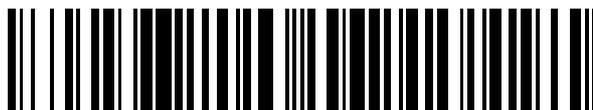


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 562 433**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

G21K 1/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07823906 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2063988**

54 Título: **Clasificación óptica de células**

30 Prioridad:

21.09.2006 GB 0618605

15.01.2007 GB 0700737

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

04.03.2016

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY COURT OF THE UNIVERSITY
OF ST. ANDREWS (100.0%)
College Gate, North Street
St. Andrews, Fife KY16 9AJ, GB**

72 Inventor/es:

**MACDONALD, MICHAEL;
DHOLAKIA, KISHAN y
ANDREEV, IGOR**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 562 433 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

Clasificación óptica de células

5 La presente invención se refiere a la clasificación óptica de células

Antecedentes de la invención

10 Existen numerosos esquemas de clasificación o separación de partículas, que van desde electroforesis en gel, electroforesis capilar y centrifugación analítica, hasta las novedosas barreras entrópicas. J. Han, H. G. Craighead, *Science* 288, 1026-1029 (12 de mayo de 2000) y D. Nykypanchuk, H. H. Strey, D. A. Hoagland, *Science* 297, 987-990 (9 de agosto de 2002) describen ejemplos de estos esquemas. La mayoría de estas técnicas conocidas separan una mezcla polidispersa en un fluido que fluye en bandas que contienen partículas que se desplazan a diferentes velocidades por la dirección del flujo. Normalmente esto conduce a un procesamiento por lotes. En la electroforesis se utiliza un gel para obtener una movilidad dependiente del tamaño. La recuperación de las fracciones se consigue mediante el procesamiento posterior del gel. Sin embargo, a pesar de su uso y eficacia extendidos, esta metodología es lenta y cabe destacar que, debido al tamaño limitado del poro, presenta dificultades para separar objetos a nivel de tamaño microscópico, por ejemplo células, cromosomas y materia coloidal.

20 Asimismo, se utilizan geles artificiales asimétricos bidimensionales fabricados de forma litográfica. Ejemplos de estos se describen por D. Ertas, *Physical Review Letters* 80, 1548-1551 (16 de febrero de 1998); T. A. I Duke, R. H. Austin, *Physical Review Letters* 80, 1552-1555 (16 de febrero de 1998) y C. F. Chou *et al.*, *Biophysical Journal* 83, 2170-2179 (octubre de 2002). Estos geles proporcionan una separación transversal respecto a la dirección del flujo. Debido a esto, pueden operarse de forma continua, con diversas fracciones recogidas mediante canales de recogida diferentes. No obstante, la clasificación basada en la difusión resulta poco práctica por su lentitud a escala microscópica.

30 En los últimos años se ha experimentado un crecimiento en la exploración del movimiento de partículas en entornos ópticos. Un ejemplo de esto se describe en el artículo "*Kinetically Locked-in Colloidal Transport in an Array of Optical Tweezers*" de P. T. Korda *et al.*, *Physical Review Letters* 89, número 12, art. n.º 128301 (16 de septiembre de 2002). En este caso, se deja que una monocapa de esferas coloidales fluya por una serie de capturas ópticas distintas. Variando la orientación de la serie de capturas, puede variar la dirección del flujo de las esferas. Por este motivo, se ha sugerido que podría utilizarse la red para fraccionar de manera continua partículas mesoscópicas. Sin embargo, debido al uso de una red de capturas distintas localizadas, la canalización bloqueada de manera cinética observada por vectores reticulares de bajo índice se limitó intrínsecamente a desviaciones de ángulo pequeño. En la práctica, esto limita la funcionalidad de la red para su uso en el fraccionamiento.

40 El documento PCT/GB2004/001993 describe otro esquema de fraccionamiento óptico. En este caso, se utilizan redes ópticas tridimensionales para la clasificación y el fraccionamiento de material biológico y coloidal en un flujo microfluídico. Las partículas diferentes siguen trayectorias distintas a través del entorno y, en consecuencia, salen en puntos diferentes. La selectividad y la base de esta forma de clasificación es la afinidad de partículas obtenidas en las características del entorno óptico. Esto también se describe por M. MacDonald, G. Spalding y K. Dholakia, en *Nature* 426, 421 (2003), y por A. M. Lacasta, *et al.*, en *Physical Review Letters* (2005), 94, 188902. Incluso en ausencia de flujo de fluidos pueden utilizarse patrones ópticos periódicos para la clasificación, véase, L. Paterson *et al.*, *Applied Physics Letters* (2005), 87, 123901.

