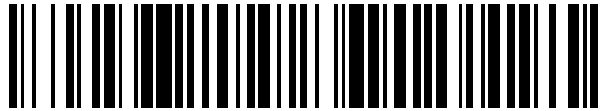


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 626 611**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/US2012/032356**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12138882**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12768609 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.01.2017 EP 2694965**

54 Título: **Sistema microfluídico usando micro-aberturas para la detección de alto rendimiento de entidades**

30 Prioridad:  
**05.04.2011 US 201161471762 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.07.2017**

73 Titular/es:  
**PURDUE RESEARCH FOUNDATION (100.0%)  
1801 Newman Road  
West Lafayette, IN 47906, US**

72 Inventor/es:  
**SAVRAN, CAGRI A.;  
LOW, PHILIP S. y  
CHANG, CHUN-LI**

74 Agente/Representante:  
**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 626 611 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Sistema microfluídico usando micro-aberturas para la detección de alto rendimiento de entidades

**REIVINDICACIÓN DE PRIORIDAD**

5 La presente solicitud es una solicitud no provisional que reivindica prioridad a la solicitud provisional en tramitación junto con la presente N.º de serie 61/471.762, presentada el 5 de abril de 2011, en nombre de los mismos inventores, cuya divulgación entera se incorpora en el presente documento por referencia.

**CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere generalmente a la microfluídica y particularmente a la detección de células elegidas como diana presentes en fluidos de muestra.

**10 ANTECEDENTES**

15 Las células tumorales circulantes (o CTC) son células raras presentes en la sangre de pacientes metastásicos con cáncer. La detección cuantitativa de CTC es importante para la detección precoz de cáncer, además de la monitorización de la progresión de la enfermedad y respuesta a terapia. El recuento de CTC se correlaciona con la carga tumoral global y puede frecuentemente servir de indicadores más fiables de enfermedad metastásica que los marcadores de enfermedad moleculares. Por ejemplo, el nivel de antígeno específico de la próstata (PSA) puede frecuentemente subir debido a hiperplasia prostática benigna (común en personas de más de 60) y, por lo tanto, puede no necesariamente indicar cáncer.

20 La presencia de un número significativo de CTC puede ser un indicador fiable de la presencia de cáncer. Por tanto, la posible reaparición después de la cirugía puede detectarse mucho antes por CTC que por la mayoría de los marcadores moleculares. Otra ventaja es que las CTC pueden ser además interrogadas después de la detección; la secuenciación del genoma y transcriptoma podrían revelar las mutaciones que habían conducido al cáncer, además de los niveles de expresión de los genes en cuestión. Las células también pueden cultivarse, hacerse crecer y probarse con diferentes combinaciones de agentes quimioterapéuticos para el descubrimiento de fármaco y la medicina personalizada.

25 La detección de CTC, sin embargo, es una tarea exigente debido a su escasez en muestras de sangre, tan solo una célula individual en muestras de sangre de múltiples mililitros (ml). El actual enfoque favorecido para detectar células completas en entornos clínicos y de laboratorio es la citometría de flujo, en la que las células marcadas se detectan a medida que circulan en una única fila a través de un detector óptico. Esta tecnología se usa ampliamente del análisis de vacunas para la monitorización de SIDA. Sin embargo, el alto coste y el gran tamaño de los citómetros de flujo normalmente limitan este enfoque de prueba a instalaciones centrales compartidas por muchos usuarios. Además, como las células tienen que pasar a través de una porción detectora de los citómetros de flujo en un modo de fila única, el rendimiento de la muestra volumétrica es relativamente bajo y los citómetros necesitan ser operados largos tiempos para analizar grandes muestras. Para las llamadas células "raras" - es decir, células que son escasas en una muestra de fluido, tales como células CTC - pueden requerirse muestras de volumen relativamente grandes para encontrar las células. En este caso, los citómetros de flujo actuales pueden ser prohibitivamente caros para el frecuente uso de diagnóstico.

40 Se han desarrollado detectores de celda microfluídica para vencer las limitaciones de coste y de tamaño de los citómetros de flujo tradicionales en ciertas aplicaciones. Estos sofisticados sistemas pueden interrogar satisfactoriamente pequeñas muestras, del orden de  $\mu\text{l}$  (microlitros), pero se ha encontrado que tales sistemas tienen capacidad limitada para analizar grandes muestras, del orden de múltiples ml. La mayoría de los sistemas microfluídicos ofrecen buen rendimiento en el análisis de volúmenes de muestra pequeños del tamaño de microlitros o nanolitros. Sin embargo, debido a sus dimensiones de micrómetros, los detectores microfluídicos "laboratorio en un chip" necesitan muchas horas para procesar grandes volúmenes de muestra del tamaño de mililitros. Caudales lentos en ensayos microfluídicos son normalmente a consecuencia de las dimensiones a escala micrométrica de los canales detectores. Estas dimensiones son necesarias para aumentar la probabilidad de que una célula rara (es decir, una CTC) se una sobre las paredes de los microcanales y en algunos casos para aumentar la relación de señal con respecto a ruido del mecanismo de detección subyacente. Así, los detectores de celda microfluídica previos pueden ser generalmente ineficientes y pueden requerir tiempos de análisis prohibitivamente largos para analizar las muestras de gran volumen necesarias para la detección de dianas raras como CTC.

50 En un sistema de detección microfluídico desarrollado por los grupos de Toner y Haber del Hospital General de Massachusetts, se puebla un laboratorio sobre un chip con posiciones de  $100\ \mu\text{m}$  de diámetro funcionalizadas con anticuerpo separadas  $50\ \mu\text{m}$  para crear trayectorias de flujo de fluidos. En otro diseño de chip, los puestos se sustituyeron con una estructura en espiguilla para ayudar activamente en la mezcla de las células y aumentar su probabilidad para unirse a las paredes funcionalizadas. En estos estudios, los caudales usados con muestras clínicas fueron del orden de 1 ml por hora, tasa a la que el procesamiento de una muestra de sangre típica de 7,5 ml podría durar muchas horas. Con el fin de reducir los tiempos de transporte fluido a un nivel manejable de minutos en vez de horas, el caudal a través de estos sistemas previos tendría que aumentarse uno o dos órdenes de

magnitud. En general, las modificaciones necesarias a los sistemas microfluídicos previos pueden ser problemáticas debido a que: 1) la resistencia fluidica de los canales de flujo de tamaño de micrómetros y las macro a micro-conexiones asociadas serían muy altas; 2) un alto caudal a través de una pequeña área de sección transversal produciría una alta "velocidad lineal" que crearía tensiones de cizallamiento más allá de los niveles que podrían ser sostenidos por la unión anticuerpo/célula sobre la pared del dispositivo y conducir al desprendimiento de las células; y 3) una velocidad lineal demasiado alta afectaría perjudicialmente la eficiencia de captura de las células diana en el primer sitio. El aumentar el tamaño de los canales permitiría caudales más altos, pero esto reduciría significativamente la probabilidad de la interacción de las células diana con las paredes funcionalizadas.

En el caso de otros dispositivos microfluídicos que usan técnicas de detección electrónica, dimensiones más grandes reducirían la sensibilidad de detección del dispositivo, ya que la mayoría de los microdispositivos necesitan alguna forma de enfocar las dianas sobre una pequeña área sensora para la detección. Otros investigadores han puesto paralelos sus detectores microfluídicos (muchos micro-canales unos al lado de los otros) para vencer el problema de rendimiento. Sin embargo, los caudales que se usan pueden ser del orden de solo 10 microlitros ( $\mu\text{l}$ ) por minuto, que puede conducir a horas de tiempo para procesar las muestras de gran volumen necesarias para la detección de CTC.

Un sistema de detección de células raras de alto rendimiento todavía relativamente simple y robusto sería altamente beneficioso en muchos ámbitos de investigación y clínicos. Por tanto, se necesita un aparato sensor que pueda detectar células raras, tales como CTC, en sangre completa en un modo de alto rendimiento por el que se procesan fluidos de muestra a tasas de mililitros por minuto (a diferencia de microlitros por minuto) para capturar las células contenidas. Un sistema tal también sería altamente útil en detectar diversos otros tipos de células, bacterias y esporas presentes en fluidos de muestra o en el entorno.

El documento US 2005 / 0 148 064 A2 desvela un dispositivo microfluídico para fraccionar y/o atrapar moléculas seleccionadas con una membrana porosa, donde marcas magnéticas son mayores que el tamaño de poro de la membrana porosa.

## SUMARIO

Según un aspecto de las presentes enseñanzas, se desvela un sistema de detección microfluídica para la detección de entidades diana de tamaño de micrómetros en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en el que cada entidad diana unida a una perla magnética tiene una dimensión eficaz más pequeña superior a una dimensión eficaz más grande de cada perla magnética, incluyendo el sistema un componente de detector con micro-aberturas que está configurado para detectar entidades diana unidas por elementos de reconocimiento, tales como perlas magnéticas, en un análisis de alto rendimiento para caudales de mililitros por minuto. En particular, se proporciona un sistema de detección microfluídica para la detección de entidades diana en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en el que cada entidad diana unida a una perla magnética tiene una dimensión eficaz más pequeña superior a una dimensión eficaz más pequeña de cada perla magnética. En un aspecto, el sistema comprende un componente de detector que incluye un cuerpo que define un depósito y un chip sensor en forma de una placa con aberturas dispuesta dentro del depósito y que separa el depósito en una primera cámara y una segunda cámara. La placa incluye una pluralidad de micro-orificios, teniendo cada orificio la dimensión eficaz más pequeña superior a la dimensión eficaz más pequeña de cada perla magnética e inferior a la dimensión eficaz más pequeña de cada entidad diana unida a una perla magnética. En un aspecto, la primera cámara del depósito tiene una primera entrada y una primera salida, en la que la primera entrada está conectada de forma fluida con una fuente de fluido que contiene las entidades diana, mientras que la primera salida está conectada de forma fluida con un recipiente de recogida.

