

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 861**

51 Int. Cl.:

G01N 33/48 (2006.01)
G01N 35/00 (2006.01)
G01N 35/08 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2010** **E 15188512 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017** **EP 2990795**

54 Título: **Método y aparato de detección de partículas raras**

30 Prioridad:

13.04.2009 US 168892 P

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

24.10.2017

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF WASHINGTON (100.0%)
4311 11th Avenue NE Suite 500 Campus Box
354990
Seattle, WA 98105-4608, US

72 Inventor/es:

CHIU, DANIEL T.;
SCHIRO, PEGGY G. y
KUO, JASON S.

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 638 861 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

Método y aparato de detección de partículas raras

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los fluidos corporales son suspensiones complejas de partículas biológicas en líquido. La sangre, por ejemplo, incluye plasma y células (glóbulos rojos, glóbulos blancos, plaquetas) y las células ocupan aproximadamente el 55 % de la sangre. El plasma es principalmente agua y transfiere proteínas, iones, vitaminas, enzimas, hormonas y otros químicos a las células del cuerpo.

Los glóbulos rojos tienen un tamaño de aproximadamente 6 a 8 μm de tamaño y sirven para proporcionar oxígeno a las células. Los glóbulos blancos tienen aproximadamente de 10 a 13 μm de diámetro y defienden al cuerpo de la enfermedad como parte de un sistema inmunológico luchando contra virus y bacterias extrañas. Las plaquetas son las células más pequeñas, de 1,5 a 3 μm , y dejan de sangrar formando coágulos sanguíneos.

Los fluidos además de la sangre, tales como saliva, lágrimas, orina, líquido espinal cerebral, así como otros fluidos corporales en contacto con diversos órganos (por ejemplo, pulmón) contienen mezclas de células y biopartículas. El tipo y la cantidad de células y biopartículas que están presentes en un fluido corporal particular (por ejemplo, sangre) revela información sobre la salud del organismo y, en el caso de un individuo infectado, información sobre el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad.

Algunas células o biopartículas están presentes en cantidades raras en comparación con las concentraciones nominales de células sanguíneas. A pesar de su rara aparición, estas células o biopartículas pueden estar intrínsecamente ligadas a eventos significativos que tienen lugar en el cuerpo que alteran el estado de salud de un individuo. Estas células se denominan comúnmente "células raras".

Por ejemplo, la diseminación de células cancerosas del tumor primario es un factor importante que rige la probabilidad de recaída y la tasa de supervivencia en pacientes con cáncer. A medida que las células cancerosas crecen sin regulación y pierden su capacidad de adherirse entre sí, pueden entrar en la sangre y la circulación linfática y circular por todo el cuerpo. Estas células se denominan comúnmente células tumorales circulantes (CTC), células tumorales diseminadas (DTC), células cancerosas circulantes (CCC), células epiteliales circulantes (CEC), células tumorales ocultas (OTC) u otras permutaciones similares para indicar la naturaleza móvil de estas células, en contraste con los especímenes obtenidos por biopsia directa de tumores sólidos. Se han detectado CTC en la sangre de pacientes que padecen todos los cánceres principales: próstata, ovario, mama, gástrico, colorrectal, renal, pulmonar, pancreático y otros.

De esta manera, se han desarrollado ensayos que cuentan con CTC presentes en los fluidos corporales para ayudar a proporcionar un pronóstico para pacientes de cáncer. También se puede usar un "ensayo de CTC" para controlar la respuesta de un paciente a un protocolo particular de tratamiento (por ejemplo, radioterapia o quimioterapia). Basándose en los resultados del ensayo de CTC, un paciente con cáncer puede evitar costes significativos al minimizar las innecesarias y costosas pruebas diagnósticas y terapias adicionales, que muchas veces no están cubiertas por el seguro de salud, por ejemplo, la tomografía computarizada (CT) o la tomografía por emisión de positrones (PET), o acortar los tratamientos farmacológicos que son ineficaces.

Sin embargo, las CTC están presentes en una concentración extremadamente baja en la sangre periférica, estimada en el orden de una célula tumoral por 10^6 a 10^7 células mononucleares, que es equivalente a una célula tumoral por 0,5 ml a 5 ml de sangre periférica. A tal concentración baja, una muestra con aproximadamente 100 millones de células mononucleares debe cribarse con el fin de detectar al menos una CTC con un 99,995 % de certeza. El uso de técnicas convencionales, tales como la exploración automática de microscopía digital (ADM) a una velocidad típica de 800 células/segundo, requerirá 18 horas para completar una muestra de ese tamaño, haciéndola poco práctica monetaria y temporalmente para su uso clínico.

Por ejemplo, puede emplearse citometría de flujo convencional para determinar la presencia o cantidad de CTC en una muestra de sangre. Sin embargo, la citometría de flujo requiere que las células estén organizadas linealmente en una fila y detecten cada célula singularmente porque la detección simultánea de dos células no puede interpretarse correctamente usando la tecnología existente. En la citometría de flujo, los rayos láser se enfocan de tal manera que sólo iluminan una única partícula en un momento dado. Por ejemplo, si una célula no fluorescente atraviesa el volumen de detección simultáneamente con una célula fluorescente configurada para ser detectable por el citómetro de flujo, la célula no fluorescente, que es invisible para el citómetro de flujo, estaría dirigida en la misma trayectoria que la célula fluorescente. Para evitar una interpretación errónea en citometría de flujo, las suspensiones de células se diluyen rutinariamente o se ralentizan para permitir suficiente distancia entre las células para evitar la

superposición de dos células dentro del volumen de detección. Los citómetros de flujo actuales del estado de la técnica tienen un límite superior de clasificación de 100.000 objetos/segundo.

Como tal, la citometría de flujo no es adecuada para detectar o recuperar células raras. La detección de células de una en una (en serie) y la toma de decisión sobre la trayectoria de cada célula es demasiado lenta cuando se analiza un gran número de células. Por ejemplo, dado que diez mililitros de sangre contienen aproximadamente diez mil millones de células, a 100.000 células por segundo, que es la velocidad de clasificación más alta del citómetro de flujo del estado de la técnica, tardará 100.000 segundos o 28 horas para ordenar por completo el contenido de 10 ml. Para las células raras, a menudo se requieren 7-15 ml de sangre para recoger un número estadísticamente significativo de células raras; la utilización de un citómetro de flujo para recuperar células raras es un consumo poco práctico de recursos clínicos y puede traducirse en un coste de ensayo muy alto.

Como tales, se necesitan técnicas sencillas y rentables para la detección y cuantificación de partículas y células raras en una muestra de fluido. La presente invención satisface estas y otras necesidades proporcionando métodos y aparatos para la detección de partículas raras en muestras de fluidos.

H. J. Gross *et al.*, "Detection of Rare Cells at a Frequency of One Per Million by Flow Cytometry", Cytometry, 14, 519-526, 1993, págs. 519-526, desvelan la detección de células raras.

El documento US 2002/081569 A1 desvela métodos para la purificación y/o identificación de partículas en una muestra líquida.

El documento US 5602042 A desvela un método para la recogida y transferencia de partículas desde una suspensión líquida a un portaobjetos de vidrio.

El documento US 2009/014360 A1 desvela métodos para enfocar partículas suspendidas dentro de un fluido móvil en una o más líneas de flujo localizadas.

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones. En particular, la presente invención es como se expone en las siguientes cláusulas:

1. Un aparato para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el aparato:

- (a) al menos un canal de entrada;
- (b) al menos un canal de salida;
- (c) al menos un detector;
- (d) un mecanismo capaz de dirigir un flujo de una alícuota de fluido, en el que la alícuota comprende una pluralidad de partículas distribuidas aleatoriamente a lo largo de un espacio tridimensional; y
- (e) un ordenador capaz de asignar un valor a la alícuota en base a la presencia, ausencia, identidad, composición o cantidad de las partículas raras en la alícuota, en el que el ordenador está en comunicación con el detector y el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota y en el que la partícula rara es una célula o macromolécula presente en la muestra de fluido a un nivel bajo que comprende menos de aproximadamente 1 parte por 10^3 de la población total de partículas en la muestra de fluido.

2. El aparato de acuerdo con la cláusula 1, que comprende al menos dos canales de salida; opcionalmente, en el que el mecanismo dirige el flujo de la alícuota a un primer canal de salida si la alícuota contiene la partícula rara o un segundo canal de salida si la alícuota no contiene la partícula rara; opcionalmente en el que el mecanismo dirige el flujo de la alícuota que contiene la partícula rara a un canal de salida dependiendo de la identidad, composición o cantidad de la partícula rara.

3. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota comprende un electrodo, un elemento magnético, un elemento acústico o un elemento electroaccionado; o en el que el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota comprende una o más válvulas o pistones electroaccionados, en el que las válvulas o pistones controlan el flujo de la alícuota en al menos un primer canal de flujo direccional que cruza con el canal de entrada y el canal de salida en una primera unión.

4. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que el canal de salida está en comunicación de fluido con el canal de entrada.

5. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, que comprende:

una tubería, un puerto o una interconexión en comunicación de fluido con el canal de entrada; opcionalmente en el que una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido se forman externamente al

aparato y fluyen hacia el canal de entrada del aparato a través de la tubería, el puerto o la interconexión en comunicación de fluido con el canal de entrada; y/o, una pluralidad de canales de flujo, y en el que una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido se separan físicamente en la pluralidad de canales de flujo.

5

6. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que:

el mecanismo es capaz de dirigir en paralelo la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; y/o, el detector comprende un dispositivo de formación de imágenes; y/o,

10 el detector comprende más de un dispositivo de detección; o en el que el detector comprende un único dispositivo de detección; y/o,

15 el detector se selecciona del grupo que consiste en una cámara, un multiplicador de electrones, un sensor de imagen de dispositivo de carga acoplada (CCD), un tubo fotomultiplicador (PMT), un fotodiodo de avalancha (APD), un diodo de avalancha de fotón único (SPAD), y un sensor de imagen de semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS); o comprende un fotodetector, electrodetector, detector acústico o magnético; o en el que el detector incorpora imágenes de microscopía por fluorescencia.

7. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que:

20 el aparato comprende una fuente de radiación electromagnética para la interrogación de la alícuota; y/o, el detector es capaz de detectar en paralelo la presencia o ausencia de la partícula rara en la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; o la formación en imágenes en paralelo de la partícula rara en la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido.

25 8. Un método para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el método:

(a) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota de la muestra de fluido;
(b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la partícula rara en la alícuota, en el que la partícula rara es una célula o macromolécula presente en la muestra de fluido a un nivel bajo que
30 comprende menos de aproximadamente 1 parte por 10^3 de la población total de partículas en la muestra de fluido; y
(c) dirigir un flujo de o recoger la alícuota basándose en el valor asignado.

35 9. El método de la cláusula 8, en el que la dirección del flujo de la alícuota comprende el uso de un mecanismo capaz de dirigir el flujo de la alícuota, y en el que la alícuota comprende una pluralidad de partículas distribuidas aleatoriamente a lo largo de un espacio tridimensional.

10. El método de la cláusula 8, en el que la detección comprende:

40 (i) poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende el reactivo de detección y una partícula rara; y
(ii) detectar la presencia o ausencia del complejo formado en (i) en la alícuota de la muestra de fluido.

45 11. El método de la cláusula 8, que comprende:

(i) poner en contacto un fluido biológico de un sujeto con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende el reactivo de detección y la partícula rara, en el que la partícula rara es una célula o macromolécula presente en el
50 fluido biológico en un nivel bajo;
(ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado en (i) en la alícuota del fluido biológico;
(iii) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de un complejo formado en (i).

55 12. El método de la cláusula 8, en el que la partícula rara se pone en contacto con un reactivo de detección diferenciable.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que a la alícuota se le asigna un primer valor si la alícuota contiene la partícula rara, o un segundo valor si la alícuota no contiene la partícula rara; opcionalmente en el que el primer valor depende de la identidad de la partícula
60 rara o de la concentración de la partícula rara en la alícuota; opcionalmente en el que múltiples alícuotas que tienen el mismo valor asignado se agrupan entre sí.

14. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, que comprende dirigir un flujo o recoger la alícuota en base al valor asignado, en el que dirigir el flujo de la alícuota comprende usar un
65 mecanismo capaz de dirigir el flujo de la alícuota, y en el que la alícuota comprende una pluralidad de partículas distribuidas aleatoriamente a lo largo de un espacio tridimensional.

15. El método de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores, en el que:

la detección se realiza durante el flujo continuo de la muestra de fluido a través de un canal de flujo; y/o, la dirección comprende utilizar un mecanismo capaz de dirigir en paralelo el flujo de la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; opcionalmente en el que la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido están físicamente separadas antes de la detección; opcionalmente en el que las alícuotas en la pluralidad de alícuotas se dividen en canales o cámaras de flujo separadas antes de la detección; y/o,

la detección comprende:

(i) interrogar la alícuota con una fuente externa de radiación electromagnética; y

(ii) detectar la fluorescencia de la partícula rara; y/o

la detección comprende usar más de un dispositivo de interrogación y/o dispositivo de detección; o en el que la detección comprende el uso de un único dispositivo de interrogación y/o dispositivo de detección; y/o,

la detección comprende detectar la bioluminiscencia o quimioluminiscencia de la partícula rara; y/o,

el reactivo de detección es diferenciable por fluorescencia a diferentes longitudes de onda; y/o,

la muestra de fluido se pone en contacto simultáneamente con una pluralidad de reactivos de detección diferenciables, teniendo cada uno una especificidad diferente en condiciones suficientes para transformar la pluralidad de reactivos de detección en una pluralidad de complejos que comprenden los reactivos de detección y una pluralidad de partículas raras; opcionalmente en el que la pluralidad de complejos se detectan en paralelo; y/o

la detección comprende detectar en paralelo la presencia o ausencia de la partícula rara en una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; o formar imágenes en paralelo de la partícula rara en una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido.

16. El aparato de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas anteriores o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

una alícuota en la pluralidad de alícuotas comprende un volumen discreto; y/o,

la partícula rara es una célula rara; y/o,

la alícuota contiene más de una partícula rara; y/o,

la muestra de fluido es un fluido biológico.

Entre otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos y aparatos que exploran rápidamente un gran volumen de un fluido para la detección y/o cuantificación de biopartículas deseadas mediante la clasificación de alícuotas. En un aspecto, el concepto empleado, denominado clasificación de alícuotas de decisión de conjunto ("eDAR"), es particularmente útil para detectar células raras en biofluidos.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un método para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el método las etapas de detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota de la muestra de fluido, asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la partícula rara, y dirigir el flujo o recogida de la alícuota en base al valor asignado.

En una segunda realización, la presente divulgación proporciona un método para proporcionar a un sujeto un diagnóstico o pronóstico para una afección asociada con la presencia de una partícula rara en un fluido biológico, comprendiendo el método las etapas de detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota del fluido biológico, asignando un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la partícula rara, y proporcionando un diagnóstico o pronóstico al sujeto en base al valor asignado.

En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona un dispositivo para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el dispositivo al menos un primer canal de entrada, al menos dos canales de salida, al menos un detector capaz de detectar una o más partículas raras en una alícuota de la muestra de fluido, un mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota, y un ordenador capaz de asignar un valor a la alícuota en base a la presencia, ausencia, identidad, composición o cantidad de las partículas raras en la alícuota, en el que el ordenador está en comunicación con el detector y el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 ilustra la detección simultánea de múltiples partículas en una alícuota y las direcciones de la alícuota.

La figura 2 ilustra una máscara con aperturas para mejorar la relación señal/ruido como se utiliza en la eDAR.

La figura 3 ilustra una máscara con aperturas estrechamente espaciadas para mejorar la relación señal-ruido como se utiliza en la eDAR.

La figura 4 ilustra un aparato eDAR que consiste en un único canal de flujo, 2 láseres y tres detectores.