50 El documento US 2006/0177940 describe un método para separar y analizar partículas en un flujo microfluídico. El método comprende proporcionar un canal microfluídico con una serie de capturas ópticas estáticas dispuestas en su interior. A continuación se proporciona un flujo de la solución a través del canal, en el que la solución contiene una o más partículas. Las partículas se separan, se desvían o se retienen mediante capturas ópticas estáticas que se posicionan en una forma predeterminada, y, si se desea, se centran en una trayectoria para fines analíticos.

En el documento US 2006/0170912 se desvela un método adicional de clasificación de células.

55 Sumario de la invención

Según la presente invención, se proporciona un método y un sistema de clasificación definidos en las reivindicaciones independientes. Algunas características preferentes se definen en las reivindicaciones dependientes.

60 Proporcionando una disposición muy simple de canal y clasificando de forma óptica células en este canal, no se requiere separación física de células clasificadas en canales separados.

65 De manera adicional o alternativamente, el segundo proceso óptico puede ser alguna forma de espectroscopia, tal como espectroscopia Raman, descrita en nuestra solicitud de patente en trámite GB 0611289.0.

La clasificación óptica puede realizarse utilizando un entorno o patrón óptico definido por un dispositivo acústico-óptico, descrito en nuestra solicitud de patente en trámite GB 0618606.8.

Breve descripción de los dibujos

5 A continuación se describirán diversos aspectos de la invención, solo a modo de ejemplo, y con referencia a los dibujos adjuntos, de los cuales:

10 La Figura 1 es una sección transversal de un canal microfluídico con una región de clasificación celular y una región de eliminación celular;
 La Figura 2 muestra una variante en la disposición de la Figura 1, y
 La Figura 3 muestra una disposición alternativa de clasificación celular microfluídica.

Descripción específica de los dibujos

15 Las Figuras 1 y 2 muestran un canal único microfluídico para clasificar, por ejemplo células. El canal es cilíndrico con una sección transversal constante, sus extremos definen una entrada y una salida. El canal presenta una región de clasificación en serie con una región de procesamiento celular, por ejemplo una región de eliminación celular óptica. Se inyecta un analito de interés en un extremo del microcanal, que fluye por el canal y en la región de clasificación,
 20 en la que la clasificación se realiza utilizando medios ópticos.

Las técnicas para realizar esto se conocen en la materia y por tanto no se describirán con detalle. La clasificación óptica se realiza utilizando una disposición óptica que es eficaz en una región localizada del canal, y no a lo largo de
 25 toda su longitud.

Una vez clasificadas las células, se desplazan corriente abajo en el flujo de fluidos en dirección a la región de eliminación celular. Esta región se extiende solo parcialmente sobre la trayectoria del flujo, por lo que algunas células entran en ella, pero otras no. En esta región las células se eliminan mediante un láser que las hace o bien
 30 inviables o las destruye. Para lograr esto, una parte, normalmente el centro, del canal, que se mide a lo ancho, se ilumina con un láser en una longitud de onda y potencia media/potencia máxima que destruirá o dañará cualquier célula. El material que luego se recoge desde el otro extremo del conducto contiene un flujo enriquecido en células, ya que solo las células que no han pasado por la región de eliminación son viables.

La Figura 1 muestra cómo puede crearse un flujo puro de células a partir de una mezcla de células A y B, pero con
 35 la pérdida de casi la mitad de las especies de células deseadas. En este caso, la región de eliminación celular se extiende sobre una parte inferior del canal y el potencial/entorno óptico en la región de clasificación óptica se dispone de manera que las células B se desvían en dirección a la parte inferior del canal, pero las células A no se ven sustancialmente afectadas y permanecen repartidas en el canal. Cuando la mezcla de partículas fluye en dirección a la región de eliminación celular, las células A están presentes en la región superior del canal, pero una
 40 mezcla de las células A y B está presente en la región inferior del canal. Puesto que la región de eliminación celular se extiende parcialmente sobre la parte inferior del canal, las células A en la región superior pasan sin verse afectadas, mientras que las células en la mezcla A y B se dañan o destruyen o de otro modo permanecen biológicamente inactivas. Por lo tanto, en la salida del canal solo se encuentran activas las células A, proporcionando así un analito enriquecido.