El componente de detector incluye además un imán dispuesto con respecto al depósito de manera que la segunda cámara del depósito y la placa con aberturas estén situadas entre el imán y la primera cámara del depósito. El imán configurado para generar una fuerza magnética suficiente para atraer perlas magnéticas en la primera cámara del depósito a la segunda cámara del depósito. El sistema de detección microfluídica comprende además una bomba para hacer circular continuamente el fluido de la fuente de fluido que contiene las entidades diana a través de la primera cámara del depósito.

Se proporciona un método de detección de entidades diana de tamaño de micrómetros en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en el que cada entidad diana unida a una perla magnética tiene una dimensión eficaz más pequeña superior a la dimensión eficaz más grande de cada perla magnética. En un aspecto, el método comprende: hacer circular continuamente el fluido a través de una primera cámara de un depósito separada de una segunda cámara del depósito por una placa con aberturas, teniendo cada orificio en la placa una dimensión eficaz más pequeña superior a la dimensión eficaz más pequeña de cada perla magnética e inferior a la dimensión eficaz más pequeña de cada entidad diana unida a una perla magnética; y aplicar una fuerza magnética debajo de la placa con aberturas suficiente para extraer perlas magnéticas no unidas a una entidad diana a través de las aberturas en la segunda cámara y suficiente para mantener las entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas contra la superficie de la placa con aberturas dentro de la primera cámara del depósito.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **FIG. 1A** es una vista esquemática de un sistema de detección microfluídica según la presente divulgación.

La **FIG. 1B** es una vista esquemática de una porción del sistema mostrado en la **FIG. 1B** modificado según una realización alternativa.

5 La **FIG. 2** es una vista en sección transversal lateral de un componente de detector según la presente divulgación para su uso en el sistema de detección mostrado en la **FIG. 1**.

La **FIG. 3** es una vista en planta de una placa micro-perforada de chip sensor para su uso en el sistema mostrado en la **FIG. 1A**.

10 La **FIG. 4** es una representación lateral de la operación del chip sensor mostrado en la **FIG. 4A** para capturar células diana y extraer elementos de reconocimiento magnéticos no unidos.

Las **FIGS. 5A-D** son vistas esquemáticas del sistema de detección microfluídico de la **FIG. 1A**, que muestran trayectorias de flujo de fluidos en diferentes etapas de la operación del sistema.

La **FIG. 6** es una imagen microscópica de campo brillante de células diana capturadas sobre un chip sensor según una realización desvelada.

## 15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

Para los fines de promover un entendimiento de los principios de la invención, ahora se hará referencia a las realizaciones ilustradas en los dibujos y descritas en la siguiente memoria descriptiva escrita. Se entiende que mediante la presente no se pretende ninguna limitación al alcance de la invención. Se entiende además que la presente invención incluye cualquier alteración y modificación a las realizaciones ilustradas e incluye además aplicaciones de los principios de la invención como normalmente se producirían para un experto habitual en la materia a la que se refiere la presente invención.

20 La presente divulgación proporciona un sistema microfluídico con un componente de detector que tiene una placa con aberturas o chip configurado para proporcionar análisis de alto rendimiento de ml (mililitros) por minuto de una muestra de fluido que circula a través de canales de flujo relativamente grandes (milímetros (mm) a diferencia de micrómetros ( $\mu\text{m}$ )). La muestra de fluido puede ser un fluido corporal que incluye, pero no se limita a, sangre completa, sangre procesada, suero, plasma, saliva y orina, o fluidos medioambientales, que incluyen, pero no se limitan a, muestras de líquido de ríos, líneas de aguas residuales, instalaciones de procesamiento de agua y fábricas. Usando perlas funcionalizadas capaces de unirse a células diana en tres dimensiones, el sistema elimina la necesidad de unión basada en afinidad química de las células a una superficie de chip bidimensional estacionaria. El sistema usa tanto flujo de fluidos convectivo para ayudar en el transporte de masas de células diana unidas por perlas magnéticas funcionalizadas, como tamizado magnético de las células unidas sobre una placa o chip con micro-aberturas que captura las células pero permite que perlas magnéticas libres (es decir, aquellas no unidas a células diana) pasen a través de las aberturas. En ciertas realizaciones, las perlas magnéticas sirven simultáneamente para: 1) unión basada en afinidad de células diana específicas; 2) transporte magnético de las células unidas a la superficie de placa o chip; y 3) generación de señales de reconocimiento o de marca para la detección. El novedoso sistema fluido de la presente divulgación puede analizar grandes cantidades de fluidos de muestra, que incluyen cantidades clínicamente significativas de fluidos corporales tales como sangre completa, en una cantidad de tiempo relativamente corta.

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

40 En una realización, se proporciona una bomba **40** para hacer circular fluido de la fuente de muestra **S** a través del primer segmento de flujo **13** del componente de detector **12**. En la realización mostrada en la **FIG. 1**, la bomba **40** está integrada en el conducto de salida **36** para extraer fluido a través del componente de detector. Sin embargo, se contempla que la bomba **40** puede estar situada dentro del conducto de entrada **35**, según se desee. La realización de la **FIG. 1A** incluye además una segunda bomba **41** que está integrada en el conducto de salida **14b** para hacer circular el fluido de tampón de la fuente **B** a través del segundo segmento de flujo **14** del componente de detector **12**. La bomba **41** puede proporcionarse en el conducto de entrada **38** para extraer fluido de tampón de la fuente **B** y bombearlo a través del segundo segmento de flujo **14**. Alternativamente, la misma bomba, tal como la bomba **40**, puede usarse para bombear tanto el fluido de muestra de la fuente **S** a través del primer segmento de flujo **13** como

el fluido de la fuente **B** a través del segundo segmento de flujo **14**, como se representa en el segmento a escala ampliada mostrado en la **FIG. 1B**. En esta realización, los dos conductos de salida **36**, **39** están conectados a la bomba **40** mediante una válvula bidireccional **V6** que es controlable para conectar selectivamente una u otra salida para el flujo a través de la bomba, según un protocolo de flujo de fluidos tratado en el presente documento.

5 Volviendo a la **FIG. 1A**, el sistema microfluídico **10** incorpora líneas de derivación que son selectivamente activadas según un protocolo de flujo de fluidos descrito más adelante. Se proporciona una línea de derivación **42** entre la fuente de tampón **B** y el conducto de entrada **35** al primer segmento de flujo **13** del componente de detector. Una válvula **V1** es operable para controlar el flujo de disolución de tampón de la fuente **B** en ambos conductos de entrada **35**, **38**, mientras que una válvula **V2** es operable para controlar el flujo de disolución de tampón en el primer  
10 conducto de entrada **35**.

En una segunda trayectoria de derivación, una línea de derivación **43** está conectada entre el primer conducto de salida **36** y el primer conducto de entrada **35**. Esta línea de derivación devuelve así el fluido que sale del primer segmento de flujo **13** del componente de detector de nuevo a la entrada **13a** para el primer segmento de flujo. Una válvula **V3** controla el flujo de fluidos mediante la segunda línea de derivación **43**. Una tercera trayectoria de derivación incluye la línea de derivación **44** del segundo conducto de salida **39** a la fuente **S** que contiene el fluido de muestra. Una válvula **V4** está configurada para dirigir el flujo de fluido de tampón que sale del segundo segmento de flujo **14** tanto al recipiente de recogida de tampón **BC** como a la tercera línea de derivación **44**. El sistema **10** está provisto de un módulo de control **45** que es operable para controlar la(s) bomba(s) **40** (y **41** si está presente), además de las válvulas para controlar el flujo de fluidos mediante cada segmento de flujo **13**, **14** del componente de detector **12**, según un protocolo de flujo descrito en el presente documento.  
15  
20

El sistema microfluídico **10** puede configurarse para aceptar fluidos de muestra de múltiples fuentes **S<sub>i</sub>**. Las múltiples fuentes **S<sub>i</sub>** pueden conectarse en serie o en paralelo, con válvulas apropiadas para conectar la fuente particular al conducto de entrada **35** al primer segmento de flujo **13** del componente de detector. El sistema puede modificarse adicionalmente para incluir componentes de detector **12i** adicionales conectados al conducto de salida **36** del primer segmento de flujo **13**, a modo de una válvula de control **V5**.  
25

El flujo de fluido de muestra y la disolución de tampón a través del sistema **10**, y particularmente a través del componente de detector **12**, ha sido así descrito hasta ahora. Detalles del componente de detector **12** y su función se ilustran en las **FIGS. 2-4**. Volviendo primero a la vista en sección transversal en la **FIG. 2**, el componente de detector **12** incluye un cuerpo **15** que puede estar en forma de dos mitades **15a**, **15b** que se combinan para formar el componente completo. El cuerpo **15** define un depósito **16** que se separa en una primera cámara **16a** y una segunda cámara **16b** por un chip sensor en forma de una placa con micro-aberturas **18**. La primera cámara **16a** está en comunicación con la primera entrada de flujo **13a** y la primera salida de flujo **13b** y así forma el primer segmento de flujo **13** del componente de detector. Un primer canal de entrada **22** comunica entre la primera cámara **16a** y la entrada **13a**, mientras que un primer canal de salida **23** comunica con la salida **13b**. En la realización ilustrada, los dos canales están inclinados hacia el depósito **16**, o definen un ángulo no plano con respecto al depósito, de manera que las células diana y el fluido de muestra no se acumulen dentro del canal **22** o conducto de entrada **35**.  
30  
35

La segunda cámara **16b** está en comunicación con la segunda entrada y salida **14a**, **14b** respectivas para formar el segundo segmento de flujo **14** del componente de detector. Un canal de entrada **25** comunica entre la segunda cámara y la segunda entrada **14a**, que un canal de salida **26** comunica con la segunda salida **14b**. Los dos canales **25**, **26** pueden estar inclinados, pero no necesitan estarlo ya que la segunda cámara **16b** está conectada a la fuente de disolución de tampón **B** y ninguna célula diana circula a través de esta segunda trayectoria de flujo de fluidos **14**.  
40

El depósito **16** puede estar abierto en un lado del componente de detector **12**, con el orificio de depósito sellado y cerrado por una ventana o panel de visualización **20**. El panel de visualización **20** está orientado para proporcionar una vista libre de la placa con aberturas **18** dentro del depósito **16**. En una realización, el panel de visualización **20** es ópticamente transparente para permitir la visualización directa de la superficie de la placa con aberturas.  
45