La figura 5 ilustra un aparato eDAR que consiste en tres canales de flujo, un láser y un detector.
 La figura 6 ilustra un aparato eDAR que consiste en tres canales de flujo, un láser y tres detectores.
 La figura 7 ilustra un aparato eDAR que consiste en cinco canales de flujo, un láser y tres detectores.
 La figura 8 muestra una comparación en los recuentos de células tumorales circulantes (CTC) de la sangre usando eDAR (panel superior) y un instrumento comercial (CellSearch de Veridex, panel inferior).
 Las figuras 9A-C muestran las imágenes ópticas de células cancerosas atrapadas a partir de sangre de paciente usando eDAR (las flechas marcan las CTC) bajo diversas iluminaciones. La figura 9A es una imagen de campo claro de una CTC en medio de glóbulos rojos. La figura 9B es una imagen de fluorescencia que indica la presencia de pan-citoqueratina. La figura 9C es una imagen de fluorescencia que indica la ausencia de CD45, descartando así la posibilidad de falsa identificación de un glóbulo blanco como una CTC.
 Las figuras 10A-D muestran imágenes ópticas de células madre cancerosas que se distinguen de las células cancerosas ordinarias. Las puntas de flecha indican células madre de cáncer (CD44+/CD24-). La figura 10A es una imagen de fluorescencia (500-540 nm) para detectar Alexa 488-anti-CD44 (verde); la figura 10B es una imagen de fluorescencia (645-700 nm) para detectar Alexa 647-anti-CD24 (rojo); la figura 10C es la imagen de campo claro. La figura 10D es una imagen compuesta que indica CD44+/CD24- (las flechas indican células madre de cáncer).
 Las figuras 11A-D ilustran el funcionamiento del dispositivo 1110 para dividir en alícuotas una suspensión. Las figuras 12A-C ilustran el dispositivo 1210 utilizado para dividir en alícuotas la suspensión con cinco canales de fluido (1211, 1212, 1213, 1214 y 1215) unidos en la unión 1240.
 La figura 13 muestra las señales de fluorescencia recogidas de 2 fotodiodos de avalancha (APD) situados en diferentes lugares aguas arriba y aguas abajo de la unión 1116 (o 1240). El gráfico 1310 muestra la huella de señal 1311 de un APD configurado para detectar la presencia de la molécula de EpCAM en una alícuota al volumen de detección 1140 (o 1270), mientras que el gráfico 1320 muestra a huella de señal 1321 de un segundo APD configurado para detectar la presencia de la molécula de EpCAM en el canal 1114 (o 1214).
 La figura 14 muestra el gráfico 1410 que ilustra el porcentaje de células cancerosas recuperado en función de la longitud del pulso usando eDAR. La huella 1420 indica que cuando el ancho de pulso era de 10 ms o menos, el 100 % de las células cancerosas se recogieron en el canal correcto.
 La figura 15 muestra el gráfico 1510 indicando la huella 1520 el porcentaje de células raras recuperadas en función del caudal entrante.
 La figura 16 ilustra el uso de alícuotas acuosas discretas separadas por una fase inmiscible para encapsular biopartículas antes de alcanzar el volumen de detección.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

I. Descripción general

En un aspecto, la presente divulgación proporciona métodos y aparatos para detectar y/o recuperar partículas raras en una muestra de fluido. El concepto incorporado en este aspecto se denomina en el presente documento "Clasificación de alícuotas de decisión de conjunto" o "eDAR". En un aspecto de la presente divulgación, la metodología eDAR puede caracterizarse como (i) detección de la presencia de ausencia de una partícula rara en una alícuota de la muestra de fluido, (ii) clasificación de la alícuota de acuerdo con la presencia o ausencia de una partícula rara, y (iii) dirección del flujo o recogida de toda la alícuota en base a la clasificación asignada.

Para encontrar células raras, la eDAR ofrece una tremenda ventaja en cuanto a velocidad. Como ejemplo de esto, se considera una suspensión celular de 10 ml que contiene 10 células raras deseadas. En este caso, aproximadamente el 99,9999 % del volumen de la suspensión no contiene una única célula rara deseada. Las tecnologías existentes, tales como citometría de flujo, FACS, etc., invariablemente exploran en serie a través de cada célula contenida en todo el volumen de la suspensión, lo que da como resultado una pérdida de casi todo el tiempo explorando a través del 99,9999 % del volumen de suspensión que no contiene una célula deseada. La EDAR permite una rápida selección de alto nivel de toda la suspensión alicuotando la suspensión. Si las células son realmente raras, la mayoría de las alícuotas no contendrán ninguna célula deseada. En un aspecto de la presente divulgación, estas alícuotas se clasifican como nulas y se descartan a través de un primer canal. En comparación, las pocas alícuotas que contienen células raras se clasifican como no nulas y se recogen en un canal o cámara separados.

De esta manera, la eDAR es distinta de la citometría de flujo convencional. La citometría de flujo opera (1) fluyendo biopartículas en una única hilera (es decir, una por una en una fila) a través del uso de un flujo envolvente para contener la fila de partículas, (2) detectando sólo una biopartícula a la vez, y (3) determinando la trayectoria de la biopartícula detectada. Si se desea la biopartícula detectada, por ejemplo, la biopartícula está dirigida, a través de uno de una diversidad de métodos, a seguir una cierta trayectoria para alcanzar un recipiente de recogida. Si la biopartícula detectada es indeseable, la biopartícula se dirige en una trayectoria diferente para alcanzar un recipiente de recogida diferente.

A diferencia de la citometría de flujo convencional, la eDAR interroga alícuotas enteras, es decir,

subdivisiones tridimensionales de un fluido, para tomar una decisión de conjunto para toda la alícuota. A diferencia de la serialización (subdivisión unidimensional del fluido, que da como resultado biopartículas dispuestas en una sola fila) o planarización (subdivisión bidimensional del fluido, que da como resultado biopartículas dispuestas en múltiples filas paralelas en un plano), la división en alícuotas ofrece un rendimiento mucho mayor. La citometría de flujo es incapaz de analizar una alícuota porque los detectores están configurados sólo para recoger señales de una sola célula o un único plano de células. Las biopartículas fuera del punto o plano de detección son totalmente invisibles para los detectores utilizados en los citómetros de flujo y, por consiguiente, el flujo envolvente, los tampones de guía, u otros mecanismos de enfoque hidrodinámico o geométrico son necesarios para evitar la migración de biopartículas fuera del punto o plano de detección. La EDAR analiza una alícuota completa que abarca más de un plano o capa de biopartículas. En la eDAR, se analizan las señales que emanan de una alícuota completa, en contraposición a un único punto o plano de detección.

La eDAR ofrece una sensibilidad significativamente mayor sobre los métodos existentes para detectar o aislar células raras. Los componentes de detección de eDAR pueden detectar un único fotón emanado dentro de la alícuota entera y, por lo tanto, no se pierde ninguna biopartícula que muestre características detectables. La tasa de falsos negativos es extremadamente baja porque la clasificación de alícuotas está configurada para eliminar sólo alícuotas que se clasifican como completamente desprovistas de biopartículas deseadas.

Las realizaciones de acuerdo con la presente invención pueden utilizarse en una amplia diversidad de aplicaciones en biología y diagnóstico de enfermedades, incluyendo la captura de células cancerosas o células madre de cáncer de fluidos corporales para el pronóstico de cáncer; parásitos como giardia o cryptosporidium para el control de la calidad del agua; eritrocitos infectados por el paludismo para el diagnóstico de la malaria; linfocitos y leucocitos para la monitorización del VIH; células fetales en la sangre materna para la detección de enfermedades; células madre para terapia; células infectadas por priones para la detección de enfermedades relacionadas con priones (por ejemplo, vaca loca).

Además de la malaria, la presente invención puede utilizarse para monitorizar los linfocitos T CD4+ en el diagnóstico y monitorización del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). El recuento absoluto de linfocitos T CD4+ puede servir como criterio para iniciar la terapia antirretroviral y la profilaxis de la infección oportunista en pacientes infectados por el VIH. La reducción de los linfocitos T CD4+, que es una subpoblación de leucocitos (glóbulos blancos), se correlaciona fuertemente con la disminución de la defensa inmunológica. El Servicio de Salud Pública del CDC ha recomendado el monitoreo del nivel de linfocitos T CD4+ cada 3-6 meses en todas las personas infectadas con el VIH como una forma de iniciar estrategias de tratamiento apropiadas y evaluar la eficacia del tratamiento.

En algunos laboratorios, el número absoluto de linfocitos T CD4+ se establece utilizando el producto de tres técnicas de laboratorio: el recuento total de glóbulos blancos, el porcentaje de glóbulos blancos que son linfocitos, y el porcentaje de linfocitos que son linfocitos T CD4+. Los citómetros de flujo de una única plataforma tal como FACSCount (BD Biosciences) no están comercialmente disponibles en los países en desarrollo o como dispositivos portátiles. Pueden utilizarse realizaciones de acuerdo con la presente materia objeto para distinguir rápidamente los linfocitos T CD4+ de otros leucocitos y hematíes.

Otras aplicaciones posibles para separación, concentración y/o aislamiento dirigidas por realizaciones de acuerdo con la presente invención incluyen monitorización de células fetales en sangre materna para diagnóstico prenatal de trastornos genéticos y detección de priones. Un prión incluye una pequeña partícula proteica infecciosa que resiste la inactivación mediante procedimientos que modifican los ácidos nucleicos. Además, las realizaciones de acuerdo con la presente materia objeto pueden usarse con células fetales u otras partículas microbiológicas o partículas nanobiológicas.

II. Definiciones

Como se usa en el presente documento, una "muestra de fluido" se refiere a cualquier líquido que puede o no contener una partícula rara de interés. En ciertas realizaciones, la muestra de fluido puede ser una muestra de fluido biológico, por ejemplo, una muestra de sangre, una muestra de plasma, una muestra de saliva, una muestra de orina, una muestra de linfa, una muestra de fluido espinal, y similares. En otras realizaciones, la muestra puede ser una muestra de fluido ambiental, por ejemplo, de un lago, río, océano, estanque, arroyo, ciénaga, pantano, embalse, o similar. En otras realizaciones, la muestra puede ser una muestra de agua, por ejemplo, de una planta de desalinización, una planta de tratamiento de agua, un depósito, un muelle, una corriente, un flujo de agua glacial, una torre de agua, u otra fuente de agua que pueda contemplarse como una fuente de agua potable.

Como se utiliza en el presente documento, una "partícula rara" se refiere a una célula o macromolécula presente en una muestra de fluido a un nivel bajo. En ciertas realizaciones, una partícula rara puede ser una célula, proteína, complejo de proteína, ácido nucleico, complejo de nucleoproteína, carbohidrato, metabolito, catabolito, y similares. En ciertas realizaciones, una partícula puede considerarse rara si está

presente en una muestra de fluido a una concentración de menos de aproximadamente el 10 % de la población total de partículas en el fluido, o en menos de aproximadamente el 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, o menos de la población total de partículas en el fluido. En otras realizaciones, la partícula rara puede estar presente en una muestra de fluido a menos de aproximadamente 1 parte por 10^3 de la población total de partículas en el fluido, o en menos de aproximadamente 1 parte por 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , o menos de la población total de partículas en el fluido.

En una realización particular, la partícula rara es una célula rara. Las células raras pueden estar nucleadas o no nucleadas. Las células raras incluyen, pero sin limitación, células que expresan un fenotipo maligno; células fetales, tales como células fetales en sangre periférica materna, células tumorales, tales como células tumorales que han sido eliminadas de tumor en sangre u otros fluidos corporales; células infectadas con un virus, tales como células infectadas por VIH, células transfectadas con un gen de interés; y subtipos aberrantes de linfocitos T o linfocitos B presentes en la sangre periférica de sujetos afectados con trastornos auto-reactivos.

Como se usa en el presente documento, una "decisión de conjunto" se refiere a una decisión tomada en base a la detección de la presencia o ausencia de una característica en un conjunto, o un grupo de partículas. En ciertas realizaciones, se tomará una decisión de conjunto en base la presencia o ausencia de una única partícula distinta en una alícuota de una muestra de fluido que contiene una pluralidad de partículas. De forma importante, las decisiones de conjunto hechas en base a la presencia o ausencia de una única partícula se aplicarán a toda la alícuota (es decir, a todas las partículas presentes en la alícuota).

Como se usa en el presente documento, una "alícuota" se refiere a una porción del volumen total de una muestra de fluido a analizar. Una alícuota ocupa un espacio tridimensional y las partículas dentro se distribuyen al azar sin organización. Una alícuota tiene una profundidad finita, y las partículas pueden distribuirse a lo largo de la profundidad sin capas discernibles. En el contexto de la presente invención, una alícuota se analiza en su totalidad sin subdivisión. La hoja, la cinta, el plano o términos similares que sugieren espacios bidimensionales y que se usan para describir métodos de clasificación de células actuales (por ejemplo, citometría de flujo, FACS, etc.) que típicamente emplean enfoque hidrodinámico no se consideran una alícuota.

En ciertas realizaciones, una alícuota puede consistir en una fracción de una muestra de fluido más grande, por ejemplo, aproximadamente 1/2 de una muestra de fluido, o aproximadamente 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/7, 1/8, 1/9, 1/10, o menos de una muestra de fluido. En ciertas realizaciones, una alícuota puede consistir, por ejemplo, en aproximadamente el 10 % de una muestra de fluido, o aproximadamente el 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05%, 0,01%, 0,001%, o menos de una muestra de fluido. Como tal, un fluido que se va a examinar o procesar mediante una metodología eDAR proporcionada en el presente documento se puede dividir, por ejemplo, en al menos aproximadamente 2 alícuotas, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 6.000, 7.000, 8.000, 9.000, 10.000, 20.000, 30.000, 40.000, 50.000, 60.000, 70.000, 80.000, 90.000, 100.000, 200.000, 300.000, 400.000, 500.000, 600.000, 700.000, 800.000, 900.000, 1 millón, 2 millones, 3 millones, 4 millones, 5 millones, 6 millones, 7 millones, 8 millones, 9 millones, 10 millones, o más alícuotas. Un experto en la técnica entenderá que el número de alícuotas en las que se dividirá una muestra de fluido dependerá del número de partículas raras esperadas en el fluido y del volumen total de la muestra de fluido.

En ciertas realizaciones, una alícuota puede tener un volumen, por ejemplo, de entre aproximadamente 0,1 nl y aproximadamente 10 ml, o entre aproximadamente 1 nl y aproximadamente 1 ml, o entre aproximadamente 1 nl y aproximadamente 100 μ l, o entre aproximadamente 1 nl y aproximadamente 1 μ l, o entre aproximadamente 1 nl y aproximadamente 100 nl.

Como se usa en el presente documento, el término "clasificación" se refiere a la evaluación de una propiedad cuantitativa, propiedad cualitativa, o importancia de una alícuota por categorización. En una realización, una alícuota puede clasificarse como nula (por ejemplo, cuando una partícula rara no se detecta en la alícuota) o no nula (por ejemplo, cuando al menos una partícula rara se detecta en una alícuota). En una realización, la clasificación puede ser binaria. En otras realizaciones, una alícuota puede clasificarse según categorías adicionales, por ejemplo, que se correlacionan con la concentración de la partícula rara en la alícuota, la identidad de la partícula rara en la alícuota, las identidades de una pluralidad de diferentes partículas raras en la alícuota, y similares. De esta manera, se pueden asignar cualquier número de categorías basándose en intervalos de concentración, por ejemplo, entre aproximadamente 1 y 10, entre aproximadamente 11 y 20, entre aproximadamente 1 y 50, entre aproximadamente 51 y 100, entre aproximadamente 1 y 100, entre aproximadamente 101 y 201, etc. A

estas clasificaciones se les puede asignar un número arbitrario que corresponde a una de varias categorías cuantitativas o cualitativas predeterminadas (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, etc.), o un número correspondiente a un valor real para el número o número aproximado o partículas raras en la alícuota.

5 Como se usa en el presente documento, una "característica detectable" se refiere a una propiedad asociada con una partícula rara, por ejemplo, una propiedad fotoactiva, electroactiva, bioactiva o magnética que es intrínseca a la partícula rara o que está asociada con un resto detectable unido a o conjugado con la partícula rara.

10 Los ejemplos de propiedades fotoactivas incluyen, por ejemplo, alteraciones en la intensidad óptica (reflexión óptica, dispersión, deflexión, transmisión o absorbancia) comúnmente inducida por la morfología de biopartículas (tamaño de partícula, granularidad, estructuras subcelulares internas), fluorescencia, inmunofluorescencia, y similares.

