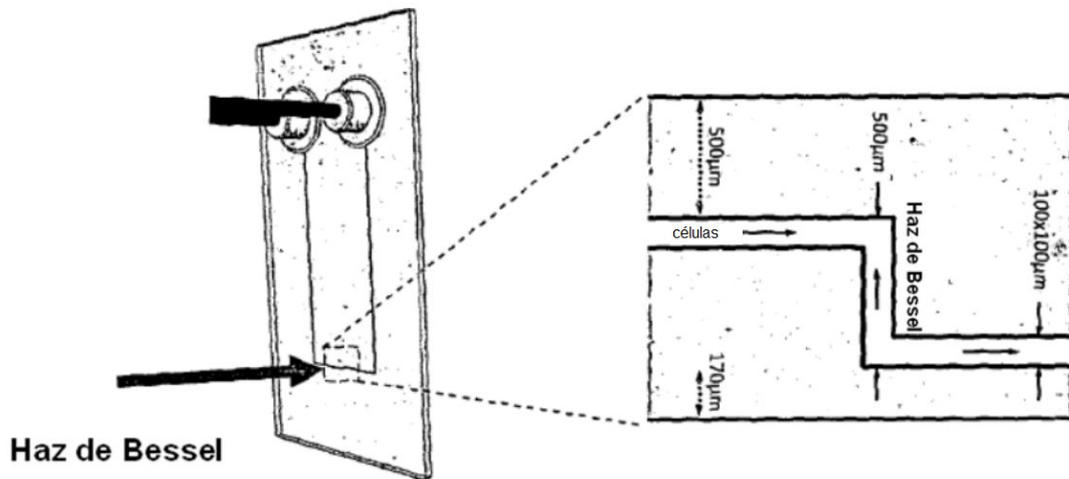


Figura 10

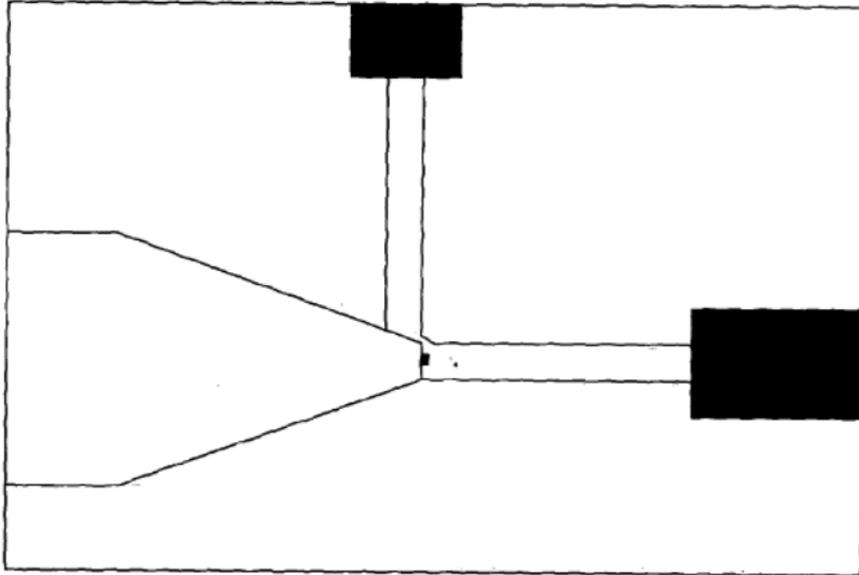


Figura 11

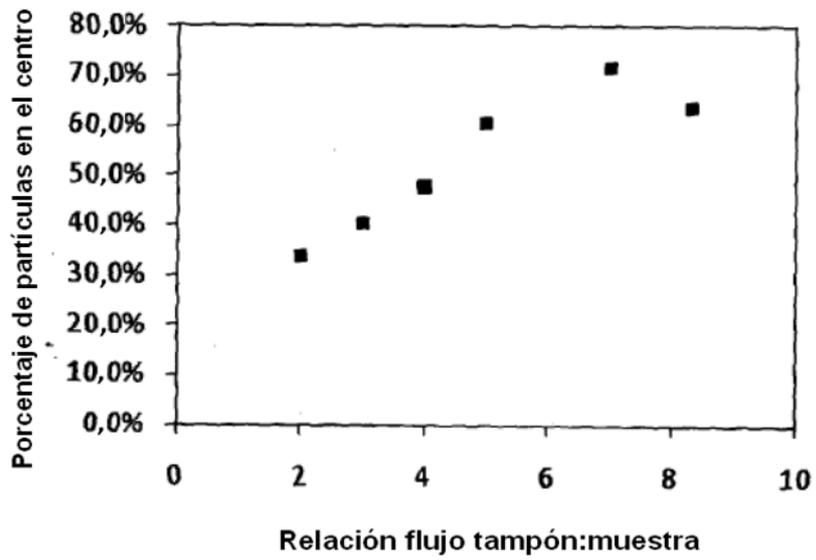


Figura 12

Figura 13

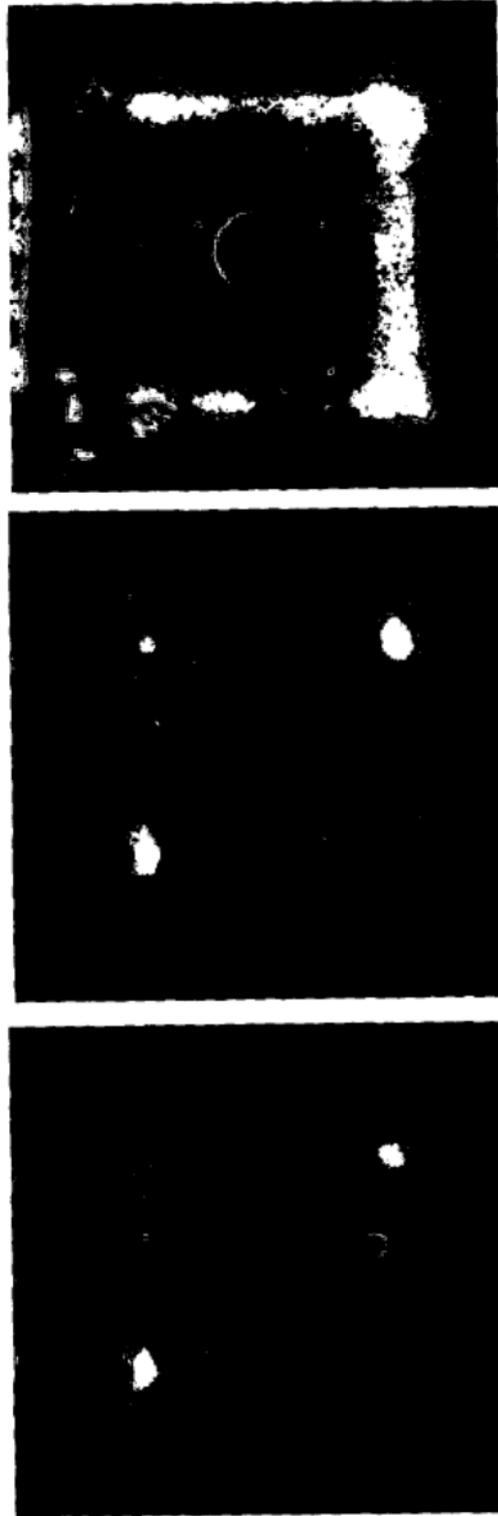




Figura 15