El chip sensor o placa con aberturas **18** puede estar soportado por una montura de placa **28**, formada alrededor del perímetro de la placa, que está atrapado entre las dos mitades de cuerpo **15a**, **15b** cuando se acoplan juntas. Puede proporcionarse una junta **29** en uno o ambos lados de la montura de placa **28** para garantizar una junta estanca al fluido entre las dos cámaras **16a**, **16b**. Detalles de la placa con aberturas se muestran en las **FIGS. 3-4**. En particular, la placa **18** incluye una superficie superior **51** y una pluralidad de aberturas microdimensionadas u orificios **50** definidos a su través. En una realización, los orificios están generalmente uniformemente dimensionados y tienen una dimensión eficaz más grande **d** que es inferior a la dimensión eficaz más pequeña de una célula diana **T** (**FIG. 4**) que es la que va a detectarse. Además, la dimensión eficaz más pequeña **d** de los orificios de placa es mayor que una dimensión eficaz más grande de elementos de reconocimiento magnético **M**. Para los fines de la presente divulgación, el término "dimensión eficaz" se refiere a una dimensión de un elemento particular medida a lo largo de un eje particular. Para un orificio circular en la placa o una perla magnética esférica, la dimensión eficaz más pequeña y la más grande son las mismas y son simplemente el diámetro del orificio o perla. Para un orificio oblongo, la dimensión eficaz más grande es la longitud del orificio a lo largo de su eje largo, mientras que la dimensión eficaz más pequeña es la anchura a lo largo del eje corto. Las células diana pueden no presentar una forma tridimensional uniforme (tal como una esfera), de manera que la célula tendrá una dimensión diferente que depende del eje de  
50  
55  
60

medición. Para células de este tipo, el término "dimensión eficaz más pequeña" se refiere a la más pequeña de aquellas mediciones. Así, la dimensión relativa eficaz de los orificios de placa es tal que una perla magnética puede siempre pasar a través de cualquier orificio sin importar cómo la perla esté orientada, mientras que una célula diana nunca puede pasar a través de cualquier orificio independientemente de cómo esté orientada.

5 El sistema microfluídico **10** está configurado para detectar y aislar células diana **T** que están unidas a elementos de reconocimiento **M**. Así, la fuente de fluido **S** contiene un fluido de muestra que contiene células diana, por ejemplo una muestra de sangre de un paciente que contiene células tumorales circulantes (CTC) o una muestra que tiene a modo de ejemplo líneas de células tumorales tales como carcinoma de ganglio linfático de las células de la próstata (LNCaP) o células de cáncer de ovario (IGROV). La muestra de fluido contiene además elementos de  
10 reconocimiento en forma de perlas magnéticas **M** que se unen a las células diana. Detalles de las células diana y elementos de reconocimiento seguirán, pero con respecto a los orificios **50** en la placa **18** puede apreciarse que el tamaño de los orificios se calibra de manera que cualquier perla magnética libre **M** (es decir, perlas que no se han unido a una célula diana **T**) pasará libremente a través del orificio, tal como las perlas **M<sub>x</sub>** en el lado derecho de la placa en la **FIG. 4**. Por otra parte, los orificios **50** están dimensionados de manera que las células diana **T** no puedan pasar a través, con o sin ninguna perla magnética unida a ellas, tal como perlas **M<sub>B</sub>**.  
15

La significancia de las perlas magnéticas **M** puede apreciarse refiriéndose de nuevo a la **FIG. 2**. En particular, el cuerpo **15** del componente de detector **12** incluye un imán **32** montado dentro de una cavidad **31** debajo de la segunda cámara **16b**. En particular, el imán **32** está posicionado de manera que la fuerza magnética atraiga perlas magnéticas **M** dentro de la primera cámara **16a** hacia la placa con aberturas **18**. Es esta fuerza magnética la que  
20 atrae a las perlas magnéticas libres **M<sub>x</sub>** a través de los orificios **50**, como se ilustra en la **FIG. 4**, incluso mientras que las perlas están bajo la influencia de un flujo de fluidos **F** que es sustancialmente paralelo a la superficie **51** de la placa **18**. Esta misma fuerza magnética también atrae a las perlas **M<sub>B</sub>** que están unidas a una célula diana **T**, que también están bajo la influencia del flujo de fluidos paralelo **F**. Sin embargo, como la célula diana **T** es demasiado grande para pasar a través de cualquier orificio, la fuerza magnética sirve para mantener la célula diana unida contra la superficie **51** de la placa con aberturas **18**. En ciertos casos, la célula diana **T** es lo suficientemente grande con respecto a las perlas magnéticas **M** como para tener varias perlas **M<sub>B</sub>** unidas a la célula. Como se representa en la **FIG. 4**, algunas de las perlas unidas **M<sub>B</sub>** se extienden parcialmente en un orificio **50**. Las perlas **M<sub>B</sub>** se mantienen dentro del orificio por la fuerza magnética, que no solo mantiene la célula diana unida **T** a la superficie de placa **51**, sino que también limita o "bloquea" la célula contra la traslación a lo largo de la superficie o que se lave bajo la  
25 influencia del flujo de fluidos **F**. Así, las perlas unidas **M<sub>B</sub>** no solo capturan células diana, sino que también ayudan a prevenir que las células diana capturadas se amontonen o acumulen en el extremo de salida de la primera cámara **16a**.  
30

El imán **32** está calibrado con respecto a las perlas magnéticas **M** para ejercer una fuerza magnética suficiente para atraer a las perlas hacia la placa con aberturas, pero no tan fuerte que se separen las perlas unidas **M<sub>B</sub>** de una célula diana **T** capturada sobre la superficie de placa **51**. La fuerza magnética también es suficientemente fuerte como para atraer las perlas y células diana fuera del flujo de fluidos **F** que tiende a impulsar las perlas y células en una trayectoria de flujo paralela a la superficie **51** de la placa de chip sensor **18**. En un ejemplo específico, el imán es un imán NdFeB Cube (aproximadamente 5 x 5 x 5 mm) con una densidad de flujo medida y gradiente de 0,4 T y 100 T/m, respectivamente. Se conciben otros imanes que incluyen, pero no se limitan a, imanes permanentes más grandes o más pequeños hechos de diversos materiales, y electroimanes que están comercialmente disponibles o se fabrican usando procedimientos estándar o de microfabricación y que son capaces de generar campos magnéticos variables con el tiempo. En la realización ilustrada de la **FIG. 2**, el imán **32** se aloja dentro de una cavidad **31** formada en la mitad inferior **15b** de la carcasa. Sin embargo, el imán puede fijarse a o soportarse con respecto al exterior del componente de detector **12** a condición de que se oriente de un modo que extraiga las perlas magnéticas **M** de la primera cámara **16a** a la segunda cámara **16b**. Se contempla además que el imán **32** puede asociarse al cuerpo de detector **15** de manera que la distancia del imán desde la placa con aberturas **18** pueda variarse para así variar la fuerza magnética aplicada a las perlas magnéticas en la primera cámara **16a**. La fuerza magnética puede así calibrarse a una perla magnética particular. Además, el imán **32** puede moverse para eliminar la fuerza magnética completamente según un protocolo de flujo para el sistema microfluídico **10**. La eliminación del campo magnético puede facilitar la eliminación de células diana capturadas de la superficie de placa de manera que las células diana puedan ser transportadas o descargadas a un recipiente de recogida separado **CC**.  
35  
40  
45  
50

En otra realización, el campo magnético puede aplicarse desde la parte superior del componente de detector **12** o directamente por encima de la superficie **51** de la placa de chip sensor **18**. Este campo magnético puede así "levitar" las células diana capturadas lejos de la superficie **51** para facilitar su eliminación. Se contempla en esta realización que el campo magnético del imán **32** se rompe como se ha descrito anteriormente, de manera que el campo magnético aplicado desde la parte superior del componente no "compita" con el campo magnético de captura original.  
55

Como se ha explicado anteriormente, la(s) bomba(s) **40** (**41**) y las válvulas **V1-V5** están controladas según un protocolo de flujo adaptado a: a) preparar el componente de detector **12** para recibir un fluido que contiene células diana unidas; b) capturar las células diana unidas; c) descargar perlas magnéticas no unidas; y d) extraer células diana capturadas. En una primera etapa del protocolo, el sistema se sensibiliza con una disolución no reactiva o tamponada de la fuente **B**. La disolución de la fuente **B** es preferentemente no reactiva para las células diana **T**, para  
60

los elementos de reconocimiento o perlas magnéticas **B**, y para cualquier ligando, anticuerpo, aptámero, péptido, ligando de bajo peso molecular o antígeno usado para funcionalizar y unir los elementos de reconocimiento. En una realización específica, la disolución puede ser una solución salina tamponada con fosfato (PBS). Con referencia a las **FIGS. 1A y 5A**, el depósito **16** se inunda inicialmente con PBS abriendo la válvula **V1**, moviendo la válvula **V4** para cerrar la línea de derivación **44** pero abriendo la trayectoria de flujo al recipiente de recogida **BC**, y moviendo la válvula **V2** para cerrar el conducto de entrada **35** a la fuente de muestra **S** y abrir el conducto a la línea de derivación **42**. Las válvulas **V3** y **V5** se cerraron de manera que todo el fluido que sale al componente de detector **12** se alimentara al recipiente de recogida de tampón **BC**. La disolución tamponada PBS circula libremente a través de ambas cámaras **16a, 16b** y a través de la placa con aberturas **18** de manera que todos los flujos circulen a través del segundo canal de salida **26** y la segunda salida **14b** en el conducto de salida **39** y el recipiente de recogida **BC**. En ciertas realizaciones puede desearse abrir la válvula **V5** para bombear PBS de la cámara **16a** en el recipiente de recogida **CC** con el fin de evitar cualquier aumento de presión dentro de la cámara. La bomba **41** se activa así para controlar el flujo de PBS mediante ambos segmentos de flujo **13, 14**. En la configuración alternativa de la **FIG. 1B**, la bomba **40** proporciona la fuerza motriz para el flujo de fluidos con la válvula **V6** abierta a ambas salidas **13b, 14b**, pero con la descarga de bomba a solo el segundo conducto de salida **39**. Puede apreciarse que este flujo inicial de PBS a través del sistema purgará el aire del depósito y canales.