15 Los ejemplos de propiedades electroactivas incluyen, por ejemplo, cambios en la carga eléctrica, estado de oxidación, estado de giro, capacitancia, conductancia, propiedades dieléctricas, movilidad electroforética, o polarizabilidad.

20 Los ejemplos de propiedades bioactivas incluyen, por ejemplo, interacciones detectables con enzimas tales como fosfatasa alcalina (AP), peroxidasa de rábano picante (HRP), β -galactosidasa y sus sustratos quimioluminiscentes, colométricos o quimiofluorescentes, que incluyen, pero sin limitación, TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), OPD (o-fenilen-diamina, ABTS (sulfonato de 2,2'-azinodietilbenzotiazolina), clornaftol, AEC (3-amino-9-etilcarbazol), DAB (Diaminobenzidina), PNPP (fosfato de p-nitrofenilo), BCIP/NBT (fosfato de bromocloroindolilo - nitro azul Tetrazolio, y similares).

25 En ciertas realizaciones, los restos que pueden usarse para detectar una partícula rara incluyen, sin limitación, nanopartículas, microperlas, anticuerpos y fragmentos de los mismos, anticuerpos fluorescentes, nanopartículas magnéticas, moléculas de polímero, moléculas de colorante, moléculas de ADN o ARN (por ejemplo, aptámeros), moléculas lipídicas, moléculas de proteínas, y similares.

30 Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" se refiere a un polipéptido que comprende una región de armazón a partir de un gen de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos que se une específicamente y reconoce un antígeno. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon y mu, así como los genes de la región variable de inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, alfa, delta o épsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, respectivamente. Típicamente, la región de unión a antígeno de un anticuerpo será más crítica en especificidad y afinidad de unión. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, derivados de suero, un hibridoma o clonados recombinantemente, y también pueden ser quiméricos, primatizados u humanizados.

40 Una unidad estructural de inmunoglobulina ejemplar (anticuerpo) comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que son los principales responsables del reconocimiento del antígeno. Los términos cadena ligera variable (VL) y cadena pesada variable (VH) se refieren respectivamente a estas cadenas ligera y pesada.

50 Los anticuerpos existen, por ejemplo, como inmunoglobulinas intactas o como varios fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con diversas peptidasas. Por lo tanto, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir $F(ab)'_2$, un dímero de Fab que a su vez es una cadena ligera unida a V_H-C_H1 por un enlace disulfuro. El $F(ab)'_2$ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo así el dímero $F(ab)'_2$ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase Fundamental Immunology (Paul ed., 3ª ed. 1993). Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* químicamente o usando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye fragmentos de anticuerpo producidos por la modificación de los anticuerpos completos, o los sintetizados *de novo* usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario) o los identificados usando bibliotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990)).

60 En una realización, el anticuerpo se conjuga con un marcador o un resto detectable.

65 Como se usa en el presente documento, un "marcador" o un "resto detectable" se refiere a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos,

químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores útiles incluyen, sin limitación, radionúclidos, tintes fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC), verde Oregon, rodamina, rojo Texas, isotiocianato de tetraarodimina (TRITC), Cy3, Cy5, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo, proteína fluorescente verde (GFP), ficoeritrina, etc.), compuestos fluorescentes autoinactivados que son activados por proteasas asociadas a tumor, enzimas (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, etc.), nanopartículas, biotina, digoxigenina, y similares.

En ciertas realizaciones, los reactivos de detección pueden perfundirse para marcar selectivamente o acentuar las células aisladas. Los ejemplos de dichos reactivos incluyen, sin limitación, moléculas fluorescentes, inmunofluorescentes, conjugadas con tinte (tales como anticuerpos, fragmentos fab, aptámeros, polímeros, ligandos, agonistas, antagonistas o combinaciones de los mismos) compuestos magnéticos, electroactivos, bioactivos o fotoactivos. Un ejemplo es usar un tinte que reaccione con citoqueratinas, que son componentes integrales del citoesqueleto en células epiteliales cancerosas. Otros ejemplos de tinte incluyen el anticuerpo epitelial antihumano de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y anti-CD45 conjugado con ficoeritrina (PE). Otros ejemplos de anticuerpos conjugados con tinte incluyen, pero sin limitación, el anticuerpo pan-citoqueratina A45B/B3, AE1/AE3 o CAM5.2 (anticuerpos pan-citoqueratina que reconocen citoqueratina 8 (CK8), citoqueratina 18 (CK18), o la citoqueratina 19 (CK19) y los contrarios: antígeno de cáncer de mama NY-BR-1 (también conocido como B726P, ANKRD30A, dominio de repetición de ankirina 30A); isoforma B305D A o C (B305D-A o B305D-C; también conocido como antígeno B305D); antígeno de Hermes (también conocido como Antígeno CD44, PGP1); E-cadherina (también conocida como Uvomorulina, Cadherina-1, CDH1); antígeno carcino-embriionario (CEA; también conocido como CEACAM5 o molécula de adhesión celular 5 relacionada con antígeno Carcino-embriionario); gonadotropina coriónica humana β (β -HCG; también conocida como CGB, gonadotropina crónica, polipéptido β); catepsina-D (también conocida como CTSD); receptor del neuropéptido Y Y3 (también conocido como NPY3R; proteína 3 asociada a lipopolisacárido, LAP3, Fusión; quimiocina (motivo CXC, receptor 4); CXCR4); Oncogén ERBB1 (también conocido como c-erbB-1, receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR); Her-2 Neu (también conocido como c-erbB-2 o ERBB2); receptor GABA A, polipéptido pi (π) (también conocido como GABARAP, receptor GABA-A, polipéptido pi (π) (GABA A(π), subunidad pi (π) del receptor A del tipo ácido γ -aminobutírico), o GABRP); ppGalNAc-T(6) (también conocido como β -1-4-N-acetil-galactosaminil-transferasa 6, GalNAcTransferasa 6, GalNAcT6, UDP-N-acetil-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 6, o GALNT6); CK7 (también conocida como Citoqueratina 7, Sarcolectina, SCL, Queratina 7, o KRT7); CK8 (también conocida como Citoqueratina 8, Queratina 8, o KRT8); CK18 (también conocida como Citoqueratina 18, Queratina 18, o KRT18); CK19 (también conocida como Citoqueratina 19, Queratina 19, o KRT19); CK20 (también conocida como Citoqueratina 20, Queratina 20, o KRT20); Mage (también conocido como subtipos A de la familia del antígeno de melanoma o subtipos de MAGE-A); Mage3 (también conocido como familia A del antígeno de melanoma 3, o MAGA3); receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (también conocido como HGFR, carcinoma papilar de células renales 2, RCCP2, Protooncogén met, o MET); Mucina-1 (también conocida como MUC1, antígeno de carcinoma 15.3, (CA15.3), antígeno de carcinoma 27.29 (CA 27.29); antígeno CD227, Episialina, antígeno de membrana epitelial (EMA), mucina epitelial polimórfica (PEM), mucina urinaria de reactivo de cacahuete (PUM), glicoproteína asociada a tumor 12 (TAG 12)); proteína de fluido de enfermedad quística grave (también conocida como GCDP-15, proteína inducida por prolactina, PIP); receptor de urocinasa (también conocido como uPR, antígeno CD87, receptor de activador de plasminógeno de tipo urocinasa, PLAUR); PTHrP (proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea; también conocidas como PTHLH); BS106 (también conocido como B511S, mucina epitelial de mama pequeña, o SBEM); lipofilina B de tipo prostateína (LPB, LPHB; también conocido como antígeno BU101, miembro 2 1-D de la familia de secretoglobina, SCGB1-D2); Mamaglobina 2 (MGB2; también conocida como Mamaglobina B, MGBB, Lacriglobina (LGB) Lipofilina C (LPC, LPHC), miembro 1 de la familia de secretoglobina 2A, o SCGB2A1); Mamaglobina (MGB; también conocida como Mamaglobina 1, MGB1, Mamaglobina A, MGBA, miembro 2 de la familia de secretoglobina 2A, o SCGB2A2); inhibidor de serina proteasa mamaria (Maspina, también conocido como clado B de inhibidor de serina (o cisteína) proteinasa (ovalbumina), miembro 5, o SERPINB5); factor de transcripción Ets específico de epitelio prostático (PDEF; también conocido como factor de transcripción ets que contiene el dominio apuntando al motivo alfa estéril, o SPDEF); transductor de señal de calcio asociado a tumor 1 (también conocido como antígeno de carcinoma colorrectal CO17-1A, Glicoproteína epitelial 2 (EGP2), Glicoproteína epitelial 40 kDa (EGP40), molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), antígeno específico epitelial (ESA), antígeno asociado a tumor gastrointestinal 733-2 (GA733-2), antígeno KS1/4, componente de membrana de marcador de superficie 1 del cromosoma 4 (M4S1), antígeno MK-1, antígeno MIC18, antígeno TROP-1, o TACSTD1); transcriptasa inversa de Telomerasa (también conocida como subunidad de Telomerasa catalítica, o TERT); Factor 1 de trébol (también conocido como secuencia inducible por estrógenos de cáncer de mama, BCEI, proteína de trébol gastrointestinal, GTF, proteína pS2, o TFF1); folato; o Factor 3 de trébol (también conocido como Factor de trébol intestinal, ITF, p1.B; o TFF3).

La expresión "se une específicamente (o selectivamente)" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactiva con", cuando se refiere a una partícula rara, por ejemplo, una proteína, ácido nucleico o célula, se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la

partícula rara, a menudo en una población heterogénea de partículas y otros productos biológicos. Por lo tanto, bajo las condiciones de inmunoensayo designadas, los anticuerpos especificados se unen a una partícula rara particular al menos dos veces el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces el fondo. La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones requiere un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una partícula particular. Por ejemplo, se pueden seleccionar anticuerpos policlonales para obtener solamente aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunorreactivos con el antígeno seleccionado y no con otras proteínas. Esta selección puede lograrse restando anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con otras moléculas.

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar una o más biopartículas raras en un fluido de muestra; comprendiendo dicho método: a) interrogar una o más alícuotas de dicho fluido de muestra; b) en una única medición detectar la presencia o ausencia de dicha una o más biopartículas raras en cada una de dichas alícuotas, en la que al menos una de dichas alícuotas comprende múltiples biopartículas; y c) clasificar dichas alícuotas basándose en la presencia o ausencia de dichas una o más biopartículas raras. En ciertas realizaciones, las biopartículas raras son células. En una cierta realización, las biopartículas raras son células marcadas por fluorescencia.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, se detectan múltiples parámetros en una única medición. En una realización particular, los múltiples parámetros son colores fluorescentes diferentes.

En ciertas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, el fluido de muestra se estabiliza mediante la adición de anticoagulantes, compuestos que previenen la aglomeración de células en la muestra que incluye dichas biopartículas o sus combinaciones.

En algunas realizaciones, la clasificación de alícuotas es binaria, por ejemplo, se asigna a una alícuota un valor de "0" si la alícuota no contiene un artículo raro y un valor de "1" si lo contiene. En otras realizaciones, la clasificación no es binaria, por ejemplo, el valor se asigna en base al número o las partículas raras presentes en la alícuota o la identidad de las partículas raras en la muestra. En ciertas realizaciones, la clasificación se realiza mediante un ordenador y un software que representa un algoritmo de clasificación.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento comprenden además una etapa de canalización de las alícuotas basándose en su clasificación. Por ejemplo, el flujo o la recogida de las alícuotas se dirige en función del valor asignado a la alícuota. En ciertas realizaciones, esto se consigue mediante el uso de campos externos o mediante la creación de perturbaciones de flujo.

En ciertas realizaciones, el método puede comprender concentrar las biopartículas raras recogiendo y/o agrupando alícuotas con dicha clasificación similar.

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, las biopartículas raras se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas, células madre de cáncer, giardia, cryptosporium, eritrocitos infectados con malaria, linfocitos, leucocitos, células fetales y células infectadas por priones.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar una o más biopartículas raras en un fluido de muestra; comprendiendo dicho dispositivo: a) uno o más detectores para detectar la presencia o ausencia de una o más biopartículas raras en cada una de una o más alícuotas en el que al menos una de dichas una o más alícuotas comprende múltiples biopartículas; y b) un ordenador con software para clasificar dichas alícuotas basándose en la presencia o ausencia de dichas una o más biopartículas raras. En una realización, la clasificación es binaria. En otras realizaciones, en las que el dispositivo se utiliza para detectar múltiples tipos de biopartículas, la clasificación no es binaria.

En ciertas realizaciones, el dispositivo puede comprender además canales para canalizar dichas alícuotas en base a dicha clasificación. En realizaciones particulares, los canales se tratan con compuestos anticoagulantes, compuestos que se unen preferiblemente a las biopartículas raras, compuestos que previenen la aglomeración de biopartículas o sus combinaciones.

En ciertas realizaciones, el dispositivo puede comprender además electrodos para rastrear y manipular la trayectoria de dichas biopartículas. En otras realizaciones, el dispositivo puede comprender además elementos magnéticos para la separación de biopartículas con partículas magnéticas unidas. En otras realizaciones, el dispositivo puede comprender además elementos acústicos para rastrear y manipular la trayectoria de dichas biopartículas.

En ciertas realizaciones de los dispositivos y aparatos proporcionados en el presente documento, el dispositivo comprende uno o más detectores que se seleccionan de una cámara, un multiplicador de electrones, un sensor de imagen de dispositivo de carga acoplada (CCD), un tubo fotomultiplicador (PMT),

un fotodiodo de avalancha

(APD), un diodo de avalancha de fotón único (SPAD), o un sensor de imagen de semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS).

En ciertas realizaciones de los dispositivos y aparatos proporcionados en el presente documento, el dispositivo puede comprender además una o más fuentes para interrogar una o más alícuotas de dicho fluido de muestra. Por ejemplo, una fuente de radiación electromagnética. En realizaciones particulares, la una o más fuentes de interrogación se seleccionan de un láser (estado sólido, diodo bombeado, ión o tinte), un diodo emisor de luz (LED), una lámpara, una descarga de arco, un impulso magnético, o una luz natural. En otras realizaciones, no se requiere una fuente para la interrogación de la alícuota cuando la biopartícula exhibe una emisión de luz tal como quimioluminiscencia o bioluminiscencia.

III. Realizaciones

A. Métodos de detección

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el método las etapas de: (a) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota de la muestra de fluido; (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la partícula rara, y (c) dirigir el flujo o recogida de la alícuota en base al valor asignado.

En una realización, la etapa de detección de la presencia de la partícula rara comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende dicho reactivo de detección y una partícula rara; y (ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado en la etapa (i) en una alícuota de la muestra de fluido.

En ciertas realizaciones, el reactivo de detección puede comprender un anticuerpo marcado o no marcado, fragmento fab, aptámero, polímero, nanopartícula, microperla, anticuerpo fluorescente, nanopartícula magnética, molécula de polímero, molécula de tinte, aptámero, molécula lipídica, molécula de proteína, y similares.

En otra realización, la etapa de detección de la presencia de la partícula rara comprende las subetapas de: (i) interrogar la alícuota con una fuente externa de radiación electromagnética; y (ii) detectar la fluorescencia de la partícula rara.

En una realización, la partícula rara puede comprender una célula marcada fluorescentemente. En una cierta realización, la célula marcada fluorescentemente puede comprender una célula que expresa una proteína fluorescente, o una célula que se ha marcado con un reactivo de detección fluorescente. Por ejemplo, una célula que expresa transitoriamente o de manera estable una proteína fluorescente roja o verde.

En otra realización más, en la que la partícula rara presenta quimioluminiscencia intrínseca o bioluminiscencia, la etapa de detectar la presencia de una partícula rara comprende detectar bioluminiscencia o quimioluminiscencia de la partícula rara.

En ciertas realizaciones, la partícula rara puede ser una célula, proteína, complejo de proteína, ácido nucleico, complejo de nucleoproteína, carbohidrato, metabolito, catabolito, y similares. En una realización, la partícula rara es una célula. En las realizaciones particulares, la célula puede ser una célula cancerosa, una célula tumoral circulante (CTC), una célula madre cancerosa, una célula cancerosa que muestra un antígeno de superficie de cáncer, por ejemplo, uno seleccionado de los grupos que consisten en CD44, CD2, CD3, CD 10, CD 14, CD16, CD24, CD31, CD45, CD64, CD140b, o una combinación de los mismos.