45 La Figura 2 muestra una variante de la Figura 1, en la que una mezcla de muestra de células A y B puede clasificarse y procesarse para proporcionar un enriquecimiento de aproximadamente 50 %, mientras garantiza al mismo tiempo que no se destruyan células de las especies deseadas. En este caso, la región de eliminación celular se extiende sobre la parte superior del canal. Como antes, el potencial/entorno óptico en la región de clasificación
 50 óptica se dispone de manera que las células B se desvían en dirección a la parte inferior del canal según fluya el fluido por la región de clasificación celular, pero las células A no se ven sustancialmente afectadas y permanecen repartidas a través del canal. Por consiguiente, cuando la mezcla de células A y B fluye en dirección a la región de eliminación celular, las células A están presentes en la región superior del canal, pero una mezcla de células A y B está presente en la región inferior del canal. En este caso, puesto que la región de eliminación celular se extiende
 55 parcialmente sobre la región superior del canal, las células A solo se exponen a la radiación de eliminación. Por consiguiente, como la llamada mezcla A y B fluye por la región de eliminación celular, las células A en la región superior se vuelven biológicamente inactivas, mientras que las células en la mezcla A y B en la zona inferior no se ven afectadas.

60 Mientras que la disposición de la Figura 2 da lugar a una mezcla de células vivas en la salida, esta mezcla presentará más células B que células A. Volviendo a circular el fluido se producirán mayores niveles de enriquecimiento. Esto podría lograrse simplemente mediante el cambio de las regiones de clasificación y eliminación celular, invirtiendo el flujo y reiniciando el proceso. Este enfoque podría ser fascinante cuando se intenta clasificar las especies celulares con una población muy baja en comparación con otros tipos celulares en el analito.

65 Se utilizan las disposiciones de la Figura 1 o la Figura 2 en función de la relación de las especies celulares que

entran en el canal, del nivel de enriquecimiento requerido por el usuario, sin tener en cuenta que sea aceptable o no perder el 50 % de las células deseadas.

- 5 Podrían procesarse las células clasificadas como alternativa para causar daños. Por ejemplo, en el ejemplo de la Figura 1, las células A en la parte superior del canal podrían orientarse selectivamente y formar poros mediante un segundo láser, de manera tal que puede transfectarse en ellas un agente químico o genético en el medio. Como ejemplo, la transfección podría utilizarse para ensayar la resistencia a antibióticos o para expresar la proteína verde fluorescente. En una realización preferente, la salida del láser de formación de poros se encuentra en forma de un haz de Bessel pero también puede logarse con un haz gaussiano. Como se describe en el documento
- 10 WO2006/059084, esto puede proporcionar ventajas técnicas significativas. Por consiguiente, en la salida habrá una población seleccionada de células que se han tratado. Otra opción es obtener datos Raman de las células clasificadas. Esto puede realizarse utilizando las técnicas descritas en nuestra solicitud de patente en trámite GB 0611289.0.

REIVINDICACIONES

1. Un método para clasificar una mezcla de células diferentes, que comprende:
 - 5 proporcionar un canal único con solo una salida;
introducir en el canal una mezcla de células en un fluido;
en una región de clasificación del canal, desviar de forma óptica un tipo de células de la mezcla de células a fin de provocar que las células desviadas fluyan en dirección a o se desvíen de una región de procesamiento celular que se extiende solo parcialmente a lo ancho del canal corriente abajo de la región de clasificación del canal, y
 - 10 destruir o desactivar, por medio de un haz de láser, solo las células que fluyen en la región de procesamiento celular o tratar y/o muestrear células que fluyen en la región de procesamiento celular, y/o medir una característica de las células que fluyen en la región de procesamiento celular.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el canal único presenta una entrada única y la mezcla de tipos celulares se introduce por esa entrada.
3. Un método según la reivindicación 1, en el que el tratamiento de células que fluyen en la región de procesamiento celular comprende la formación de poros en las células de la región de procesamiento celular.
- 20 4. Un método según la reivindicación 3, que comprende introducir material en las células sometidas a la formación de poros.
5. Un método según la reivindicación 1, en el que medir una característica de las células que fluyen en la región de procesamiento celular comprende realizar una medición espectroscópica.
- 25 6. Un método según la reivindicación 5, en el que la medición espectroscópica es un espectro Raman.
7. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal único es un microcapilar.
- 30 8. Un sistema para clasificar células, que comprende un canal único con solo una salida y medios de desviación óptica de células dentro de ese canal en una región de clasificación del canal a fin de provocar que las células desviadas fluyan en dirección a o se desvíen de una región de procesamiento celular corriente abajo de la región de clasificación del canal, en donde la región de procesamiento celular se extiende solo parcialmente a lo ancho del canal, y
- 35 un láser para destruir o desactivar solo las células que fluyen en la región de procesamiento celular o medios para tratar y/o muestrear células que fluyen en la región de procesamiento celular y/o medios para medir una característica de las células que fluyen en la región de procesamiento celular.
9. Un sistema según la reivindicación 8, en el que el canal único tiene una entrada única y una mezcla de células se introduce por esa entrada.
- 40 10. Un sistema según la reivindicación 8, en el que los medios de tratamiento comprenden un láser que permite efectuar una formación de poros en células de la región de procesamiento celular.
- 45 11. Un sistema según la reivindicación 10, que comprende medios para introducir material en las células a las que se han practicado poros.
12. Un sistema según la reivindicación 8, que comprende medios para medir un espectro característico, opcionalmente medios para medir un espectro Raman.
- 50 13. Un sistema según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en el que el canal único es un microcapilar.