Con el componente de detector sensibilizado, el circuito de fluido de disolución tamponada se desactiva cerrando las válvulas **V1** y **V4**, cerrando la línea de derivación **42** en la válvula **V2** y desactivando la bomba **41**. La primera cámara **16a** está ahora lista para recibir el fluido de muestra de la fuente **S** abriendo la válvula **V2** al conducto de entrada **35** y la válvula **V5** al recipiente de recogida **CC**, como se ilustra en la **FIG. 5B**. La bomba **40** se activa para extraer el fluido de muestra de la fuente **S** a través del componente de detector **12**, y más particularmente para extraer el fluido de muestra a través de la primera entrada **13a** en la primera cámara **16a**. El imán **32** se activa para atraer las perlas magnéticas **M** a la placa con aberturas **18**, como se representa en la **FIG. 4**. Puede apreciarse que la velocidad de flujo **F** del fluido de muestra se calibra de manera que la presión del fluido no venza la fuerza magnética. A modo de ejemplo no limitante, la bomba **40** puede configurarse para producir un caudal de varios ml/min, que es significativamente más rápido que las velocidades de ml/hora de sistemas microfluídicos previos. En una realización específica, los canales de entrada y salida **22, 23** pueden tener una dimensión eficaz más pequeña de 0,5 mm de manera que un caudal de 1 ml/min pueda generar una velocidad de flujo lineal de aproximadamente 3 mm/s en los canales y aproximadamente 0,7 mm/s a través del depósito **16**. Estas velocidades lineales son casi 100 veces más bajas que las velocidades que se cree que producen daño a las células diana **T**. Sin embargo, a este caudal, una muestra de fluido típica de 7,5 ml puede pasar a través del componente de detector **12** en 7,5 minutos o menos. Similarmente, un caudal de 3 ml/min indicaría un paso de una muestra de 7,5 ml en aproximadamente 2,5 minutos.

Las células diana y perlas magnéticas están bajo la influencia de flujo de fluidos que intenta lavarlas lejos de la superficie de chip sensor, además de una fuerza magnética que intenta extraerlas a la superficie del chip. La fuerza magnética producida por el imán **32** puede así calibrarse para contrarrestar la influencia del flujo de fluidos **F**. En otras palabras, puede llevarse a cabo un mayor caudal aumentando la fuerza magnética, ya que se requiere una mayor fuerza para desalojar las células y perlas del flujo de fluidos. Un factor limitante a la intensidad del campo magnético generada por el imán **32** es que la fuerza magnética no puede ser lo suficientemente grande como para disociar las perlas magnéticas **B** de las células diana unidas **T** o suficientemente grande como para dañar la célula diana a medida que las perlas son atraídas por la fuerza magnética.

A medida que la muestra de fluido circula a través de la primera cámara **16a**, el imán atrae los elementos de reconocimiento **M** a la placa **18** y el segundo depósito inferior **16b**. Como se ha explicado anteriormente, la mayoría de las perlas no unidas **M<sub>B</sub>** pasarán a través de los orificios **51** y al depósito inferior **16b** donde se mantienen en su sitio por la fuerza magnética. Asimismo, las células diana unidas **T** serán capturadas contra la superficie **51** de la placa con aberturas **18** mientras que la fuerza magnética esté presente. El fluido de muestra restante, menos las células diana capturadas, puede suministrarse al recipiente de recogida **CC**. Alternativamente, puede cerrarse la válvula **V5** y abrirse la válvula **V3** para permitir que el fluido de muestra se descargue de la salida **13b** para ser devuelto a la entrada **13a** mediante la línea de derivación **43**, como se refleja en el diagrama de **FIG. 5C**. El uso de la derivación puede representar cualquier célula diana unida o cualquier perla magnética no unida que escape a la captura dentro del depósito **16**. El fluido de muestra puede ser continuamente recirculado durante un periodo de tiempo considerado suficiente para capturar todas las células diana unidas.

Puede apreciarse que al final de esta segunda etapa del protocolo de flujo todas o al menos la mayoría de las células diana unidas **T** en el fluido de muestra han sido capturadas contra la superficie **51** de la placa con aberturas **18** dentro de la primera cámara superior **16a**. Asimismo, todas o al menos la mayoría de las perlas magnéticas no unidas **R<sub>B</sub>** han sido extraídas a través de los orificios y se recogen en la segunda cámara inferior **16b**. Las células diana capturadas están así disponibles para visualización a través del panel de visualización **20** con el fin de contar el número de células diana, por ejemplo. Se contempla que en un procedimiento típico las células diana serán raras o a una concentración extremadamente baja dentro de una muestra (por ejemplo, CTC en una muestra de sangre). Así, el número de células capturadas puede ser muy bajo, pero fácilmente discernible sobre la placa con aberturas. En un enfoque, las células capturadas pueden visualizarse por microscopía de campo brillante. Además, las células capturadas pueden marcarse además con indicadores fluorescentes y visualizarse usando microscopía fluorescente. Alternativamente o además, las perlas magnéticas pueden funcionalizarse con un indicador visual, tal como con

marca fluorescente. Las perlas magnéticas pueden visualizarse usando microscopía de fluorescencia. Como las células diana normalmente están unidas a varias perlas magnéticas, la imagen fluorescente de las perlas revelará la presencia de las células diana unidas. Un ejemplo de células diana capturadas se muestra en la imagen de microscopía de campo brillante en la **FIG. 6**. En esta imagen, las células capturadas son claramente visibles. Las células son MCF-7 (células de cáncer de mama) que están unidas a perlas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos anti-EpCAM de una manera conocida. Puede observarse que mientras que la gran mayoría de los varios millones de perlas magnéticas no unidas en la muestra pasaron a través de orificios de placa, algunas perlas magnéticas no unidas también están presentes sobre la superficie de placa. Sin embargo, es evidente que la presencia de estas algunas perlas no interfiere con una vista clara de las células diana capturadas. En el ejemplo específico mostrado en la **FIG. 6** los orificios tienen un diámetro (o dimensión eficaz más pequeña) de 5  $\mu\text{m}$  y las perlas magnéticas tienen un diámetro de 300 nm.

Con el fin de mejorar la visualización de las células recogidas, el depósito puede lavarse para eliminar el fluido de muestra y otras células que podrían interferir visualmente. En este caso, el campo magnético se mantiene mientras que la disolución tamponada de la fuente **B** se hace circular a través de las porciones superior e inferior del depósito. El ciclo de lavado puede realizarse del mismo modo que el ciclo de preparación inicial descrito anteriormente, concretamente abriendo las dos cámaras **16a**, **16b** a la disolución de PBS, cerrando la válvula **V5** y abriendo la válvula **V4** al recipiente de recogida de tampón **BC**. Como el imán sigue en posición durante este ciclo de lavado, las células diana quedarán capturadas sobre la placa con aberturas dentro de la cámara superior **16a** y las perlas magnéticas no unidas quedarán recogidas dentro de la cámara inferior **16b**.

El sistema microfluídico **10** desvelado en el presente documento también es capaz de recoger las células diana capturadas **T**, además de recuperar las perlas magnéticas **M**. En un enfoque, la disolución tamponada (PBS) se hace circular solo a través de la primera cámara superior **16a** con el campo magnético quitado. Así, como se muestra en el diagrama de la **FIG. 5D**, la válvula **V1** está controlada para cerrar el flujo a la entrada **14a** pero abrir al conducto **35** y la válvula **V1**. La válvula **V1** está controlada para prevenir el flujo de la fuente **S** pero aceptar el flujo de PBS de la fuente **B**. Las válvulas **V3** y **V4** se cerraron, pero la válvula **V5** está abierta al recipiente de recogida **CC**. En ausencia del campo magnético, las células diana unidas son fácilmente desalojadas de la placa con aberturas. El flujo de PBS puede lavar las células diana mediante el conducto de salida **23** y en un recipiente de recogida **CC**. Como la segunda entrada **14a** y salida **14b** se cerraron no hay flujo de fluidos a través de la segunda cámara inferior **16b**. Así, las perlas recogidas **M** siguen reunidas en el fondo del depósito **16** incluso a medida que las células diana son lavadas. Alternativamente, el campo magnético puede ajustarse para reducir la fuerza magnética experimentada por las células diana unidas a un nivel suficiente para ser vencido por la presión de fluido del PBS que circula a través de la cámara superior **16a**. Como las perlas no unidas reunidas en la cámara inferior están más próximas al imán, la fuerza magnética es suficiente para mantener las perlas en su sitio. Una vez las células diana han sido eliminadas y recogidas, el campo magnético puede eliminarse y las válvulas **V1** y **V4** abrirse para hacer circular PBS a través de la cámara inferior para lavar las perlas no unidas en el recipiente de recogida **BC**. Alternativamente, la válvula **V4** puede activarse para abrir la línea de derivación **44** para redirigir las perlas no unidas de nuevo a la fuente de muestra **S**. En este caso las perlas no unidas pueden incubarse para unirse con cualquier célula diana previamente no unida en la fuente original **S** o fuentes adicionales **Si**.

Como se describe previamente, el sistema microfluídico **10** puede incluir componentes de detector **12i** adicionales que pueden ponerse en línea mediante la válvula **V5**. En ciertos protocolos puede contemplarse que el fluido de muestra circulará continuamente del primer componente de detector **12** a cada componente de detector sucesivo **12i** antes de circular al recipiente de recogida **CC**.

Se contempla que los conductos y válvulas estén formados de materiales químicamente inertes. En un ejemplo específico los conductos **35**, **36**, **38** y **39**, y las líneas de derivación **42-44**, pueden ser tubo tal como tubos de tipo Cole-Parmer de 1/16 de pulgada u otro tubo químicamente inerte. En ciertos procedimientos la fuente de células diana puede ser una muestra de sangre completa de 7,5 ml convencional en la que las células elegidas como diana han sido unidas a elementos de reconocimiento, tales como perlas magnéticas. Para un protocolo de flujo típico, la fuente de tampón **B** puede ser un depósito de PBS de 10 ml o más grande. En ciertos procedimientos, la muestra puede ser una muestra de sangre procesada en la que los glóbulos rojos ya han sido eliminados por medio de lisado o por medio de tubos comercialmente disponibles, tales como los tubos de preparación de células BD Vacutainer. En otros procedimientos la muestra puede ser otros fluidos corporales tales como orina, o puede ser agua u otras muestras de fluido recogidas de fuentes medioambientales o industriales.