Las células madre cancerosas se pueden distinguir de las células cancerosas ordinarias por perfusión de otros reactivos que se unen selectivamente a biomarcadores, que pueden incluir pero sin limitación, CD44, CD2, CD3, CD10, CD14, CD16, CD24, CD31, CD45, CD64 o CD140b.

En ciertas realizaciones, en las que la partícula rara es una célula cancerosa, las células contenidas dentro de las alícuotas identificadas como que tienen una célula rara pueden ser además diseccionadas individualmente. Por ejemplo, estas células pueden dividirse o clasificarse mediante citometría de flujo tradicional o eDAR y las células deseadas pueden diseccionarse para comprender el origen del mal funcionamiento de la maquinaria celular. El contenido dentro de cada célula puede analizarse individualmente para determinar el ADN, ARN, la secuencia de ADN, metabolito, lípido, carbohidrato, contenido de proteína, o similares.

En otras realizaciones, la célula rara puede ser una célula o un organismo parásito, por ejemplo, una especie de *Giardia* o *Cryptosporidium*, un eritrocito infectado con una especie de *Plasmodium*, un linfocito o leucocito infectado con VIH, una célula fetal en sangre materna, una célula madre, una célula infectada con priones, un linfocito T CD4+, y similares.

5

En una realización, la muestra de fluido puede comprender más de un tipo de partícula rara, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más tipos de partículas raras. Por consiguiente, en ciertas realizaciones la muestra de fluido se pone en contacto simultáneamente con una pluralidad de reactivos de detección diferenciables, teniendo cada uno una especificidad diferente en condiciones suficientes para transformar la pluralidad de reactivos de detección en una pluralidad de complejos que comprenden los reactivos de detección y una pluralidad de partículas raras. En algunas realizaciones, la pluralidad de complejos se detectan simultáneamente, por ejemplo, utilizando un aparato eDAR que comprende más de un dispositivo de interrogación y/o más de un dispositivo de detección.

10

15

Por ejemplo, en el caso de que dos partículas raras sean detectadas simultáneamente, cada partícula rara puede ponerse en contacto con un reactivo de detección diferenciable, cada uno de los cuales puede ser detectado por uno de dos dispositivos de detección. Además, cuando los reactivos de detección comprenden restos fluorescentes, se pueden usar dos dispositivos de interrogación (por ejemplo, dos láseres que producen radiación a diferentes longitudes de onda correspondientes a las longitudes de onda de excitación de los diferentes restos fluorescentes) y la respectiva radiación fluorescente puede ser detectada por dos dispositivos de detección diferentes. Por consiguiente, en una realización, los reactivos de detección son diferenciables por fluorescencia a diferentes longitudes de onda.

20

25

En otra realización más, las dos o más partículas raras pueden detectarse en serie. Por ejemplo, en una realización, el método puede comprender detectar una primera partícula rara en una primera ubicación de un aparato eDAR y detectar una segunda célula rara en una segunda ubicación de un aparato eDAR. De esta manera, la alícuota en la que residen la primera y segunda partículas puede canalizarse después de la primera etapa de detección, después de la segunda etapa de detección, o después de ambas etapas de detección.

30

En ciertas realizaciones de la invención, la detección de una característica de un conjunto de células puede ser simultánea o acumulativa en el tiempo. Por ejemplo, la detección de una característica puede emanar inmediatamente ("simultánea") de una gran alícuota que contiene un conjunto de biopartículas.

35

En ciertas realizaciones, en las que el método se realiza en un modo simultáneo, las biopartículas pueden ser transportadas por un flujo de velocidad variable. Como ejemplo, las biopartículas pueden ser transportadas por un flujo constante a medida que atraviesan el volumen de detección. Como alternativa, el flujo puede detenerse, desacelerarse o acelerarse a medida que las células atraviesan el volumen de detección. El flujo puede regularse con uno de los siguientes, ya sea aguas arriba o abajo del volumen de detección: una válvula, una burbuja, un campo eléctrico, un campo magnético, un campo óptico, una fuente neumática de presión, una partícula sólida, una membrana, una gota inmiscible, un diferencial gravitacional, o un revestimiento para alterar la tensión superficial del canal.

40

45

En algunas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la etapa de detección se realiza durante el flujo continuo de la muestra de fluido a través de un canal de flujo. En ciertas realizaciones, las alícuotas individuales no están físicamente separadas, sino que se definen por la etapa de detección óptica, es decir, una alícuota puede definirse como el conjunto de partículas presentes en el volumen de detección en el instante en que se produce la detección.

50

En ciertas realizaciones, el evento de detección se producirá con una frecuencia regular, que depende tanto del tamaño del volumen de detección como del caudal de la muestra de fluido. Por ejemplo, si el volumen de detección de un aparato particular es de 10 μ l y la muestra de fluido fluye a través del aparato a una velocidad de 100 μ l/segundo, se detectará una alícuota diferente cada 0,1 segundos o a una velocidad de 10 Hz.

55

En ciertas realizaciones, dependiendo de la geometría del aparato y del volumen del fluido a procesar, alícuotas discretas atraviesan el volumen de detección a una velocidad comprendida entre 0,1 kHz y 100 MHz. En otra realización, las alícuotas discretas atraviesan el volumen de detección a una velocidad entre aproximadamente 10 Hz y aproximadamente 10 MHz. En otras realizaciones, las alícuotas discretas pueden atravesar el volumen de detección a una frecuencia entre aproximadamente 0,1 kHz y aproximadamente 100 MHz, o entre aproximadamente 1 kHz y aproximadamente 10 MHz, o entre aproximadamente 1 kHz y aproximadamente 5 MHz, o entre aproximadamente 1 kHz y aproximadamente 1 MHz. En ciertas realizaciones, la frecuencia con la que las alícuotas atraviesan el volumen de detección puede ser de al menos aproximadamente 0,1 kHz, o al menos aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800, o 900 kHz, o al menos aproximadamente 1 MHz, o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, o 100 MHz.

60

65

En otras realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, la detección de una característica de un conjunto de células puede emanar a lo largo del tiempo ("acumulativo") a partir de un pequeño volumen de detección que está en el orden de una sola célula, pero con múltiples células que atraviesan el volumen de detección con la ayuda de flujo. El modo acumulativo de la eDAR es distinto de la superposición temporal de señales o tramas consecutivas que emanan de una única biopartícula; la superposición temporal de una única biopartícula no constituye un conjunto de biopartículas. Tanto de forma simultánea como acumulativa, se toma una decisión sólo después de que se ha detectado una característica de un conjunto de células.

En aún otras realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, las alícuotas pueden separarse físicamente antes de la detección. Esto puede lograrse, por ejemplo, dividiendo el fluido de muestra en alícuotas acuosas discretas separadas por aire o una fase fluida continua inmiscible en aceite, por ejemplo, en una gota.

En una realización, la fase inmiscible usada para separar alícuotas acuosas puede incluir una fase orgánica, un aceite, aceites naturales tales como aceite mineral y aceite de soja, aceites de silicona tales como AR-20, AS-4, aceite PDMS, aceites fluorados tales como Fluorinert y perfluorodecalina, disolventes orgánicos tales como hexadecano y acetofenona, una cera, aire o gas.

En ciertas realizaciones, una fase inmiscible puede ser continua (es decir, rodea las alícuotas discretas en su totalidad) o segmentada (es decir, ocupa solamente la separación entre alícuotas discretas pero no rodea completamente las alícuotas).

Por ejemplo, la figura 16 ilustra una fase inmiscible (1642) que rodea las partes alícuotas discretas por completo.

En una realización, las alícuotas discretas son gotitas. En otra realización, las alícuotas discretas son tapones.

En una realización, las alícuotas discretas pueden estar formadas secuencialmente en un aparato eDAR en un canal de flujo en comunicación de fluido con el canal de flujo.

En ciertas realizaciones, las alícuotas discretas pueden estar formadas externamente del aparato eDAR pero fluidas en un canal de flujo del aparato a través de una tubería, un puerto o una interconexión en comunicación de fluido con el canal de flujo.

En una realización, se pueden añadir tensioactivos a la suspensión celular o la fase inmiscible para estabilizar las alícuotas discretas. Los tensioactivos pueden incluir albúmina (albúmina sérica bovina o humana), Span 80, Pluronic, octaetilenglicol glicol monodecil éter, tetraetilenglicol monodecil éter, tensioactivos zwitteriónicos tales como N-dodecil-N, N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato (DDAPS), tensioactivos aniónicos tales como dioctilsulfosuccinato de sodio (AOT), tensioactivos catiónicos tales como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), y tensioactivos a base de silicona, PEGilados y fluorados.

En otra realización más, la muestra de fluido puede dividirse en alícuotas y separarse físicamente en canales o cámaras de flujo separados de un aparato eDAR antes de la etapa de detección. La etapa de detección posterior puede entonces llevarse a cabo en paralelo (es decir, al mismo tiempo usando múltiples dispositivos de detección o un único dispositivo de detección), o secuencialmente, por ejemplo, dirigiendo las alícuotas individuales secuencialmente a través de uno o más volúmenes de detección.

En algunas realizaciones de la invención, la muestra de fluido, por ejemplo una muestra de fluido biológico, puede estabilizarse antes de la detección de una partícula rara. En ciertas realizaciones, los fluidos pueden estabilizarse con un reactivo, incluyendo, pero sin limitación, un anticoagulante tal como citrato, heparina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriamina pentaacético (DTPA), ácido 1,2-diaminociclohexano tetraacético (DCTA), o ácido etilen bis(oxietilennitrilo)tetraacético (EGTA); un aldehído tal como derivados de metilol, hidroximetilo de aminas o amidas de formaldehído, diazolidinil urea, imidazolidinil urea, metenamina, paraformaldehído, glutaraldehído o glioxal, y similares.

En otras realizaciones de la invención, los métodos proporcionados en el presente documento pueden estar acoplados adicionalmente a un proceso secundario que tiene lugar después de la canalización de las alícuotas deseadas. Los ejemplos de procesos y/o funciones que pueden acoplarse a un método proporcionado en el presente documento incluyen, por ejemplo, reacciones selectivas para identificar contenidos celulares (por ejemplo, ADN, ARN, microARN, lípidos, metabolitos, carbohidratos o proteínas encapsuladas dentro de las células). Estas reacciones incluyen reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), PCR isotérmica, reacciones para determinar los estados epigenéticos del ADN, reacciones de hibridación de molécula única para determinar el contenido de microARN y siARN o reacciones selectivas de aptámeros (cadenas cortas de

ADN).

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento pueden acoplarse adicionalmente a un protocolo de ensayo después de una alícuota o aislamiento celular. Los ejemplos no limitativos de ensayos que se pueden acoplar a los métodos proporcionados en el presente documento incluyen métodos basados en ácidos nucleicos tales como extracción de ARN (con o sin amplificación), síntesis de ADNc (transcripción inversa), micromatrices de genes, extracción de ADN, reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) (únicas, anidadas, cuantitativas en tiempo real, o de enlazador-adaptador), o análisis de metilación de ADN; métodos de citometría tales como estudios de hibridación in situ por fluorescencia (FISH), microdissección por captura láser, citometría de flujo, clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), cultivo celular, o hibridación genómica comparativa (CGH); métodos de ensayo químico tales como electroforesis, análisis de transferencia Southern o ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); ensayos para determinar el contenido de microRNA y siRNA; ensayos para determinar el contenido de ADN/ARN; ensayos para determinar el contenido de lípidos; ensayos para determinar el contenido de carbohidratos; ensayos para determinar el contenido de metabolitos; ensayos para determinar el contenido de proteínas; y ensayos de células funcionales (por ejemplo, ensayos apoptóticos, ensayos de migración celular, ensayos de proliferación celular, ensayos de diferenciación celular, etc.), y similares.

En otra realización más, los métodos proporcionados en el presente documento pueden acoplarse adicionalmente a la citometría de flujo, por ejemplo, para dividir o aislar adicionalmente las partículas raras presentes en una alícuota seleccionada. En una realización, un canal del dispositivo eDAR utilizado para los métodos proporcionados en el presente documento puede estar en comunicación de fluido con un citómetro de flujo. En ciertas realizaciones, el acoplamiento de eDAR y citometría de flujo permite que las alícuotas seleccionadas se examinen adicionalmente o se clasifiquen en serie para enriquecer adicionalmente una población de partículas o células raras. En ciertas realizaciones de los métodos proporcionados en el presente documento, esta configuración permite la clasificación en bruto aguas arriba de partículas o células raras y sólo dirige alícuotas que contienen partículas o células raras en procesos aguas abajo, tales como citometría de flujo, que son tiempo, coste y/o mano de obra.

En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados en el presente documento pueden realizarse utilizando un aparato eDAR proporcionado en el presente documento.

1. Características ventajosas

Como se ha indicado anteriormente, debido en parte a la detección del conjunto y a la clasificación de alícuotas completas, en lugar de células o partículas individuales, las tecnologías eDAR son mucho más rápidas y menos costosas que los métodos de citometría de flujo tradicionales empleados actualmente. Varias características contribuyen a las metodologías mejoradas de eDAR.

Por ejemplo, en una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, una alícuota comprende más de una sola partícula, célula o entidad fluorescente. A este respecto, se pueden interrogar simultáneamente volúmenes discretos que contienen una pluralidad de células o partículas, en lugar de células o partículas individuales, o láminas unidimensionales de células o partículas.

En una realización relacionada de los métodos proporcionados en el presente documento, las partículas o células de un fluido no necesitan entrar en el punto o volumen de detección en serie (es decir, uno tras otro sin presencia de solapamiento). En una realización relacionada, las partículas no necesitan entrar en el punto o volumen de detección en una sola fila o lámina. Por consiguiente, en una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, múltiples biopartículas, dentro de una alícuota única, pueden pasar a través de una sección transversal o volumen en sección transversal de un canal de flujo a la vez, por ejemplo, un volumen de interrogación y/o detección.

En una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, no se necesita un flujo envolvente, tampón de guiado u otros mecanismos de enfoque hidrodinámico o geométrico para enfocar las biopartículas en una única fila para interrogación y/o detección.

En una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, se emplea un esquema de clasificación o un esquema de asignación de valor de alícuotas completas, en lugar de clasificar biopartículas individuales.

En una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, un conjunto de partículas o células se detecta simultáneamente, por ejemplo, como una alícuota única de una muestra de fluido más grande. En una realización relacionada, una decisión tomada para una alícuota afecta a todo el conjunto de partículas o células contenidas dentro de la alícuota. En aún otra realización relacionada, un conjunto de partículas o células detectadas simultáneamente dentro de una alícuota permanecerá como un conjunto de partículas o células.