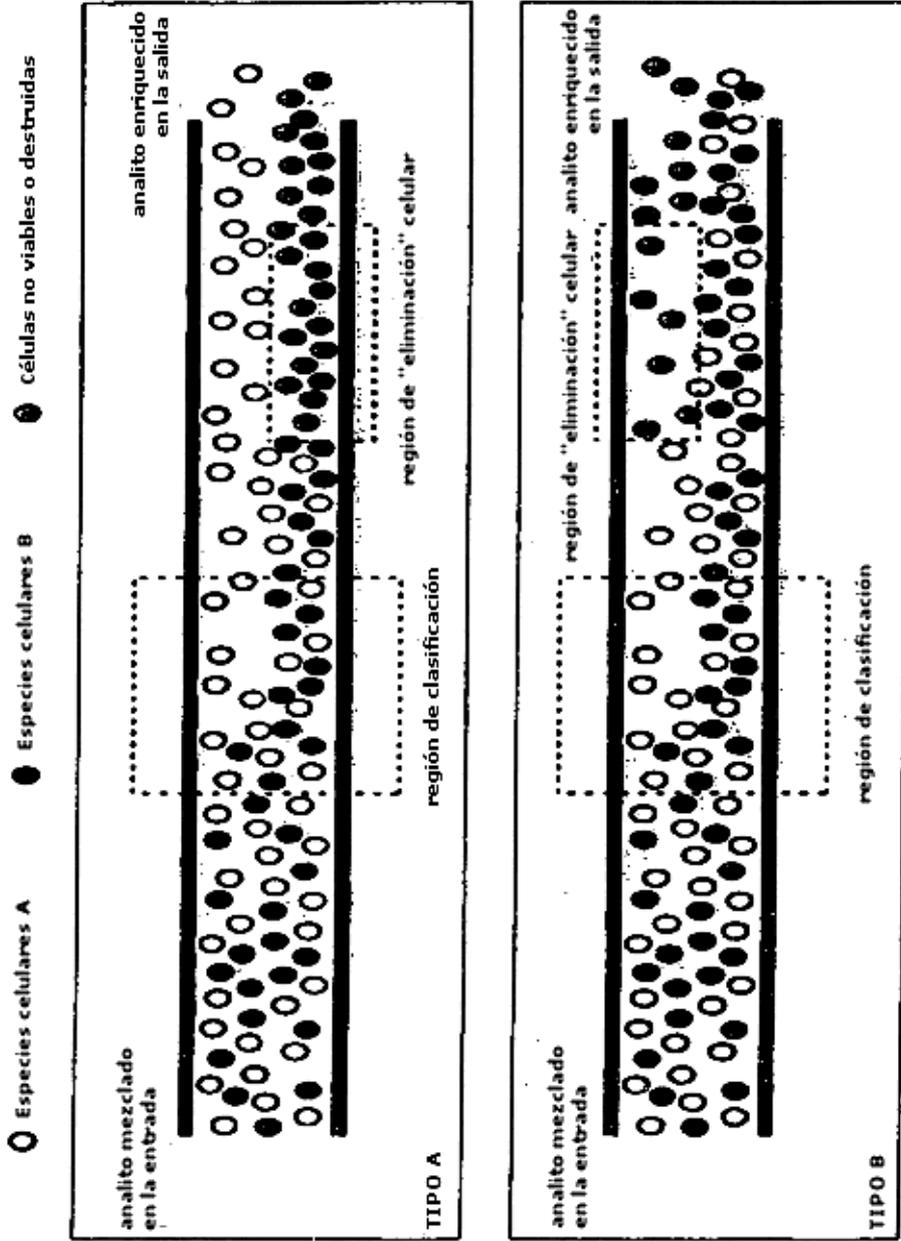


Figura 1

Figura 2