En una realización, las mitades superior e inferior **15a**, **15b** del cuerpo de componente de detector **15** están mecanizadas de acrílico y aseguradas con tornillos de un modo que intercale la placa con aberturas **18** y el anillo de junta **29** para formar una junta estanca al fluido entre las cámaras. Sin embargo, también se conciben otra fabricación y material, que incluyen, pero no se limitan a, plástico moldeado formado en una operación de moldeo de plástico.

En una realización, la placa con aberturas de chip sensor **18** tiene aproximadamente una oblea de silicón sobre aislante (SOI) de 15 mm por 15 mm que tiene un espesor de aproximadamente 0,5 mm. Los orificios **50** pueden limitarse a un área activa predeterminada del componente de detector de aproximadamente 10 mm por 10 mm. La matriz de orificios (tal como la disposición en damero) puede definirse sobre la oblea usando litografía y entonces los



agujeros se forman por decapado con iones reactivos de la parte delantera de la oblea. Pueden definirse chips sensores individuales por decapado con iones reactivos de la parte trasera de la oblea, seguido de decapado con HF del óxido aislante. Alternativamente, pueden definirse ranuras usando litografía y decaparse en la parte delantera de una oblea de silicio por decapado con iones reactivos, seguido de recubriendo con una delgada capa de nitruro. El nitruro sobre la parte trasera de la oblea puede estamparse usando decapado por litografía para definir chips individuales. Finalmente, la oblea de silicio puede decaparse en el patrón de matriz de orificios usando decapado con iones reactivos o hidróxido potásico, y la capa de nitruro restante puede eliminarse por decapado. Como se trata anteriormente, los orificios tiene una dimensión eficaz más pequeña que es suficientemente pequeña para atrapar perlas magnéticas unidas a célula diana, todavía suficientemente grande para permitir que las perlas magnéticas libres que no se unen a las células diana pasen a través. En un ejemplo específico, las células diana son CTC, así los orificios necesitan ser más pequeñas que las CTC elegidas como diana, pero más grandes que las perlas. Por ejemplo, el tamaño promedio de un carcinoma de ganglio linfático de las células de la próstata (LNCaP) o células de cáncer de ovario (IGROV) es aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , mientras que el tamaño de un cierto tipo de perla magnética puede ser aproximadamente 1  $\mu\text{m}$ . Por lo tanto, los orificios de 3  $\mu\text{m}$  serán lo suficientemente grandes para que una perla libre pase fácilmente, pero demasiado pequeños para permitir una CTC a su través. En una realización específica, los orificios pueden proporcionarse a aproximadamente el 30 % de densidad de relleno, que puede producir aproximadamente 14 orificios debajo de una célula de 20  $\mu\text{m}$ . Además, si cada célula está unida por múltiples perlas magnéticas (como se representa en la FIG. 4), cada perla es atraída por la fuerza magnética de manera que la célula diana es cerrada en múltiples localizaciones, haciendo incluso más difícil que una célula pase a través de un único orificio. Los orificios también están configurados para atrapar las perlas magnéticas unidas a célula para "bloquear" que las células diana se muevan horizontalmente, previniendo que sean lavadas de la superficie de la placa por el flujo de fluidos. En la realización ilustrada en las FIGS. 3-4, se muestra que los orificios 50 tienen un diámetro circular o cilíndrico. Sin embargo, los orificios pueden tener otras formas, tales como una perforación cónica o un orificio oblongo en la dirección del flujo de fluidos **F** a condición de que la dimensión eficaz más pequeña del orificio cumpla los requisitos dimensionales expuestos anteriormente. En una realización alternativa, la placa 18 puede configurarse con micro-ranuras que tienen cada una una anchura igual a la dimensión eficaz más pequeña **d** tratada anteriormente dimensionada de manera que las células diana no puedan entrar en las micro-ranuras pero puedan las perlas magnéticas mucho más pequeñas.

La placa con aberturas 18 puede recubrirse o pasivarse con un material fisiológicamente inerte, tal como albúmina de suero bovino (BSA) o polietilenglicol (PEG). Como el sistema según la presente divulgación no utiliza unión química entre una célula diana funcionalizada y la placa, la superficie de la placa puede ser, y es preferentemente, no reactiva.

Según la presente divulgación, la unión célula diana a perla magnética es la única etapa de unión por afinidad que se pretende, ya que el componente de detector 12 no se basa en unir químicamente las células diana a una porción del componente. Las perlas magnéticas se funcionalizan de muchas formas convencionales, que incluyen con anticuerpos monoclonales o policlonales apropiados (que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra EpCAM), aptámeros o péptidos cortos que pueden unirse a células diana específicas. En una estrategia de funcionalización alternativa, se usan ligandos de bajo peso molecular (por ejemplo, ácido 2-[3-(1,3-dicarboxipropil)-ureido]pentanodioico o "DUPA" para células de cáncer de próstata, y ácido fólico para células de cáncer de ovario u otras células cancerosas que expresan en exceso el receptor de folato sobre sus superficies que incluyen cánceres de pulmón, colon, renal y mama) para promover la unión a ciertas células, lo más particularmente CTC. Específicamente, pueden producirse ligandos de bajo peso molecular (por ejemplo DUPA y folato) con un grupo funcional (amino, n-hidroxisuccinamida (NHS), o biotina dependiendo del grupo funcional sobre la perla magnética que va a usarse) con una cadena de PEG entre el ligando de bajo peso molecular y el grupo funcional para suprimir la unión no específica a las perlas.

Están disponibles perlas funcionalizadas de una variedad de vendedores con grupos químicamente reactivos. También están disponibles perlas magnéticas en un amplio intervalo de tamaños (de 100 nm a 5  $\mu\text{m}$ , por ejemplo) que pueden seleccionarse basándose en las dimensiones de la célula diana a la que las perlas se unen. En una realización, perlas de 1  $\mu\text{m}$  recubiertas de NHS pueden ser el punto de partida de Chemagen. Para estas perlas, la cadena de PEG se terminará con un grupo amino para el enlace covalente al grupo de NHS sobre la perla. También pueden probarse perlas de otros vendedores con otros grupos funcionales, y pueden estar terminadas con la cadena de PEG y el grupo funcional por consiguiente. Las perlas también pueden funcionalizarse con moléculas fluorescentes usando la química apropiada para el grupo funcional. Para el ejemplo de un ligando de bajo peso molecular, pueden sintetizarse moléculas de DUPA-PEG-amina y folato-PEG-amina que pueden hacerse reaccionar con las perlas antes del marcado fluorescente. A partir de aquí, la cantidad deseada de colorante fluorescente reactivo (fluoresceína, por ejemplo) puede hacerse reaccionar con las perlas, después de lo cual los grupos NHS residuales (u otros restos activados sobre las perlas) pueden ser pasivos mediante reacción con glucosamina (u otra molécula apropiada para neutralizar el resto activado sobre las perlas). Puede optimizarse la relación de folato-PEG-amina o DUPA-PEG-amina con respecto a colorante fluorescente y molécula de pasivación, según se necesite. Similarmente, pueden inmovilizarse anticuerpos (tales como la molécula de adhesión a células epiteliales o "EpCAM") sobre perlas. Un ejemplo comercialmente disponible, en el que las perlas funcionalizadas magnéticas son perlas magnéticas funcionalizadas por la unión a un anticuerpo monoclonal contra la molécula de adhesión a células epiteliales humanas (EpCAM), tales como Dynabeads® Epithelial Enrich, está comercialmente disponible de

Invitrogen. Por ejemplo, pueden unirse covalentemente anticuerpos a perlas recubiertas de NHS, o pueden unirse a perlas recubiertas de estreptavidina mediante una biotina. También pueden usarse diversos otros esquemas de funcionalización que incluyen, pero no se limitan a, grupos carboxilo, tioles y silanos. Alternativamente, las perlas pueden solo tener los elementos de reconocimiento para unir y atrapar las células sobre la superficie de placa, pero carecer de los indicadores fluorescentes que podrían introducirse por separado para unirse directamente a las células capturadas. En un procedimiento, anticuerpos fluorescentemente marcados (por ejemplo, citoqueratina), ligandos de bajo peso molecular, péptidos o aptámeros, pueden exponerse por separado a las células capturadas.

El sistema microfluídico **10** y el componente de detector **12** desvelados en el presente documento son particularmente adecuados para la detección de células cancerosas unidas a perlas magnéticas. Están disponibles muchas técnicas para la funcionalización y unión de perlas magnéticas a células diana tales como CTC. Procedimientos a modo de ejemplo se desvelan en las siguientes publicaciones publicadas: T. Mitrelias, et al., "Biological cell detection using ferromagnetic microbeads", *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 310, pp. 2862-2864, Marzo de 2007; N. Eide, et al., "Immunomagnetic detection of micrometastatic cells in bone marrow in uveal melanoma patients", *Acta Ophthalmologica*, vol. 87, pp. 830-836, Dec 2009; Yu et al., "Circulating tumor cells: approaches to isolation and characterization", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 192, No. 3, pp. 373-382 (7 de febrero de 2011); Hayes & Smerage, "Circulating Tumor Cells", *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, Vol. 95, 2010, pp. 95-112; Alexiou et al., "Medical Applications of Magnetic Nanoparticles", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 6, 2006, pp. 2762-2768; e Ito, et al., "Medical application of functionalized magnetic nanoparticles", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 100, 2005, pp. 1-11, siendo la divulgación de cada publicación incorporada en el presente documento por referencia.