2. Clasificación de alícuotas

- 5 En una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, la alícuota se asigna a un primer valor si la alícuota contiene una partícula rara o un segundo valor si la alícuota no contiene una partícula rara. En una realización particular, la clasificación (es decir, la asignación de un valor) es binaria. Por ejemplo, a cada alícuota que contiene al menos una partícula rara se le asigna un valor de 1, mientras que a cada alícuota que no contiene una partícula rara se le asigna un valor de 0.
- 10 En otra realización de los métodos proporcionados en el presente documento, a la alícuota se le asigna un valor de acuerdo con la cantidad de partículas raras presentes en la alícuota. Por ejemplo, se puede asignar a una alícuota que contiene 4 partículas raras un valor de 4. Como alternativa, se puede asignar a una alícuota que contiene 4 partículas un valor que corresponde a un intervalo particular de cantidades de partículas raras, por ejemplo, de 0 a 5 partículas, de 1 a 10 partículas, de 4 a 6 partículas, etc.
- 15 En otra realización de los métodos proporcionados en el presente documento, en los que más de un tipo de partículas raras están presentes en una única muestra de fluido, a una alícuota se le asigna un valor de acuerdo con las identidades de cualquier partícula rara en la alícuota. Por ejemplo, en el que una muestra de fluido contiene dos partículas raras, A y B, una alícuota que no contiene A ni B puede tener un valor de 0, una alícuota que contiene sólo A puede tener un valor de 1, una alícuota que contiene sólo B puede tener un valor de 2, y una alícuota que contiene tanto A como B se le puede asignar un valor de 3. Por consiguiente, en una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, en los que más de un tipo de partículas raras están presentes en una única muestra de fluido, la clasificación (es decir, la asignación de un valor) no es binaria.
- 20 En ciertas realizaciones, un valor asignado no nulo puede depender de la identidad de la partícula rara o de la concentración de la partícula rara.
- 25 En ciertas realizaciones, múltiples alícuotas que tienen el mismo valor asignado se agrupan o se canalizan juntas.
- 30 En una realización de los métodos de la presente invención, se requiere una decisión activa para clasificar o asignar un valor a una alícuota. En ciertas realizaciones, se utiliza un ordenador, controlador, chip con circuitos integrados, placa de circuitos, elemento electrónico, software y/o algoritmo para clasificar o asignar un valor a una alícuota.
- 35

3. Canalización de alícuotas y flujo de fluido

- 40 En ciertas realizaciones de la presente invención, dirigir el flujo o la recolección de una alícuota se basa en el valor asignado a la alícuota. Por ejemplo, en una realización en la que un único tipo de partícula rara está presente en una muestra de fluido, una alícuota asignada con un valor nulo o "0" puede dirigirse a un primer canal (canalizado) o salida de desechos y una alícuota asignada con el valor "1" puede dirigirse hacia un segundo canal o cámara de recogida.
- 45 En otras realizaciones de la presente invención, en las que más de un tipo de partícula rara está presente en la muestra de fluido, una alícuota puede canalizarse basándose en la composición particular de partículas raras presentes en la alícuota. En una realización, una alícuota que no contiene partículas raras puede dirigirse a un primer canal o salida de desechos, una parte alícuota que contiene un primer tipo de partícula rara puede dirigirse a un segundo canal o una primera cámara de recogida, y una alícuota que contiene un segundo tipo o la partícula rara se puede dirigir a un tercer canal o a una segunda cámara de recogida.
- 50 En ciertas realizaciones, una alícuota que contiene más de un tipo de partícula rara se puede dirigir a un canal de flujo particular o a una cámara de recogida. Como alternativa, la alícuota se puede dirigir a una cámara de mezcla o dilución y posteriormente la alícuota mezclada o diluida puede dividirse adicionalmente en subalícuotas de tal forma que las células raras se dividen en diferentes subalícuotas. Las células raras en las subalícuotas pueden ser detectadas de nuevo de tal manera que las células raras se pueden separar entre sí.
- 55 En una realización de los métodos proporcionados en el presente documento, la etapa de canalización (es decir, la dirección del flujo o recolección de las alícuotas puede realizarse mediante el uso de campos externos o creando perturbaciones de flujo.
- 60 En un aspecto de la invención, una vez que se clasifica una alícuota, pueden usarse campos externos para alterar la dirección de la alícuota. Los campos pueden incluir campo eléctrico, campo magnético, fuerzas electrocinéticas, electroforéticas, dielectroforéticas, hidrodinámicas, gravitacionales, neumáticas u ópticas. Como alternativa, pueden inducirse perturbaciones de flujo externas con una introducción de
- 65

materiales inmiscibles con suspensión de células, tales como aire, líquido orgánico inmiscible o microperlas.

En ciertas realizaciones, el flujo puede ser suministrado por, por ejemplo, métodos y dispositivos que inducen una presión de fluido hidrodinámica, que incluye, pero sin limitación, los que operan sobre la base de principios mecánicos (por ejemplo, bombas de jeringa externas, bombas de membrana neumáticas, bombas de membrana vibratoria, dispositivos de vacío, fuerzas centrífugas y acción capilar); principios eléctricos o magnéticos (por ejemplo, flujo electroosmótico, bombas electrocinéticas, bombas piezoeléctricas/ultrasónicas, tapones de ferrofluido, bombas electrodinámicas y bombas magnetohidrodinámicas); principios termodinámicos (por ejemplo, generación de burbujas de gas/expansión de volumen inducida por cambio de fase); principios de humectación superficial (por ejemplo, electrohúmedación, gradiente de tensión superficial inducido químicamente, térmicamente y radiativamente); y similares.

En otras realizaciones, el fluido puede ser suministrado o canalizado por una fuerza de accionamiento de fluido proporcionada por alimentación por gravedad, tensión superficial (como la acción capilar), fuerzas electrostáticas (flujo electrocinético), flujo centrífugo (sustrato dispuesto en un disco compacto y en rotación), fuerzas magnéticas (los iones oscilantes causan flujo), fuerzas magnetohidrodinámicas y un vacío o diferencial de presión.

En ciertas realizaciones, los dispositivos de control de flujo de fluido, tales como los enumerados con respecto a métodos y dispositivos para inducir presión de fluido hidrodinámica o fuerza de accionamiento de fluido, pueden acoplarse a un puerto de entrada o un puerto de salida de la presente materia objeto. En un ejemplo, se proporcionan puertos múltiples en una o ambas entradas y salidas y uno o más puertos están acoplados a un dispositivo de control de flujo de fluido.

B. Métodos de diagnóstico y pronóstico

En un aspecto, la presente invención proporciona un método para proporcionar a un sujeto un diagnóstico o pronóstico para una afección asociada con la presencia de una partícula rara en una muestra de fluido, por ejemplo, un fluido biológico tal como una muestra de sangre.

En una realización, el método comprende las etapas de: (a) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota del fluido biológico; (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la partícula rara, y (c) dirigir el flujo o recogida de la alícuota en base al valor asignado.

En otra realización, el método comprende las etapas de: (a) poner en contacto un fluido biológico del sujeto con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende dicho reactivo de detección y una partícula rara; (b) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado en la etapa (a) en una alícuota del fluido biológico; (c) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de un complejo formado en la etapa (a); y (d) proporcionar un diagnóstico o pronóstico al sujeto basado en el valor asignado.

En otra realización, la etapa de detección de la presencia de la partícula rara comprende las subetapas de: (i) interrogar la alícuota con una fuente externa de radiación electromagnética; y (ii) detectar la fluorescencia de la partícula rara.

Durante más de 100 años, los médicos han sabido que los cánceres se diseminan vertiendo células en la sangre. Dado que la sangre lleva estas células cancerosas de órgano a órgano, el cáncer se metastatiza. Estas células tumorales sueltas se denominan Células Tumorales Circulantes (CTC). En un aspecto, la presente invención ofrece métodos precisos para contar y aislar estas células cancerosas de la sangre periférica.

La detección exacta de CTC en sangre resulta excesivamente difícil debido al número astronómico de glóbulos rojos y blancos también presentes. Con tantos como 5 billones de glóbulos rojos y 5 millones de glóbulos blancos que coexisten para enmascarar una única CTC, el problema de detectar CTC es literalmente encontrar una aguja en un pajar.

Mediante el recuento preciso del número de células cancerosas en sangre, la presente invención ofrece una instantánea en tiempo real del proceso de propagación del cáncer. La diferenciación más notable de una prueba de sangre de CTC de las herramientas pronósticas tradicionales (por ejemplo, el estado de los ganglios linfáticos, el tamaño del tumor y las características morfológicas) es que la prueba de sangre de CTC puede usarse para proporcionar una respuesta temprana sobre si un tratamiento contra el cáncer es eficaz. Los pacientes sometidos a la quimioterapia de 6 meses pueden tener sus recuentos de CTC medidos cada 3-4 semanas; si el recuento permanece alto, el oncólogo puede considerar que el tratamiento actual es ineficaz y prescribir nuevos fármacos. Desde el punto de vista de los pacientes, tener una prueba de CTC puede (1) proporcionar un ahorro sustancial al eliminar la quimioterapia ineficaz,

que puede costar entre 3.000 \$-10.000/mes por fármaco, (2) concederles valiosas oportunidades para encontrar un tratamiento eficaz antes de que sea demasiado tarde. Estas razones por sí solas son lo suficientemente importantes como para que los oncólogos prescriban de forma rutinaria exploraciones de imágenes radiológicas caras (por ejemplo, CT o MRI). Sin embargo, en un aspecto, la presente invención proporciona una prueba de CTC rápida y económica que es más barata, más segura, más reproducible y proporciona la misma, si no más exacta, información pronóstica seis semanas antes que una exploración de imágenes radiológicas. Actualmente no hay pruebas de biomarcadores disponibles que ofrezcan ventajas similares.

Debido a una alta sensibilidad en las células cancerosas detectadas, los métodos descritos en el presente documento proporcionan el potencial de detectar células cancerosas antes de que su concentración alcance el límite de detección más bajo de tecnologías competidoras. Esto significa que los métodos proporcionados en el presente documento son capaces de producir resultados significativos antes que las tecnologías competidoras. En consecuencia, en lugar de limitar el uso de la tecnología actual al cáncer metastásico en estadio IV, los oncólogos pueden expandir su uso hacia el diagnóstico precoz (es decir, estadio III, estadio II, estadio I, metastásico o precanceroso), por ejemplo, prescribiendo periódicamente el uso de los métodos proporcionados en el presente documento para el público en general que aún no presenta síntomas de cáncer. Generalmente las personas sanas no tienen ninguna CTC en sangre; si se detecta cualquier CTC en los pacientes sin sospecha que utilizan la presente invención, entonces se pueden prescribir más pruebas (por ejemplo, CT, MRI) para localizar los tumores y confirmar el estado.

En otra realización, las células tumorales aisladas usando la presente invención pueden someterse además a análisis de subpoblación (por ejemplo, según el genotipo o fenotipo) para desarrollar un tratamiento dirigido. Como ejemplo, las células tumorales aisladas pueden incubarse con anticuerpos fluorescentes que se unen a dianas específicas de fármacos para determinar la presencia o el grado de expresión de un fármaco diana. Una vez que la expresión del fármaco diana se confirma, un oncólogo puede estar seguro de elegir entre los medicamentos específicamente desarrollados para dirigir la expresión. En un ejemplo, las células tumorales aisladas pueden incubarse con anticuerpos fluorescentes que se unen específicamente al receptor Her2 para determinar si el tumor de mama que desprende CTC es positivo a Her2. Si las células tumorales aisladas exhiben una alta expresión de Her2, el oncólogo puede prescribir Herceptina (trastuzumab), ya que este fármaco está diseñado para dirigir y bloquear la función de la sobreexpresión de la proteína HER2. Otras dianas farmacéuticas conocidas, incluyendo BCR-ABL o PDGFR (dirigido por el fármaco Gleevec), ERBB2 (dirigido por Herceptina), EGFR (dirigido por Iressa, Tarceva), RAR-alfa (dirigido por ATRA), receptor de estrógenos (dirigido por Tamoxifeno), aromatasa (dirigida por Letrozol), receptor de andrógenos (dirigido por Flutamida, Biclutamida), CD20 (dirigido por Rituximab), receptor de VEGF (dirigido por Avastina) también pueden ser seleccionados de forma similar a partir de las células tumorales aisladas antes de prescribir el régimen de quimioterapia apropiado.

En una realización específica, la partícula rara es una célula cancerosa o célula tumoral circulante (CTC). En otras realizaciones, la célula rara puede ser una célula o un organismo parásito, por ejemplo, una especie de *Giardia* o *Cryptosporidium*, un eritrocito infectado con una especie de *Plasmodium*, un linfocito o leucocito infectado con VIH, una célula fetal en sangre materna, una célula madre, una célula infectada con priones, un linfocito T CD4+, y similares.

En una realización, se proporciona un método para diagnosticar malaria, comprendiendo el método detectar un eritrocito infectado con *Plasmodium* usando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento.

En otra realización, se proporciona un método para diagnosticar una infección por VIH, comprendiendo el método detectar un linfocito o leucocito infectado con el virus VIH utilizando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento.

En otra realización más, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad asociada con un prión, comprendiendo el método detectar un prión en un fluido biológico de un ser humano u otro animal (por ejemplo, una vaca) usando un método eDAR y/o un aparato proporcionado en el presente documento. En una realización, la enfermedad asociada con un prión es la enfermedad de las vacas locas.

1. Diagnóstico del cáncer

En una realización particular, el método comprende detectar una célula tumoral circulante en una muestra de sangre de un sujeto usando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento. En ciertas realizaciones, el sujeto puede ser un paciente que ha sido diagnosticado previamente con cáncer en estadio I, estadio II, estadio III o estadio IV. En ciertas realizaciones, en las que se detecta una CTC en una muestra de sangre de un paciente previamente diagnosticado con cáncer, el paciente puede ser diagnosticado además con cáncer metastásico.

En una realización, se proporciona un método para diagnosticar cáncer metastásico en un sujeto que ha sido previamente diagnosticado con un tumor sólido, comprendiendo el método las etapas de: (a) detectar la presencia o ausencia de una CTC en una alícuota de una muestra de sangre del sujeto; (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la CTC; y (c) dirigir el flujo o recolección de la alícuota basándose en el valor asignado. En una realización, la ausencia de CTC en la muestra de sangre está correlacionada con el sujeto que no tiene cáncer metastásico. En otra realización, la presencia de al menos una CTC en la muestra de sangre está correlacionada con el sujeto que tiene cáncer metastásico. En aún otra realización, la presencia de al menos un número de referencia de CTC en la sangre está correlacionada con el sujeto que tiene cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el método puede comprender además una etapa de (d) diagnosticar al sujeto como que no tiene cáncer metastásico si no se detectan CTC en la muestra de sangre o diagnosticar al sujeto como que tiene cáncer metastásico si se detecta al menos una CTC en la sangre muestra.

En una realización relacionada, se proporciona un método para monitorizar un sujeto diagnosticado con cáncer, que comprende detectar la presencia o ausencia de una CTC en una alícuota de una muestra de sangre del sujeto usando un método eDAR proporcionado en el presente documento. En ciertas realizaciones, el paciente puede ser monitorizado para el avance del cáncer a cáncer metastásico a intervalos regulares, por ejemplo, al menos una vez al año, al menos dos veces al año, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces al año. En algunas realizaciones, el sujeto puede monitorizarse aproximadamente una vez al mes, o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces al mes. En una realización, la ausencia de CTC en la muestra de sangre está correlacionada con el sujeto que no tiene cáncer metastásico. En otra realización, la presencia de al menos una CTC en la muestra de sangre está correlacionada con el sujeto que tiene cáncer metastásico. En aún otra realización, la presencia de al menos un número de referencia de CTC en la sangre está correlacionada con el sujeto que tiene cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el método puede comprender además una etapa de (d) diagnosticar al sujeto como que no tiene cáncer metastásico si no se detectan CTC en la muestra de sangre o diagnosticar al sujeto como que tiene cáncer metastásico si se detecta al menos una CTC en la sangre muestra.

En las realizaciones en las que se detecta una CTC en una muestra de sangre, el método puede comprender además una etapa de someter una o más alícuotas identificadas como que contienen una CTC para análisis adicional para identificar una o más características de la célula o células CTC. Por ejemplo, puede ponerse en contacto una alícuota o grupo de alícuotas que contienen una CTC con uno o más reactivos de detección específicos para uno o más antígenos de superficie específicos del cáncer. Mediante la determinación de qué antígenos específicos de cáncer están presentes en la superficie de las CTC, la terapia puede diseñarse entonces para dirigir el antígeno superficial expresado. Los ejemplos no limitativos de antígenos de superficie específicos del cáncer que pueden ser ensayados incluyen, sin limitación, BCR-ABL o PDGFR (dirigido por el fármaco Gleevec), ERBB2 (dirigido por Herceptina), EFGR (dirigido por Iressa, Tarceva), RAR-alfa (dirigido por ATRA), receptor de estrógenos (dirigido por Tamoxifeno), aromatasa (dirigida por Letrozol), receptor de andrógenos (dirigido por Flutamida, Biclutamida), CD20 (dirigido por Rituximab), receptor de VEGF (dirigido por Avastina), y similares. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el método puede comprender además una etapa de asignar una terapia dirigida al sujeto basada en la detección de un antígeno de superficie específico presente en la CTC.

En ciertas realizaciones, el análisis adicional puede realizarse utilizando un método eDAR proporcionado en el presente documento, por ejemplo, poniendo en contacto las alícuotas agrupadas con una pluralidad de reactivos de detección marcados diferencialmente en condiciones adecuadas para transformar los reactivos de detección en complejos con los antígenos específicos del cáncer presentes en la superficie de las CTC y detectando los complejos usando una pluralidad de dispositivos de detección.