Publicaciones que desvelan procedimientos a modo de ejemplo para la síntesis y modificación de folato y DUPA se identifican en el Apéndice. Cualquiera de los procedimientos y métodos desvelados en estas publicaciones pueden ser adecuados para la unión de perlas magnéticas para seleccionar CTC que pueden ser posteriormente capturadas por el componente de detector **12** desvelado en el presente documento. La funcionalización de perlas magnéticas con folato se describe completamente en referencias enumeradas en el Apéndice, por tanto un experto habitual en la materia está facultado para funcionalizar perlas magnéticas similares con DUPA como se describe además en las referencias enumeradas. La propia molécula de DUPA también se describe completamente en las referencias enumeradas en el Apéndice y en cualquier parte en esta memoria descriptiva.

La capacidad para atraer células cancerosas unidas a perlas a una superficie sólida (es decir, sin ningún orificio) ha sido verificada en experimentos usando células MCF-7 (línea de células de cáncer de mama) unidas a perlas magnéticas mediante anticuerpos contra EpCAM. Las células diana se hicieron circular con caudales volumétricos superiores a 2 ml/minuto y fueron satisfactoriamente magnéticamente atraídas a la superficie sólida durante el flujo. Las células diana tienen una dimensión eficaz más pequeña de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ , de manera que en otro experimento las células diana se hicieron circular sobre una placa que tenía orificios con un diámetro eficaz de 5  $\mu\text{m}$ . Se observaron células cancerosas intactas sobre la placa usando superficie dual (citoqueratina) y tinción nuclear (DAPI). En estos experimentos, 9 de las 10 células diana se detectaron en una muestra de 12 ml, para una recuperación de células del 90 %.

La operación del sistema de detección microfluídica **10** desvelado en el presente documento puede controlarse mediante un controlador maestro **45**. El controlador puede ser un microprocesador configurado para seguir un protocolo de flujo controlado según una célula diana particular, elemento de reconocimiento y tamaño de muestra. El controlador maestro puede incorporar un lector para leer los indicios asociados a una muestra o muestras particulares, y automáticamente cargar y ejecutar un protocolo de flujo predeterminado asociado a la muestra particular.

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

En las realizaciones ilustradas, las perlas magnéticas se describen pueden funcionalizarse con un marcador fluorescente. En estas realizaciones, la placa con aberturas **18** es generalmente opaca de manera que las señales de fluorescencia procedentes de las perlas no unidas **M<sub>B</sub>** en la cámara inferior **16b** no se detectarán a través del panel de visualización **20**. Sin embargo, en casos, algunas perlas libres pueden quedar sobre la superficie **51** y producir señales de fluorescencia que pueden confundir la visualización. En estos casos, las perlas pueden funcionalizarse solo con ligandos y no con marcadores fluorescentes. Después de que la muestra haya sido completamente procesada y las células diana capturadas sobre la placa con aberturas **18**, pueden introducirse por separado ligandos marcados con fluorescencia en el depósito para unirse a las células diana directamente. Las células diana pueden entonces observarse fácilmente a través del panel de visualización **20**. Con este enfoque modificado, en algunos casos la placa **18** puede carecer de cualquier micro-abertura ya que las células diana sobre la superficie de placa pueden ser fácilmente diferenciadas de perlas magnéticas no unidas por medio de fluorescencia.

En el proceso de detección, la cámara inferior **16b** puede ser inundada con una cantidad mínima de tampón o sangre, después de lo cual no hay flujo de fluidos a través de la cámara inferior hasta que la detección se complete. La difusión de fluido a través de los orificios **50** entre las cámaras superior e inferior **16a**, **16b** será mínima ya que este sistema de detección microfluidica **10** no está basado en un flujo accionado por la presión.

5 Pueden detectarse CTC de muestras de sangre de pacientes de diversos cánceres, que incluyen, pero no se limitan a, cánceres de próstata, ovario, mama, colon, renal y pulmón, ya que muchas células cancerosas expresan ciertas moléculas o antígenos sobre sus superficies que pueden ser dirigidas con diversos elementos de reconocimiento, que incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (por ejemplo, EpCAM), aptámeros, ligandos de bajo peso molecular (por ejemplo, folato y DUPA) y péptidos. Las perlas pueden funcionalizarse como se ha descrito previamente (por ejemplo, DUPA para células de cáncer de próstata, y folato y EpCAM para células de cáncer de ovario, mama, colon, renal y pulmón) y entonces incubarse y mezclarse con el fluido de muestra durante 20-30 minutos. Este tiempo de incubación puede ser más largo o más corto dependiendo del número de perlas usadas, volumen de muestra y el número de células diana buscado. Por ejemplo, sembrar la muestra con un número más grande de perlas aumenta la probabilidad de que una célula diana "encuentre" una perla magnética y se una. Si hay múltiples muestras, la incubación de todas las muestras puede llevarse a cabo simultáneamente. El análisis del fluido de muestra por el presente sistema de detección, y la secuencia de flujos de fluido de muestra y de tampón, puede llevarse a cabo como se describe en el presente documento. Las alícuotas de las células cancerosas capturadas pueden teñirse con elementos de reconocimiento adicionales, tales como anticuerpos para citoqueratinas y EpCAM, para asegurar que las células retenidas por el componente de detector sean de hecho células cancerosas. Además, puede determinarse una indicación preliminar de si los números de CTC se correlacionan con la etapa de la enfermedad del donante de muestra. Aunque el sistema desvelado no se limita a un tipo particular de cáncer, células de cáncer de próstata y de ovario se mencionan especialmente en el presente documento como modelos para el sistema debido a que ambas enfermedades pueden tener síntomas difusos que producen pruebas biomoleculares confusas, y ambos pueden beneficiarse de una prueba de CTC fiable, rápida y sensible. Por ejemplo, el cáncer de próstata puede tener síntomas similares a la hiperplasia prostática benigna. Las pruebas de biomarcadores de PSA pueden ser confusas debido a tanto positivos falsos como negativos falsos. Similarmente, el cáncer de ovario puede tener síntomas difusos y puede detectarse tan tarde como en la etapa III o IV.

En comparación con varios estudios que usaron satisfactoriamente perlas magnéticas para separar manualmente una amplia variedad de células (de patógenos a linfocitos T a CTC) de muestras complejas, el enfoque según la presente divulgación ofrece ventajosamente separación y detección, análisis más rápido y la capacidad de recoger las células capturadas y ponerlas disponibles para otros tipos de análisis, que incluyen, pero no se limitan a, análisis genético. Además, en comparación con sensores magnetorresistivos gigantes (GMR) o de válvula de espín que son conocidos para un experto habitual en la materia (hechos de múltiples nanocapas con espesores controlados con presión) que pueden detectar perlas magnéticas, el presente enfoque es ventajosamente más robusto, fácil de construir y usar, y ofrece rendimiento mucho más alto. El sistema según la presente divulgación también ofrece una ventaja significativa con respecto a los ensayos de atrapamiento de células basado en el tamaño que fuerzan a las células a través de cavidades de tamaño de micrómetros por presión fluidica. Estos ensayos pueden sufrir obstrucción de las cavidades (ya que todas las entidades en la muestra son forzadas a pasar a través de las cavidades), o atrapamiento de otras entidades similares en tamaño a células diana, o paso completo y de ahí pérdida de células diana a través de la cavidad.

La fuente **S** puede incluir células diana que ya se han unido a elementos de reconocimiento, además de perlas magnéticas. Alternativamente, la fuente puede contener inicialmente un fluido de muestra, tal como un espécimen de sangre completa, al que se añaden perlas magnéticas y se dejan incuban. Como las células diana son raras o están a baja concentración, se desea sembrar el espécimen con millones de perlas magnéticas funcionalizadas. Por ejemplo, en un enfoque se proporcionan 100 millones de perlas por cada ml de espécimen de sangre completa. Se ha encontrado que un tiempo de veinte minutos de incubación es suficiente para unir CTC raras. El sistema **10** puede sensibilizarse como se ha descrito anteriormente durante el periodo de incubación, ya que la fuente de muestra **S** no participa en el flujo de fluidos durante esta etapa. Una vez el periodo de incubación se completa, puede implementarse el protocolo de flujo para detectar las células diana descrito anteriormente. Alternativamente, como se ha descrito anteriormente, la muestra proporcionada puede ser una sangre muestreada procesada por una combinación de tubos de preparación de células comerciales y centrifugación con el fin de desechar los glóbulos rojos que normalmente no se buscan durante la detección de CTC. Alternativamente, la muestra puede ser una muestra de sangre procesada en la que los glóbulos rojos han sido lisados usando un tampón de lisis de glóbulos rojos.

55 Se contempla que el sistema **10** puede modificarse para la incorporación en un sistema de diálisis o de tipo diálisis. En este caso, las perlas magnéticas funcionalizadas pueden inyectarse en la corriente sanguínea del paciente antes de la diálisis. En vez de circular en un recipiente de recogida **CC**, la circulación sanguínea a través del componente de detector **12** o componentes de detector **12i** se devuelve a la diálisis. Puede incorporarse un elemento de recogida magnética en la salida del sistema para capturar todas las perlas magnéticas no unidas y células unidas que no han sido recogidas dentro del (de los) componente(s) de detector.

Aquellos expertos en la materia reconocerán que pueden hacerse numerosas modificaciones a las implementaciones específicas descritas anteriormente. Por tanto, la divulgación anterior no debe limitarse a las

realizaciones específicas ilustradas y descritas anteriormente. La descripción como se presenta y como puede ser modificada engloba variaciones, alternativas, modificaciones, mejoras, equivalentes y equivalentes sustanciales de las realizaciones y enseñanzas desveladas en el presente documento, que incluyen aquellas que son actualmente inesperadas o no apreciadas, y que, por ejemplo, pueden surgir de los solicitantes/patentes y otros.

5 Por ejemplo, en las realizaciones a modo de ejemplo se describen células biológicas particulares, tales como CTC, ya que están siendo capturadas por el componente de detector **12** del sistema de detección microfluidica **10**. Otras entidades, que incluyen partículas o cuerpos similares, en el intervalo de tamaño de micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) también pueden detectarse y capturarse por el sistema desvelado en el presente documento, siempre que las partículas o cuerpos puedan unirse a uno o más elementos de reconocimiento, tales como las perlas magnéticas descritas en el  
10 presente documento.