En otras realizaciones, el análisis adicional se puede realizar acoplando el método eDAR inicial con una citometría de flujo tradicional o un método inmunoquímico (por ejemplo, inmunotransferencia, ELISA, ensayo multiplex xMAP, etc.). En ciertas realizaciones, el dispositivo eDAR usado para detectar la CTC puede estar en comunicación de fluido con un segundo dispositivo o medios para realizar el análisis posterior.

En las realizaciones en las que un sujeto es diagnosticado con cáncer metastásico, el método puede comprender además una etapa de asignar una terapia para el cáncer metastásico al sujeto.

En otra realización particular, se proporciona un método para diagnosticar a un sujeto con cáncer, comprendiendo el método detectar un CTC en una muestra de sangre tomada del sujeto. Por ejemplo, detectar una CTC en una muestra de sangre de un sujeto que no ha sido previamente diagnosticado con cáncer. En algunas realizaciones, el sujeto puede tener un riesgo aumentado de tener o desarrollar cáncer, por ejemplo, el sujeto puede tener antecedentes familiares de cáncer, ser fumador, o haber estado expuesto a una sustancia carcinógena (es decir, amianto, benceno, cadmio, radón, radiactividad, y

similares).

Como tal, en ciertas realizaciones, se proporciona un método para monitorizar un sujeto que no ha sido previamente diagnosticado con cáncer, comprendiendo el método las etapas de: (a) detectar la presencia o ausencia de una CTC en una alícuota de una muestra de sangre del sujeto; (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la CTC; y (c) dirigir el flujo o recolección de la alícuota basándose en el valor asignado. En una realización, la ausencia de CTC en la muestra de sangre está correlacionada con el sujeto que no tiene cáncer metastásico. En otra realización, la presencia de al menos una CTC en la muestra de sangre está correlacionada con el sujeto que tiene cáncer. En aún otra realización, la presencia de al menos un número de referencia de CTC en la sangre está correlacionada con el sujeto que tiene cáncer o cáncer metastásico. En algunas realizaciones, el método puede comprender además una etapa de (d) diagnosticar al sujeto como que no tiene cáncer si no se detectan CTC en la muestra de sangre o diagnosticar al sujeto como que tiene cáncer si se detecta al menos una CTC en la sangre muestra.

En ciertas realizaciones, la etapa de detectar la presencia o ausencia de la CTC puede realizarse como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, (i) poniendo en contacto un fluido biológico del sujeto con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende dicho reactivo de detección y una partícula rara; y (ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado en la etapa (i) en una alícuota del fluido biológico, o (i) interrogar la alícuota con una fuente externa de radiación electromagnética; y (ii) detectar la fluorescencia de la partícula rara.

2. Métodos para proporcionar un pronóstico

En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para proporcionar un pronóstico para una enfermedad o afección asociada con la presencia de una partícula rara en un fluido biológico. En una realización, el método comprende las etapas de: (a) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota de una muestra biológica de un sujeto; (b) asignar un valor a la alícuota basado en la presencia o ausencia de la partícula rara; (c) dirigir el flujo o recolección de la alícuota en base al valor asignado; y (d) proporcionar un buen pronóstico si no se detectan partículas raras en la muestra o un mal pronóstico si se detecta una partícula rara en la muestra.

En otras realizaciones, a la alícuota se le asigna un valor basado en la cantidad o la identidad de la partícula rara en la alícuota. En algunas de estas realizaciones, se proporciona un pronóstico bueno o malo basado en la cantidad de las partículas raras en la muestra. Por ejemplo, en una realización, se proporciona un buen pronóstico si la cantidad de las partículas raras en la muestra es menor que un valor de referencia predeterminado y se proporciona un mal pronóstico si la cantidad de las partículas raras en la muestra es igual o mayor que el valor de referencia.

En ciertas realizaciones, un valor de referencia predeterminado puede estar asociado con una probabilidad de responder a una terapia particular o una probabilidad de supervivencia global o libre de enfermedad durante un período de tiempo, por ejemplo, al menos 6 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más años.

En ciertas realizaciones, la etapa de detectar la presencia o ausencia de la partícula rara puede realizarse como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, (i) poniendo en contacto un fluido biológico del sujeto con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende dicho reactivo de detección y una partícula rara; y (ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado en la etapa (i) en una alícuota del fluido biológico, o (i) interrogar la alícuota con una fuente externa de radiación electromagnética; y (ii) detectar la fluorescencia de la partícula rara.

En ciertas realizaciones, se puede usar un método proporcionado en el presente documento para proporcionar un pronóstico para cualquier enfermedad asociada con una partícula rara. En una realización, se proporciona un método para proporcionar un pronóstico para la malaria, comprendiendo el método determinar el número de eritrocitos infectados con *Plasmodium* en una muestra de sangre de un individuo usando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento y proporcionando un buen pronóstico si el número total de eritrocitos infectados detectados en la muestra de sangre es menor que un valor de referencia predeterminado o un mal pronóstico si el número total de eritrocitos infectados detectados en la muestra es igual o mayor que el valor de referencia.

En otra realización, se proporciona un método para proporcionar un pronóstico para una infección por VIH, comprendiendo el método determinar el número de linfocitos o leucocitos infectados con un virus VIH en una muestra de sangre de un individuo usando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento y proporcionar un buen pronóstico si el número total de células infectadas detectadas en la muestra de sangre es menor que un valor de referencia predeterminado, o un mal pronóstico si el número total de células infectadas detectadas en la muestra es igual o mayor que el valor de referencia.

En otra realización más, se proporciona un método para proporcionar un pronóstico para una enfermedad asociada con un prión, comprendiendo el método determinar el número de priones en una muestra de fluido biológico de un sujeto utilizando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento, y proporcionar un buen pronóstico si el número total de priones detectado en la muestra es menor que un valor de referencia predeterminado, o un mal pronóstico si el número total de priones detectado en la muestra es igual o mayor que el valor de referencia.

En ciertas realizaciones, un valor de referencia predeterminado puede estar asociado con una probabilidad de responder a una terapia particular o una probabilidad de supervivencia global o libre de enfermedad durante un período de tiempo, por ejemplo, al menos 6 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más años.

En una realización específica, la presente invención proporciona un método para proporcionar un pronóstico para un sujeto diagnosticado con un tumor sólido. En una realización, el método comprende las etapas de (a) detectar la presencia o ausencia de una CTC en una alícuota de una muestra de sangre del sujeto; (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la CTC; (c) dirigir el flujo o recolección de la alícuota en base al valor asignado; y (d) proporcionar un buen pronóstico si no se detectan CTC o un mal pronóstico si se detecta una CTC.

En otra realización, se proporciona un método para proporcionar un pronóstico para un sujeto diagnosticado con cáncer metastásico, comprendiendo el método las etapas de (a) detectar la presencia o ausencia de una CTC en una alícuota de una muestra de sangre del sujeto; (b) asignar un valor a la alícuota basado en el número de CTC detectadas en la alícuota; (c) dirigir el flujo o recolección de la alícuota en base al valor asignado; y (d) proporcionar un buen pronóstico si el número total de CTC detectado en la muestra de sangre es menor que un valor de referencia predeterminado, o un mal pronóstico si el número total de CTC detectado en la muestra es igual o mayor que el valor de referencia.

En ciertas realizaciones, un valor de referencia predeterminado puede estar asociado con una probabilidad de responder a una terapia particular o una probabilidad de supervivencia global o libre de enfermedad durante un período de tiempo, por ejemplo, al menos 6 meses, o al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o más años.

3. Monitorización del avance de la enfermedad o respuesta a la terapia

En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para monitorizar el avance de una enfermedad o la respuesta a una terapia, comprendiendo el método detectar una partícula rara en una muestra de fluido usando un método y/o aparato eDAR proporcionado en el presente documento.

En una realización, el método comprende las etapas de: (a) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una pluralidad de alícuotas de una primera muestra biológica tomada de un sujeto en una primera vez; (b) asignar un valor a las alícuotas basándose en la presencia, ausencia, cantidad o identidad de la partícula rara; (c) determinar el valor total de todas las alícuotas de la primera muestra; (d) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una pluralidad de alícuotas de una segunda muestra biológica tomada del sujeto en una segunda vez; (e) asignar un valor a las alícuotas basándose en la presencia, ausencia, cantidad o identidad de la partícula rara; (f) determinar el valor total de todas las alícuotas de la segunda muestra; y (g) comparar el valor total asignado a la primera muestra con el valor total asignado a la segunda muestra, en el que un valor aumentado asignado a la segunda muestra en comparación con la primera muestra está correlacionado con un avance de la enfermedad y/o una mala respuesta a la terapia y/o un valor disminuido asignado a la segunda muestra en comparación con la primera muestra se correlaciona con una regresión de la enfermedad y/o una buena respuesta a la terapia.

En ciertas realizaciones, las alícuotas pueden dirigirse además a un canal o cámara particular (canalizado) en base al valor asignado para la recogida, enriquecimiento adicional o análisis posterior.

En ciertas realizaciones, pueden emplearse métodos de monitorización del avance de la enfermedad o de la respuesta a la terapia de forma regular después del diagnóstico de la enfermedad o del inicio del régimen de tratamiento. Por ejemplo, se pueden recoger muestras de un sujeto al menos una vez al año, al menos dos veces al año, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, o más veces al año. En algunas realizaciones, el sujeto puede monitorizarse aproximadamente una vez al mes, o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces al mes.

En ciertas realizaciones, en las que se encuentra un avance de la enfermedad o mala respuesta a una terapia, el método puede comprender además una etapa de asignar una terapia, aumentar un régimen de dosificación, cambiar un régimen terapéutico y similares.

En ciertas realizaciones, la enfermedad o afección asociada con una partícula rara puede ser cáncer, malaria, VIH/sida, una enfermedad relacionada con priones, o similares.

C. Métodos de monitorización de la calidad del agua

5

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para monitorizar la calidad del agua detectando uno o más contaminantes de partículas raras en una muestra de agua usando un método o aparato eDAR proporcionado en el presente documento.

10

En una realización, el método comprende las etapas de (a) detectar la presencia o ausencia de un contaminante de agua en una alícuota de una muestra tomada de una fuente de agua; (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia, ausencia, cantidad o identidad del contaminante del agua en la alícuota; y (c) dirigir el flujo o recolección de la alícuota en base al valor asignado, por lo que la calidad de la fuente de agua se determina en base al valor total asignado a todas las alícuotas detectadas en el método.

15

En ciertas realizaciones, la fuente de agua puede ser un lago, una piscina, un río, un arroyo, u otro cuerpo natural de agua. En algunas de estas realizaciones, el agua puede ensayarse para determinar o predecir el impacto que un objeto o actividad hecha por el hombre tiene o tendrá en la masa de agua o para evaluar la viabilidad o seguridad de usar la masa de agua para suministrar agua potable a una población.

20

En otras realizaciones, la fuente de agua puede ser una piscina o estanque en una planta de tratamiento de agua, un depósito, una torre de agua u otra masa de agua recogida con el fin de suministrar agua potable a una población. En algunas de estas realizaciones, el agua puede ensayarse para evaluar la viabilidad o seguridad de usar la masa de agua para suministrar agua potable a una población.

25

En ciertas realizaciones, se puede usar un método proporcionado en el presente documento para monitorizar regularmente la calidad de una fuente de agua utilizada para suministrar agua potable a una población, por ejemplo, en una planta de tratamiento de agua o en una torre o depósito de agua. En una realización de este tipo, la fuente de agua puede monitorizarse al menos una vez al año, al menos dos veces al año, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces al año. En algunas realizaciones, el sujeto puede monitorizarse aproximadamente una vez al mes, o al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 o más veces al mes. En otras realizaciones, el agua se puede ensayar al menos una vez a la semana, o al menos 2, 3, 4, 5, 6, o más veces a la semana, o al menos diariamente o al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces al día.

30

35

En otra realización, se puede usar un método proporcionado en el presente documento para determinar la viabilidad o seguridad de usar un cuerpo de agua para suministrar agua potable a una población después de un desastre natural (por ejemplo, después de un huracán, tsunami o terremoto), accidente o acto de terrorismo.

40

Los métodos de ensayo o monitorización de la seguridad o calidad del agua pueden comprender la detección de una partícula rara que es un contaminante del agua, por ejemplo, un parásito tal como una especie de *Giardia*, *Cryptosporidium* u otro contaminante de agua orgánico o inorgánico que cuando está presente en bajas cantidades supone un riesgo para la salud pública.

45

D. Aparatos

En un aspecto, la presente invención proporciona un dispositivo para detectar una partícula rara en un fluido biológico.

50

En una realización, el dispositivo comprende: (a) al menos un primer canal de entrada; (b) al menos dos canales de salida; (c) al menos un detector capaz de detectar una o más partículas raras en una alícuota del fluido biológico; (d) un mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota; y (e) un dispositivo de clasificación capaz de asignar un valor a la alícuota basado en la presencia, ausencia, identidad, composición o cantidad de las partículas raras en la alícuota, en el que el ordenador está en comunicación con el detector y el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota.

55

En algunas realizaciones, el aparato comprende además una fuente para interrogar la alícuota. En otras realizaciones, en las que la partícula o célula rara presenta intrínsecamente quimioluminiscencia o bioluminiscencia, el aparato puede no requerir una fuente para interrogar la alícuota.

60

En ciertas realizaciones, el aparato proporcionado en el presente documento puede comprender un canal de flujo encerrado por paredes y/o microfabricado sobre un sustrato, con características de diseño para minimizar el daño inadvertido a células raras. Reducir el daño inadvertido de las células raras reduce la tasa de falsos negativos, lo que podría conducir a un diagnóstico erróneo del paciente o el pronóstico. El canal de flujo puede comprender además canales con aperturas diseñadas hidrodinámicamente para

65

excluir células biológicas con estrés o daño mínimos como se describe en las Solicitudes de Patente de Estados Unidos n.º 2007/0037172 y 2008/0248499. Dichos canales, a los que se hace referencia en las solicitudes de patente mencionadas anteriormente como canales con aperturas unidimensionales ("1-D"), reducen la presión hidrodinámica experimentada por las células durante el proceso de exclusión celular y por lo tanto, reducen la probabilidad de lisis celular. Los canales con aperturas 1-D pueden estar dispuestos estratégicamente en una matriz de acuerdo con la configuración de "filtración efusiva" como se describe en la Patente de Estados Unidos n.º 2008/0318324 para redirigir, dividir, amortiguar o dispersar adicionalmente el flujo, reduciendo consecuentemente la fuerza del impacto experimentado por las células en el momento de la exclusión. Las paredes que encierran el canal de flujo se pueden fabricar usando un proceso de curado UV de acuerdo con los procedimientos descritos en la PCTPCT/US2009/02426, a partir de un material de sustrato biocompatible que es un polímero de calidad de dispositivo médico, de manera que el aparato eDAR cumpla con las regulaciones que rigen la fabricación de dispositivos médicos.

1. Mecanismos para dirigir el flujo de una alícuota

En ciertas realizaciones, el mecanismo para dirigir el flujo dirige el flujo de la alícuota a un primer canal de salida si la alícuota contiene una partícula rara o un segundo canal de salida si la alícuota no contiene una partícula rara.

En otra realización, el mecanismo para dirigir el flujo dirige el flujo de una alícuota que contiene una partícula rara en uno de una pluralidad de canales de salida dependiendo de la identidad, composición o cantidad de la partícula rara.

En ciertas realizaciones, el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota comprende un electrodo, un elemento magnético, un elemento acústico, un elemento electroaccionado, un campo eléctrico o un campo magnético.

Todavía en otras realizaciones, el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota comprende una o más válvulas o pistones electroaccionados, en el que las válvulas o pistones controlan el flujo de un líquido en al menos un primer canal de flujo direccional que cruza con el primer canal de entrada y los dos canales de salida en una primera unión.

En una realización, los pistones solenoides son subcomponentes de electroválvulas electroaccionadas. En otra realización, los pistones solenoides están incrustados en el dispositivo por moldeo. En otra realización más, los pistones solenoides incrustados pueden reemplazarse por válvulas de solenoide en comunicación de fluido a través de tuberías.