Además, la placa con aberturas **18** se representa como que es generalmente paralela a la mitad inferior **15b** de la base de componente de detector **15**. Alternativamente, la placa puede estar inclinada hacia el canal de salida **23** de manera que las células diana capturadas tiendan a acumularse desde el extremo de salida y llenar hacia el extremo de entrada. Una placa inclinada también puede facilitar el pase de las perlas magnéticas no unidas en la cámara inferior **16b** induciendo una traslación a lo largo de la superficie **51** de la placa. Además, la placa **18** se muestra como generalmente plana, aunque se contemplan otras configuraciones que facilitan la captura de células diana y el pase de perlas no unidas.  
15

El imán **32** se describe en el presente documento como un imán permanente con la aplicación del campo magnético controlado moviendo el imán. El campo magnético puede manipularse por una protección ajustable dispuesta entre el imán y el depósito **16**. La protección puede usarse para bloquear completamente el campo magnético o para reducir el campo según sea necesario. Alternativamente, el imán puede ser un electroimán que puede ser controlado por el controlador **45** para activar o desactivar el campo magnético o ajustar la intensidad del campo. El controlador puede también modular el campo magnético durante un ciclo de detección para facilitar la captura de las células diana y extraer las perlas magnéticas no unidas en la cámara inferior.  
20

En otra alternativa, el imán **32** puede incluir múltiples imanes dispuestos en un patrón predeterminado para facilitar el recuento de células capturadas sobre la placa con aberturas **18**. Así, en una realización, varios imanes pueden disponerse en tiras paralelas de manera que las células capturadas aparezcan en varias líneas.  
25

En los protocolos de flujo de fluidos descritos anteriormente, las células diana se lavan del componente de detector **12** en una etapa. Alternativamente, las células pueden ser retenidas sobre la placa con aberturas y retirarse la propia placa del componente de detector. En esta alternativa, las magnéticas pueden quedar en posición a medida que se retira la mitad de cuerpo superior **15a** para proporcionar acceso a la placa con aberturas. La mitad de cuerpo inferior **15b** puede transportarse con la placa con aberturas y el imán intacto y encajarse con otra mitad de cuerpo para procedimientos adicionales.  
30

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema de detección microfluídica (10) para la detección de entidades diana de tamaño de micrómetros en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en el que cada entidad diana unida a una perla magnética tiene una dimensión eficaz más pequeña superior a una dimensión eficaz más grande de cada perla magnética, comprendiendo el sistema:
- 5 un componente de detector (12) que incluye:
- un cuerpo (15) que define un depósito (16);
- una placa (18) dispuesta dentro de dicho depósito (16) y que separa dicho depósito (16) en una primera cámara (16a) y una segunda cámara (16b), definiendo dicha placa (18) una pluralidad de orificios (50) a su través, teniendo cada orificio (50) una dimensión eficaz dimensionada para siempre permitir el pase de la dimensión eficaz más grande de cada perla magnética y dimensionada además para siempre prevenir el pase de la dimensión eficaz más pequeña de cada entidad diana;
- 10 teniendo dicha primera cámara (16a) de dicho depósito (16) una primera entrada (13a) y una primera salida (13b), dicha primera entrada (13a) conectable de forma fluida con una fuente de fluido que contiene las entidades diana; y
- 15 un imán dispuesto con respecto a dicho depósito (16) de manera que dicha segunda cámara (16b) de dicho depósito (16) y dicha placa (18) estén situadas entre dicho imán y dicha primera cámara (16a) de dicho depósito (16), dicho imán configurado para generar una fuerza magnética suficiente para atraer perlas magnéticas en dicha primera cámara (16a) de dicho depósito (16) a dicha segunda cámara (16b) de dicho depósito (16); y
- 20 una bomba (40; 41) para hacer circular continuamente el fluido de la fuente de fluido que contiene las entidades diana mediante dicha primera cámara (16a) de dicho depósito (16).
2. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 1, en el que dicho componente de detector (12) incluye un panel de visualización que forma parte de dicha primera cámara (16a) de dicho depósito (16) y dispuesto para visualizar la superficie de dicha placa (18) a través de dicha primera cámara (16a).
- 25 3. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 1, en el que dicha primera entrada (13a) y dicha primera salida (13b) incluyen canales definidos en dicho cuerpo (15) en comunicación con dicho depósito (16), dichos canales dispuestos a un ángulo no plano con respecto a dicho depósito (16).
4. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 1, en el que dicho cuerpo (15) incluye una porción que define al menos parte de dicha segunda cámara (16b) de dicho depósito (16), definiendo dicha porción además una cavidad con dicho imán montado dentro de dicha cavidad.
- 30 5. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 4, en el que dicho imán está montado de forma ajustable dentro de dicha cavidad para variar la distancia entre dicho imán y dicha placa (18).
6. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 1, en el que dicha segunda cámara (16b) de dicho depósito (16) incluye una segunda entrada y una segunda salida, dicha segunda entrada conectable de forma fluida con una fuente de fluido no reactivo diferente de dicho fluido que contiene las entidades diana.
- 35 7. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 6, en el que dicha bomba (40, 41) incluye:
- una entrada conectada a dicha primera salida (13b) y a dicha segunda salida; y
- una salida conectada a una línea de fluido conectable con un primer recipiente para recibir fluido bombeado mediante dicha primera salida (13b) y con un segundo recipiente separado para recibir fluido bombeado a través de dicha segunda salida.
- 40 8. El sistema de detección microfluídica (10) de la reivindicación 7, que comprende además:
- una primera válvula controlable dispuesta entre dicha primera y segunda salida y la entrada de dicha bomba (40, 41); y
- 45 una segunda válvula controlable separada dispuesta entre dicha salida de dicha bomba (40, 41) y dicho primer y segundo recipientes.
9. El sistema microfluídico de la reivindicación 1, que comprende además:
- un conducto de salida conectado a dicha primera salida (13b) y conectable a un recipiente de fluido para recibir fluido bombeado a través de dicha primera salida (13b);

una línea de derivación dispuesta entre dicho conducto de salida y dicha primera entrada (13a); y

una válvula controlable para dirigir el flujo de fluidos a través de dicha primera salida (13b) a tanto el recipiente de fluido como dicha línea de derivación.

5 10. Un método de detección de entidades diana de tamaño de micrómetros en un fluido que contiene una cantidad de perlas magnéticas y una cantidad de entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas, en el que cada entidad diana unida a una perla magnética tiene una dimensión eficaz más pequeña superior a una dimensión eficaz más grande de cada perla magnética, comprendiendo el método:

10 hacer circular continuamente el fluido a través de un componente de detector (12) que tiene una primera cámara (16a) de un depósito (16) separada de una segunda cámara (16b) del depósito (16) por una placa (18), definiendo la placa (18) una pluralidad de orificios (50) entremedias con cada orificio (50) dimensionado para siempre permitir el pase de la dimensión eficaz más grande de cada perla magnética y además dimensionado para siempre prevenir el pase de la dimensión eficaz más pequeña de cada entidad diana; y

15 aplicar una fuerza magnética debajo de la placa (18) suficiente para extraer perlas magnéticas no unidas a una entidad diana a través de los orificios (50) en la segunda cámara (16b) y suficiente para mantener las entidades diana unidas a una o más perlas magnéticas contra la superficie de la placa (18) dentro de la primera cámara (16a) del depósito (16).

11. El método de la reivindicación 10, que comprende además visualizar la superficie de placa (18) para determinar la presencia y/o cantidad de entidades diana.

12. El método de la reivindicación 10, que comprende además:

20 después de que las entidades diana hayan sido mantenidas en la superficie de placa (18), modificar la fuerza magnética a un nivel suficiente para permitir el desalojamiento de las entidades diana de la superficie de placa (18); y

hacer circular un líquido no reactivo a través de la primera cámara (16a) para desalojar las entidades diana.

13. El método de la reivindicación 10, que comprende además:

25 después de que las entidades diana hayan sido mantenidas en la superficie de placa (18), modificar la fuerza magnética a un nivel suficiente para permitir el desalojamiento de las perlas magnéticas no unidas de la segunda cámara (16b); y

hacer circular un líquido no reactivo a través de la segunda cámara (16b) para desalojar las perlas magnéticas.

30 14. El método de la reivindicación 10, en que el fluido se hace circular a una velocidad del orden de mililitros (ml) por minuto.

15. El método de la reivindicación 10 usado para detectar células tumorales circulantes (CTC) en una muestra de sangre de un paciente, que comprende la etapa de obtener una muestra de sangre como el fluido que contiene CTC como las entidades diana que se han unido a una o más perlas magnéticas funcionalizadas y una cantidad de perlas magnéticas funcionalizadas no unidas a una CTC.

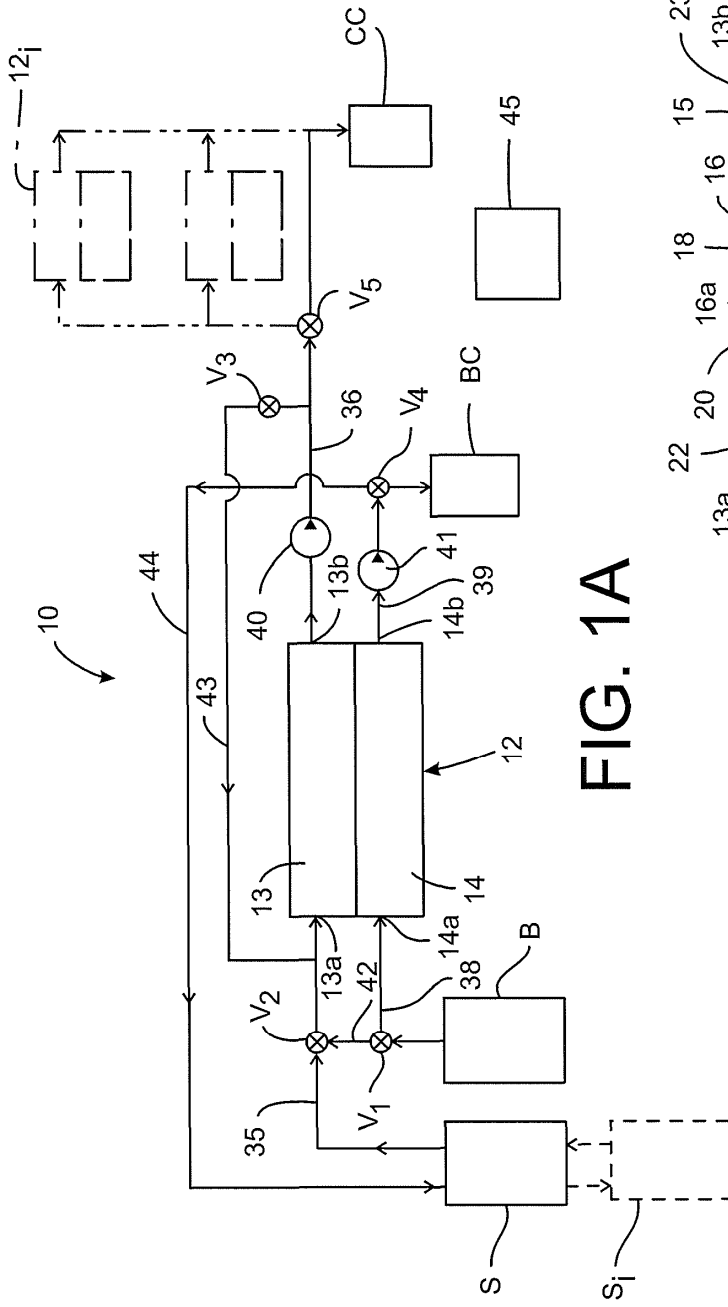


FIG. 1A

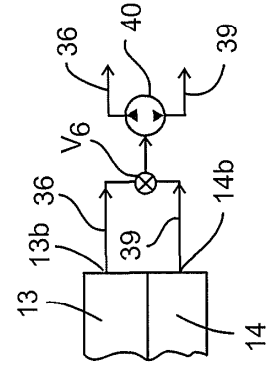


FIG. 1B

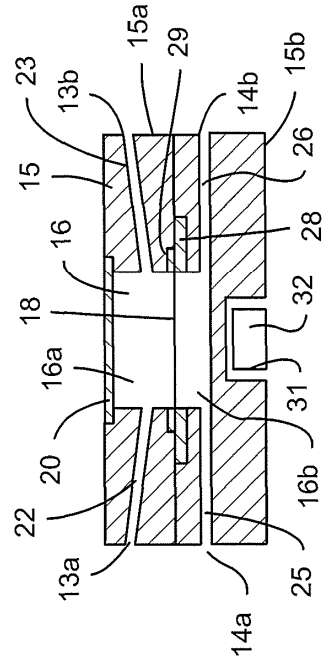


FIG. 2

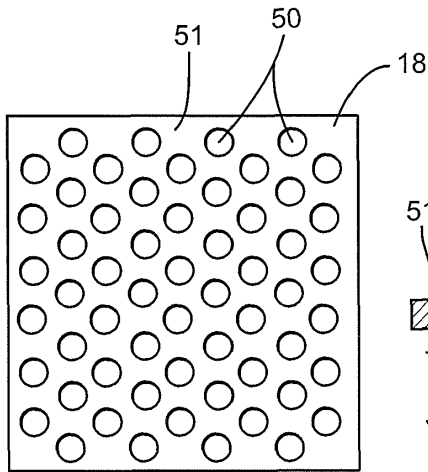


FIG. 3

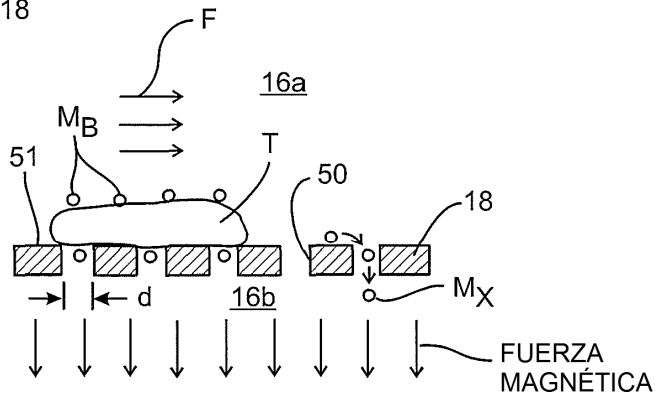


FIG. 4

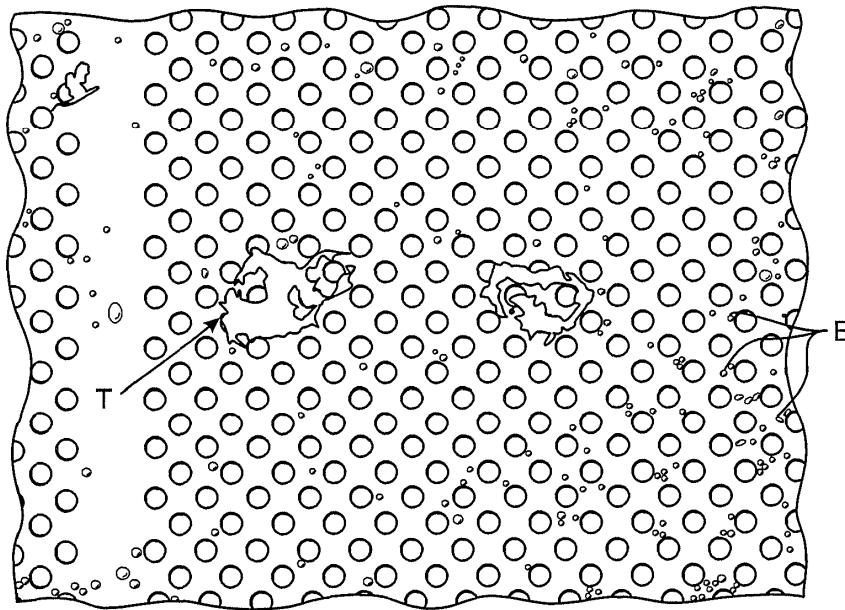


FIG. 6



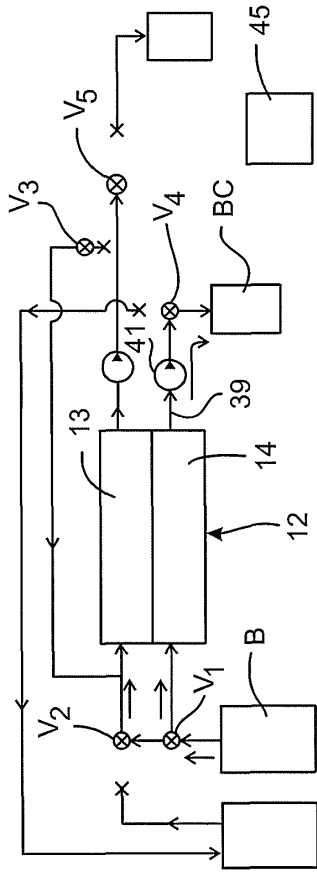


FIG. 5A

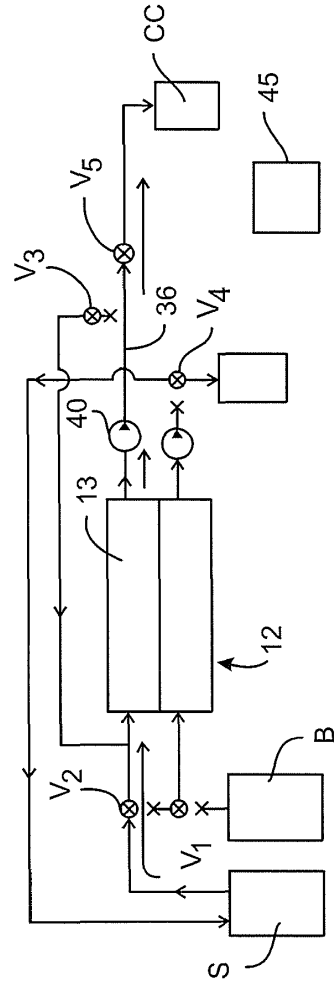


FIG. 5B

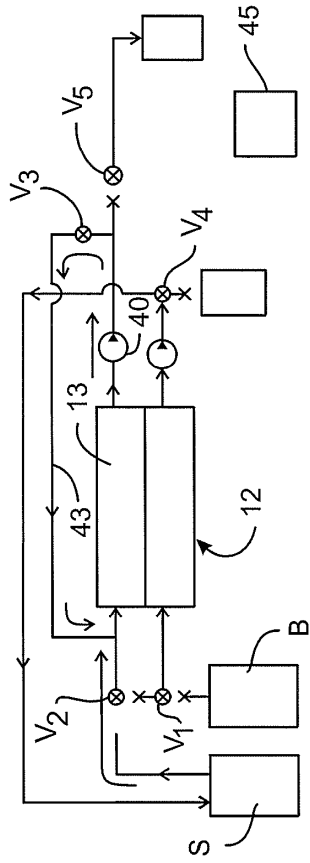


FIG. 5C

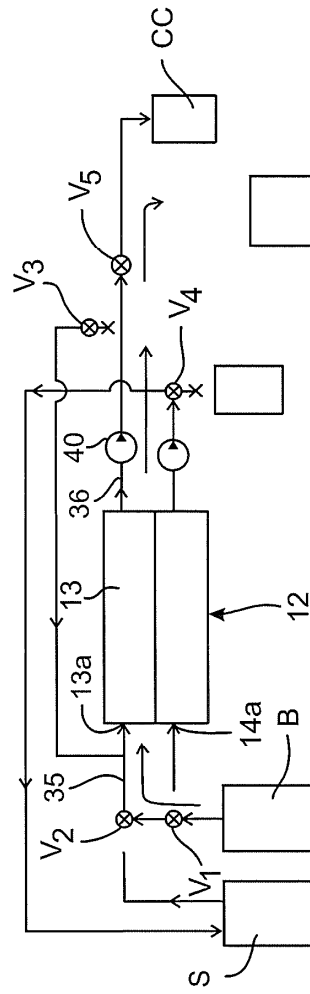


FIG. 5D