En una realización particular, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender uno o más electrodos para rastrear y/o manipular la trayectoria o flujo de una partícula, alícuota o muestra de fluido. En ciertas realizaciones, el electrodo puede mejorar la separación de una alícuota basándose en fenómenos tales como dielectroforesis o electrohúmedación.

En ciertas realizaciones, los aparatos de la presente invención pueden comprender uno o más elementos acústicos para rastrear y/o manipular la trayectoria o flujo de una partícula, alícuota o muestra de fluido. En ciertas realizaciones, se pueden usar elementos acústicos para manipular la trayectoria de partículas o células seleccionadas con energía acústica (por ejemplo, acustoforesis, ondas ultrasónicas o megasónicas.) para mejorar la separación celular basándose en la respuesta de las células a las ondas de presión de compresión.

En otra realización, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender además un elemento magnético para la separación de una partícula o célula rara unida a o unida por una partícula magnética. En ciertas realizaciones, el elemento magnético puede mejorar la separación de una alícuota, partícula o célula en base a la susceptibilidad magnética de las células o de las partículas micromagnéticas o nanomagnéticas unidas a una partícula o célula.

En ciertas realizaciones, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender el uso de cambios de presión de fluido, cambios de caudal o cambios de flujo electroosmóticos para manipular la trayectoria de partículas o células seleccionadas.

2. Dispositivos de detección

En ciertas realizaciones, el detector se selecciona del grupo que consiste en una cámara, un multiplicador de electrones, un sensor de imagen de dispositivo de carga acoplada (CCD), un tubo fotomultiplicador (PMT), un fotodiodo de avalancha (APD), un diodo de avalancha de fotón único (SPAD), y un sensor de imagen complementario de semiconductor de óxido metálico (CMOS).

En ciertas realizaciones, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender un detector fotoeléctrico, acústico o magnético para rastrear el movimiento de células seleccionadas o para enumerar partículas seleccionadas o células presentes en una alícuota.

- 5 En algunas realizaciones, un aparato o método proporcionado en el presente documento puede incorporar imágenes de microscopía por fluorescencia (mono o multicolor) en diversas configuraciones, que incluyen, pero sin limitación, campo luminoso, epi, confocal, DIC (contraste de interferencia diferencial), campo oscuro, Hoffman o contraste de fase.
- 10 En algunas realizaciones, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender una pluralidad de dispositivos de detección, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dispositivos de detección. Pueden ser necesarios múltiples dispositivos de detección para realizar un método de la presente invención, por ejemplo, en los que más de una partícula o célula rara está presente en una muestra de fluido, se está usando más de un marcador de células para diferenciar diferentes tipos de células, o reactivos de detección múltiples que se detectan simultáneamente.
- 15

3. Dispositivos de interrogación

- 20 En ciertas realizaciones, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender además una fuente para interrogar o excitar un resto detectable presente en una alícuota. En ciertas realizaciones, la fuente de interrogación se selecciona de, por ejemplo, un láser (estado sólido, diodo bombeado, ión o tinte), un diodo emisor de luz (LED), una lámpara, una descarga de arco, un pulso magnético, o una fuente de luz natural.
- 25 En algunas realizaciones, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender una pluralidad de dispositivos de interrogación, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dispositivos de detección. Pueden ser necesarios múltiples dispositivos de interrogación para realizar un método de la presente invención, por ejemplo, en los que más de una partícula o célula rara está presente en una muestra de fluido, se está usando más de un marcador de células para diferenciar diferentes tipos de células, o reactivos de detección múltiples que se detectan simultáneamente.
- 30

4. Dispositivos de clasificación

- 35 En ciertas realizaciones, se puede seleccionar un dispositivo de clasificación de un ordenador, un controlador, un chip con circuitos integrados, una placa de circuito, un elemento electrónico, un software, un algoritmo o una combinación de los mismos.

5. Canales y cámaras de flujo

- 40 En ciertas realizaciones, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender una pluralidad de canales de flujo, que incluyen uno o más canales de flujo de entrada (es decir, canales que traen una alícuota a un volumen de detección) y uno o más canales de salida (es decir, canales que alejan una alícuota de un volumen de detección). En algunas realizaciones, un aparato como se proporciona en el presente documento puede comprender una combinación de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5,
- 45 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más canales de entrada y al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, o más canales de salida.

- 50 En ciertas realizaciones, un aparato puede comprender canales de flujo múltiples que se conectan al canal principal para inyectar fluido adicional para alterar la velocidad local.

- En una realización, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender un canal de flujo o cámara cerrada por paredes fabricadas a partir de materiales que incluyen, pero sin limitación,
- 55 materiales poliméricos (polidimetilsiloxano (PDMS), poliuretano-metacrilato (PUMA), polimetilmetacrilato (PMMA), polietileno, poliéster (PET), politetrafluoroetileno (PTFE), policarbonato, parileno, cloruro de polivinilo, fluoroetilpropileno, lexano, poliestireno, copolímeros de olefinas cíclicas, poliuretano, poliester carbonato, polipropileno, polibutileno, poliacrilato, policaprolactona, policetona, poliftalamida, acetato de celulosa, poliacrilonitrilo, polisulfona, polímeros epoxi, termoplásticos, fluoropolímero, y fluoruro de polivinilideno, poliamida, poliimida), materiales inorgánicos (vidrio, cuarzo, silicio, GaAs, nitrato de silicio), sílice fundida, cerámica, vidrio (orgánico), metales y/u otros materiales y combinaciones de los mismos.
- 60

- En ciertas realizaciones, pueden fabricarse materiales de pared de membranas porosas, fibras tejidas o no tejidas (tales como tela o malla) de lana, metal (por ejemplo, acero inoxidable o Monel), vidrio, papel o sintéticas (por ejemplo, Nylon, polipropileno, policarbonato, parileno y diversos poliésteres), acero inoxidable sinterizado y otros metales, y materiales inorgánicos porosos tales como alúmina, sílice o carbono.
- 65

En ciertas realizaciones, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender un canal o cámara de flujo que se ha pretratado con una molécula química o biológica. Por ejemplo, un canal o cámara puede tratarse con un compuesto anticoagulante para prevenir o reducir la asociación de una partícula en la muestra de fluido, un compuesto que se une preferiblemente a una partícula en la muestra de fluido, por ejemplo, una partícula o célula rara, o un compuesto que evita o reduce la aglomeración o agregación de una partícula en la muestra de fluido.

En una realización, las superficies de canal o cámara pueden tratarse con compuestos anticoagulantes, compuestos que se unen preferiblemente a células tumorales circulantes, o compuestos que impiden el pegado de células.

En ciertas realizaciones, una superficie de canal o cámara puede ser modificada químicamente para mejorar la humectación o para ayudar en la adsorción de células, partículas o moléculas seleccionadas. Los productos químicos modificadores de superficie pueden incluir, pero sin limitación, silanos tales como trimetilclorosilano (TMCS), hexametildisilazano (HMDS), (tridecafluoro-1,1,2,2-tetrahidrooctil)triclorsilano, clorodimetiloctilsilano, octadeciltriclorsilano (OTS) o γ -metiacriloxipropiltrimetoxisilano; polímeros tales como ácido acrílico, acrilamida, dimetilacrilamida (DMA), acrilato de 2-hidroxietilo, alcohol polivinílico (PVA), poli(vinilpirrolidona) (PVP), poli(etilenimina) (PEI), polietilenglicol (PEG), epoxi poli(dimetilacrilamida (EPDMA), o acrilato de PEG-monometoxilo; tensioactivos tales como tensioactivos Pluronic, tensioactivos a base de poli(etilenglicol) (PEG), dodecilsulfato de sodio (SDS), cloruro de dodeciltrimetilamonio (DTAC), bromuro de cetiltriethylamonio (CTAB), o polibreno (PB); derivados de celulosa tales como hidroxipropilcelulosa (HPC), o hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), aminas tales como etilamina, dietilamina, trietilamina, o trietanolamina, compuestos que contienen flúor tales como los que contienen politetrafluoroetileno (PTFE) o Teflon.

6. Medios para la reducción de fondo

En cierta realización, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender además un medio para reducir la señal de fondo excesiva y/o mejorar la relación señal-ruido. Mediante la reducción de la señal de fondo excesiva y el aumento de la relación señal-ruido, la sensibilidad de la detección es mejorada ya que las señales débiles incluso de una alícuota altamente diluida pueden detectarse con precisión. En otras palabras, cuanto mejor sea la relación señal-ruido, más explorada puede ser una alícuota. Como resultado directo, el rendimiento fluido se aumenta correspondientemente, ya que se necesita escanear menos alícuotas (pero más grandes).

En una realización, los medios para reducir la señal de fondo comprenden una máscara. Una máscara puede consistir en cualquier número de aperturas de cualquier forma o tamaño, colocadas en cualquier orientación con o sin ningún espaciado periódico. Por ejemplo, la figura 3 ilustra una máscara (301) que contiene una serie de aperturas (311), colocadas entre el volumen de detección y un detector para permitir selectivamente a través de una característica detectable.

En ciertas realizaciones, una máscara puede comprender un elemento óptico que atraviesa selectivamente ciertas longitudes de onda de luz, por ejemplo, un filtro de paso bajo, de paso alto o de paso de banda, o un modulador acústico-óptico, un modulador de luz espacial, un interruptor de luz, un holograma fabricado, una apertura física o un escáner galvo.

En otras realizaciones, una máscara puede consistir en elementos magnéticos que evitan selectivamente el paso de un campo magnético.

En algunas realizaciones, pueden usarse otros dispositivos que logren ganancias similares en la relación señal-ruido en lugar de o junto con una máscara. Por ejemplo, en ciertas realizaciones se puede usar un dispositivo seleccionado de un amplificador de bloqueo, un detector de exploración, un interrogador o detector modulado o cualquier aparato que modula la frecuencia o la intensidad para aumentar la relación señal-ruido.

En aún otras realizaciones, los detectores con funcionalidad de modulación espacial de una máscara directamente incorporada dentro pueden usarse conjuntamente con los aparatos proporcionados en el presente documento. En ciertas realizaciones, no está presente una máscara separada. En otras realizaciones, también está presente una máscara separada. Los ejemplos no limitativos de detectores con funcionalidad de máscara incorporada incluyen matrices de fotodiodos o cámaras con pixelación espacial de tal forma que se pueden eliminar o conservar señales de fotodiodos individuales o píxeles seleccionados de cámaras.

7. Elementos adicionales

En ciertas realizaciones, los aparatos proporcionados en el presente documento pueden comprender

además elementos adicionales útiles para realizar ensayos, procesos o ensayos de una manera que se acopla a los métodos eDAR proporcionados en el presente documento.

En una realización, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender además uno o más elementos de calentamiento resistivos para realizar ensayos celulares en chip tales como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR).

En aún otras realizaciones, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender además uno o más electrodos, por ejemplo, para realizar un ensayo químico en chip, tal como electroforesis o electrocromatografía.

En otra realización, un aparato proporcionado en el presente documento puede comprender además un elemento de filtro. En una realización particular, el elemento de filtro puede estar en forma de micropostes, microimpactadores, microtamices, canales con aperturas más pequeñas que las biopartículas, canales con aperturas tales que se impide que una biopartícula entre en una apertura pero se permite que el fluido continúe fluyendo alrededor de la biopartículas a través de la apertura ("canales 1-D"), microperlas, membranas porosas, protuberancias de las paredes, revestimiento adhesivo, fibras tejidas o no tejidas (tales como tela o malla) de lana, metal (por ejemplo, acero inoxidable o Monel), vidrio, papel o sintéticas (por ejemplo, nylon, polipropileno, policarbonato, parileno y poliéster), acero inoxidable sinterizado u otros metales, o materiales inorgánicos porosos tales como alúmina, sílice o carbono.

Por ejemplo, la figura 16 ilustra un elemento de filtro (1622), que puede estar dispuesto en un canal, tal como un canal de salida (1621), para permitir selectivamente el paso de la porción de fluido mientras se conservan las biopartículas deseadas.

En otra realización más, un aparato proporcionado en el presente documento puede acoplarse a un citómetro de flujo convencional.

Por ejemplo, la figura 16 ilustra un canal de salida (1621) que puede estar en comunicación de fluido con un citómetro de flujo convencional (con o sin elemento de filtro 1622) de manera que la alícuota discreta 1661 que contiene la célula rara 1602 se examine o clasifique adicionalmente en serie (celda por celda).

IV. Ejemplos

A. Ejemplo 1

Un ejemplo de un aparato eDAR con un único puerto de entrada y salida para la detección o cuantificación de partículas raras en un fluido.

La figura 4 muestra un ejemplo de aparato eDAR que consiste en un dispositivo (411) para dividir en alícuotas una suspensión celular, un dispositivo de interrogación (421 y 422), un dispositivo de detección o formación de imágenes (431, 432 y 433), y un dispositivo de clasificación (ordenador no mostrado). En este ejemplo particular, un dispositivo (411) para dividir en alícuotas una suspensión de células puede consistir en un canal de fluido (414) contenido dentro de paredes y puertos de fluido (412 y 413). Un láser sirve como un dispositivo de interrogación. Un microscopio invertido con fotodiodos, fotomultiplicadores o cámaras se utiliza como un dispositivo de detección. Una máscara (451) se coloca en una trayectoria entre el canal (414) y los dispositivos de detección (431, 432 y 433). Un ordenador acepta la señal del dispositivo de detección y a través de un algoritmo clasifica la alícuota. El ordenador entonces dirige la alícuota al canal apropiado en base al valor de la clasificación (es decir, la presencia, ausencia, cantidad, identidad o composición de partículas raras en la muestra de fluido). Aunque la figura 4 ilustra tres dispositivos de detección (431, 432 y 433) y dos dispositivos de interrogación (421 y 422), en la práctica la eDAR puede consistir solamente en un dispositivo de detección y un dispositivo de interrogación, o multitud de dispositivos de detección y dispositivos de interrogación.

En un uso del aparato ilustrado en la figura 4, los dispositivos de interrogación (421 y 422) consistían en un láser bombeado con diodo de estado sólido de 488 nm y un láser HeNe de 633 nm que se dirigen a un microscopio invertido. Los dos rayos láser se conformaron usando una óptica cilíndrica para formar un haz elíptico colimado con una relación de aspecto de 10 a 1 antes de entrar en el objetivo del microscopio. Usando una combinación de media placa de onda y un divisor de haz polarizante, la intensidad de cada haz puede ajustarse, mientras que los espejos dirigen la luz de forma independiente para crear una región de excitación espacialmente colocalizada. La fluorescencia de las biopartículas se dividió en tres bandas de longitud de onda por dos espejos dicróicos antes de pasar a través de los filtros de paso de banda y se centró de nuevo en los tres diodos de avalancha de fotón único (SPAD, 431, 432 y 433). Un SPAD recogió la fluorescencia en el intervalo de longitud de onda de 560-610 nm, un segundo SPAD recogió la fluorescencia en el intervalo de 645-700 nm, y un tercer SPAD la recogió en el intervalo de 500-540 nm. Los resultados de los SPAD se dirigieron a un ordenador con una tarjeta de contador/temporizador y se analizaron con varios algoritmos.

B. Ejemplo 2

Aparato eDAR con dos puertos de salida para la detección o cuantificación de partículas raras en un fluido.

La figura 5 ilustra un aparato eDAR que consiste en un dispositivo para dividir en alícuotas una suspensión celular (510), un dispositivo de interrogación (521), un dispositivo de detección o formación de imágenes (531), un dispositivo de clasificación (ordenador no mostrado), y un aparato para dividir en alícuotas directamente de acuerdo con la clasificación asignada. Este aparato también incluye un único puerto de entrada (511), dos puertos de salida (512 y 513) y tres canales de fluido (514) unidos en un único punto para dividir en alícuotas el fluido. Un láser sirve como el dispositivo de interrogación (521) y un microscopio invertido con fotodiodos, fotomultiplicadores o cámaras sirve como dispositivo de detección (531). Una máscara (551) se coloca entre los canales (514) y el dispositivo de detección (531). Un ordenador acepta la señal del dispositivo de detección y clasifica la alícuota a través de un algoritmo. El dispositivo utiliza entonces un medio eléctrico, magnético, hidrodinámico o neumático para dirigir la alícuota hacia la salida 512 o la salida 513 de acuerdo con la clasificación asignada.

Además del aparato eDAR descrito anteriormente, que tiene un único dispositivo de interrogación y un solo dispositivo de detección, se pueden usar múltiples dispositivos de interrogación y detección junto con los aparatos eDAR descritos en el presente documento. Por ejemplo, la figura 6 ilustra un aparato eDAR con un dispositivo de interrogación (640) y tres dispositivos de detección (650, 651 y 652).

C. Ejemplo 3

Aparato eDAR con múltiples puertos de entrada y/o salida para la detección o cuantificación de partículas raras en un fluido.

En diversos aspectos de la invención, un aparato eDAR puede consistir en múltiples puertos de entrada y/o salida. Por ejemplo, la figura 7 ilustra un dispositivo (710) para dividir en alícuotas una suspensión con cinco puertos (711, 712, 713, 714 y 715) y cinco canales de fluido 716 unidos en un único punto. Se pueden usar uno o más puertos como entrada de fluido; se pueden usar uno o más puertos como salida de fluido. Por ejemplo, el aparato puede utilizarse de tal manera que se usen dos puertos como puertos de entrada y se utilicen tres orificios como puertos de salida, o se puede utilizar de manera que un puerto sea un puerto de entrada y cuatro puertos de salida, etc. En teoría, el dispositivo (710) puede contener cualquier número de entradas y salidas de fluido y cualquier número de canales de fluido. Estos canales de fluido pueden estar unidos en más de un punto y el punto de unión no necesita estar circunscrito por las entradas o salidas de fluido.

D. Ejemplo 4

Detección de células tumorales circulantes (CTC) en la sangre de pacientes con cáncer de mama mediante el uso de eDAR.

La sangre de reciente venopunción de pacientes con cáncer de mama metastásico en estadio IV se extrajo de una punción única en tres tubos separados. La primera porción de sangre (primer tubo) se descartó para evitar la posible contaminación de las células epiteliales de la punción de la piel. Se recogió una segunda porción en un tubo CellSave de Veridex que contenía reactivos estabilizantes para la detección de células tumorales circulantes utilizando un sistema CellSearch de Veridex. Se recogió una tercera porción en un tubo de recogida que contenía anticoagulante de EDTA para análisis separado usando eDAR.

La tercera porción se incubó con enzimas, fijadores, reactivos de permeabilidad, y anticuerpos fluorescentes dirigidos a la pan-citoqueratina, CD45 y la molécula de adhesión celular epitelial (EpCAM). Una identificación positiva de células tumorales circulantes se define como una célula que expresa pan-citoqueratina y EpCAM, pero no CD45. CD45 es comúnmente conocido como antígeno común de leucocitos y es indicativo de un glóbulo blanco. Un objeto ligado con los tres anticuerpos se considera falso positivo, frecuentemente como resultado de la agregación de proteínas.

En resumen, las muestras de sangre marcadas con anticuerpos de 5 a 10 ml fluyeron a través de un aparato eDAR como se describe en el Ejemplo 1 a un caudal de entre aproximadamente 10-500 $\mu\text{l}/\text{min}$, usando una fuente de aire comprimido que suministra 7,6 psi para conducir el flujo. El aparato eDAR funcionaba en el modo de flujo continuo (simultáneo). Para estos experimentos, se utilizaron microcanales de 200 μm de ancho por 50 μm de altura. Para la interrogación de los complejos de anticuerpos marcados, se proporcionaron haces de excitación de línea confocal a tanto 488 nm como 633 nm, que iluminaron una lámina de luz que era de aproximadamente 5-10 μm de espesor. Como tal, el volumen de detección de línea confocal tenía dimensiones de aproximadamente 200 μm (ancho) x 50 μm (altura) x 10

µm (espesor), proporcionando un volumen de detección de aproximadamente 0,1 nl. Tres dispositivos de detección de SPAD funcionaban a una frecuencia de muestreo de 10.000 Hz, configurados para detectar señales de fluorescencia que emanaban de las células a 450-610 nm, 645-700 nm y 500-540 nm. A esta velocidad, cada alícuota fue del orden de 1 nl a 50 ml, estimada para contener 5-250 glóbulos blancos y 5.000-25.000 glóbulos rojos. Para una muestra de 5-10 ml, se tarda entre 10-20 min en procesar la muestra a un caudal de 500 µl/min. Una muestra de 5 ml procesada de esta manera se dividirá en 10.000 alícuotas con un volumen de 50 nl cada una.

Como tal, si se utilizó un aparato eDAR que tenía dos canales de salida, una muestra de 5 ml que contenía 200 CTC puede reducirse a un volumen de 10 µl en sólo 10 minutos, sin el uso de un filtro. Si el aparato eDAR estuviera además en contacto líquido con un citómetro de flujo, las 200 células CTC presentes en la muestra de 5 ml podrían contarse y/o aislarse individualmente en sólo el 2 % del tiempo normal mediante la implementación de una etapa eDAR antes de la citometría de flujo.

La figura 8 muestra los recuentos de CTC de 27 muestras de sangre de pacientes con cáncer de mama en estadio IV (de múltiples pacientes extraídas en fechas diferentes) utilizando el sistema CellSearch de Veridex (panel inferior) y eDAR (panel superior). Como puede observarse fácilmente, la mayoría de las muestras de pacientes registraron recuentos de CTC nulos utilizando el sistema CellSearch. En contraste, se encontró que más del 50 % de las extracciones de las mismas pacientes analizadas por eDAR contenían recuentos de 200-400 CTC. Esto demuestra ampliamente cien veces más sensibilidad con el uso de eDAR, en comparación con el uso del sistema CellSearch comercial de Veridex. La mayor sensibilidad de eDAR es atribuible a la discriminación exacta entre CTC y valor de fondo por clasificación de alícuotas y el uso de una máscara.

Como se muestra también en la figura 8, el 100 % de las muestras de pacientes analizadas por eDAR indicaron la presencia de CTC, mientras que únicamente el 40 % de las muestras de pacientes analizadas por el sistema CellSearch de Veridex indicaron cualquier presencia de CTC. Esto demostró una tasa significativamente menor de falsos negativos proporcionados por eDAR. Una alta tasa de falsos negativos en una prueba de CTC puede conducir a un pronóstico inexacto de metástasis y dar a los pacientes una falsa sensación de seguridad de que el régimen de tratamiento existente es suficiente.

En la figura 9 se muestran imágenes ejemplares de una CTC detectada mediante este método eDAR. En resumen, esta figura muestra las imágenes ópticas de células cancerosas atrapadas de sangre de paciente usando eDAR (las flechas marcan CTC) bajo diversas iluminaciones. La figura 9A es una imagen de campo claro de una CTC en medio de glóbulos rojos. La figura 9B es una imagen de fluorescencia que indica la presencia de pan-citoqueratina. La figura 9C es una imagen de fluorescencia que indica la ausencia de CD45, descartando así la posibilidad de falsa identificación de un glóbulo blanco como una CTC.

E. Ejemplo 5

Detección de células madre de cáncer entre una población de células cancerosas.

Las células cancerosas segregadas por eDAR pueden analizarse adicionalmente para distinguir las subpoblaciones dentro del fluido biológico. Al perfundir con anticuerpos fluorescentes adicionales dirigidos a proteínas específicas, algunas células cancerosas pueden distinguirse de otras. Por ejemplo, las células cancerosas que expresan proteínas CD44, pero no CD24, han sido recientemente denominadas células madre de cáncer por su asociación con alto potencial metastásico. Otras proteínas pueden estar asociadas con diversos rasgos de células.

Por ejemplo, la figura 10 demuestra la identificación de células madre de cáncer de mama (marcadas con puntas de flecha). En pocas palabras, las células de cáncer de mama (MCF-7) se marcaron con Alexa 488-anti-CD44 (positivo) y Alexa 647-anti-CD24 (negativo). La figura 10A es una imagen de fluorescencia (500-540 nm) para detectar Alexa 488-anti-CD44 (verde); la figura 10B es una imagen de fluorescencia (645-700 nm) para detectar Alexa 647-anti-CD24 (rojo); la figura 10C es la imagen de campo claro. La figura 10D es una imagen compuesta que indica CD44+/CD24- (las flechas indican células madre de cáncer). Se encontró que aproximadamente el 25 % de las células cancerosas expresaban CD44 pero no CD24 y cumplían así los criterios para las células madre de cáncer. De esta manera, se puede usar eDAR para distinguir subpoblaciones de células cancerosas en un fluido biológico.

F. Ejemplo 6

Detección eDAR utilizando alícuotas discretas.

En un ejemplo de los métodos proporcionados en el presente documento, la eDAR puede operarse usando alícuotas acuosas discretas que están separadas por una fase inmiscible para encapsular biopartículas antes de la etapa de detección. La figura 16 ilustra un aparato eDAR que funciona de esta

manera. Por ejemplo, una suspensión celular que contiene células no deseadas (1601) y células raras deseadas 1602 se divide en alícuotas discretas (1631, 1641, 1651 y 1661), que están separadas unas de otras por una fase inmiscible (1642). Las partes alícuotas discretas se dirigen a fluir de izquierda a derecha en un canal de flujo (1603). Cuando la alícuota 1641 atraviesa el volumen de detección (1604; contorno cilíndrico), se detectan simultáneamente múltiples células encapsuladas dentro de la alícuota discreta (1641). Si no se detectan células deseadas, la alícuota discreta (1641) se clasifica como nula y se dirige hacia el canal 1611 (véase, por ejemplo, la alícuota 1651). Si se detectan células raras deseadas, la alícuota discreta se clasifica como no nula y se dirige hacia el canal 1621 (véase, por ejemplo, alícuota 1661).

En una realización, el elemento de filtro 1622 puede estar dispuesto en el canal 1621 para permitir selectivamente el paso de la porción de fluido mientras se conservan las biopartículas deseadas. En una realización, y el aparato eDAR puede acoplarse a un citómetro de flujo convencional. Por ejemplo, en la figura 16, el canal 1621 puede estar en comunicación de fluido con un citómetro de flujo convencional (con o sin elemento de filtro 1622), de manera que la alícuota discreta 1661 que contiene la célula rara 1602 se examina o se clasifica adicionalmente en serie (una célula a la vez).

La fase inmiscible (1642) puede ser continua (es decir, rodea en su totalidad las alícuotas discretas) como se ilustra en la figura 16 o segmentada (es decir, la fase inmiscible 1642 ocupa solamente la separación entre alícuotas discretas pero no rodea completamente las alícuotas).

G. Ejemplo 7

Como ejemplo de la utilidad de un aspecto de la presente invención, si una suspensión celular de 10 ml contiene sólo 9 células raras deseadas entre 10 mil millones de células no deseadas, eDAR, en la forma más simple, requerirá la detección de una característica a partir de las células deseadas contenidas en 10 alícuotas. Puesto que hay sólo 9 células deseadas, al menos una alícuota estará desprovista de las células deseadas y puede clasificarse como nula y descartada inmediatamente. Las células no deseadas contenidas en la porción desechada no tendrían que ser seleccionadas individualmente. Por consiguiente, con sólo 10 alícuotas, al menos 1/10 del volumen total se descarta inmediatamente y 1/10 de las células no deseadas (contenidas dentro del volumen desechado) no tendrían que ser detectadas individualmente. Para ponerlo en perspectiva, es decir, 1 billón de células no deseadas eliminadas como un conjunto con una decisión. Con el clasificador de células del estado de la técnica operando a la velocidad extrema de 70.000 objetos/s, esta decisión dio como resultado $1.000.000.000/70.000 = 14.300$ s o 4 horas de tiempo ahorrado. Esto da como resultado un aumento significativo en la eficiencia del tiempo.

A partir del escenario presentado anteriormente, se supone que si la suspensión celular de 10 ml se divide en 100 alícuotas de 100 µl cada una, puesto que el volumen total de suspensión celular contiene sólo 9 células deseadas, al menos 91 porciones no contendrán ninguna célula deseada. Por lo tanto, realizando sólo 100 escaneos y tomando 100 decisiones, se pueden eliminar inmediatamente 91 alícuotas x 100 µl = 9,1 ml. Las células contenidas dentro de las porciones descartadas serán 9,1 billones de células, o el 91 % de las células no deseadas se eliminan dentro de 100 decisiones.

H. Ejemplo 8

La figura 1 ilustra una realización particular de la invención, en la que una característica de partícula rara se detecta en una alícuota durante el funcionamiento de un modo simultáneo. En resumen, una suspensión de células que contiene células indeseables (101) y células raras deseables (102) se dirige para fluir de izquierda a derecha en un canal de flujo (103). Múltiples células pueden atravesar un volumen de detección (104) encerrado por un cilindro sombreado en un momento dado y detectarse simultáneamente. Si no se detectan células deseadas, una alícuota equivalente al volumen de detección se clasifica como nula y se dirige hacia el canal 111. Si se detectan cualesquiera células deseadas, la alícuota se clasifica como distinta de cero y se dirige hacia el canal 121.

Un elemento de filtro (122) puede estar opcionalmente dispuesto en el canal 121 para permitir selectivamente el paso de la porción de fluido mientras se conservan las biopartículas deseadas. El elemento de filtro puede estar en forma de micropostes, microimpactadores, microtamices, canales con aperturas más pequeñas que las biopartículas, canales con aperturas tales que se impide que una biopartícula entre en una apertura pero se permite que el fluido continúe fluyendo alrededor de la biopartículas a través de la apertura ("canales 1-D"), micropelotas, membranas porosas, protuberancias de las paredes, revestimiento adhesivo, fibras tejidas o no tejidas (tales como tela o malla) de lana, metal (por ejemplo, acero inoxidable o Monel), vidrio, papel o sintéticas (por ejemplo, nylon, polipropileno, policarbonato, parileno y poliéster), acero inoxidable sinterizado u otros metales, o materiales inorgánicos porosos tales como alúmina, sílice o carbono.

I. Ejemplo 9

En otro ejemplo de ejecución de eDAR en un modo simultáneo, el método puede consistir además en enmascarar selectivamente la alícuota para reducir la señal de fondo excesiva y mejorar la relación señal-ruido. La figura 2 ilustra el uso de una máscara (211) con una matriz de aperturas (212) situadas entre el volumen de detección y un detector para permitir selectivamente a través de una característica detectable. Se pueden detectar simultáneamente múltiples biopartículas con el uso de la máscara (211). Mediante la reducción de la señal de fondo excesiva y el aumento de la relación señal-ruido, la sensibilidad de la detección es mejorada ya que las señales débiles incluso de una alícuota altamente diluida pueden detectarse con precisión. En otras palabras, cuanto mejor sea la relación señal-ruido, más explorada puede ser una alícuota. Como resultado directo, el rendimiento fluido se aumenta correspondientemente, ya que se necesita escanear menos alícuotas (pero más grandes). Si no se detectan las biopartículas deseadas, una alícuota equivalente al volumen de detección se clasifica como nula y se dirige hacia el canal 221. Si se detectan cualesquiera biopartículas deseadas, la alícuota se clasifica como distinta de cero y se dirige hacia el canal 222.

J. Ejemplo 10

El panel 11 de la FIG. 11, que es una ilustración ampliada del dispositivo 710 (figura 7), ilustra el dispositivo 1110, para dividir en alícuotas la suspensión con cinco canales de fluido (1111, 1112, 1113, 1114 y 1115) unidos en la unión 1116. Los canales de fluido 1111, 1112, 1113 llevaban fluido hacia la unión 1116, mientras que los canales de fluido 1114 y 1115 llevaban fluido fuera de la unión 1116. El pistón solenoide 1120 se colocó encima del canal 1111 y el pistón solenoide 1121 se colocó encima del canal 1112. Los pistones solenoides 1120 y 1121 se configuraron para empujar hacia abajo una membrana elastomérica de polidimetilsiloxano (PDMS), que separaba los pistones 1120 y 1121 del fluido en los canales 1111 y 1112.

El panel A de la figura 11 ilustra el funcionamiento del dispositivo 1110 para la división en alícuotas de la suspensión. Al empujar el pistón solenoide 1120 hacia abajo la membrana PDMS sobre el canal de flujo 1111, el canal 111 se cerró. Al mismo tiempo, el pistón solenoide 1121 se configuró para permitir que el fluido pasara a través del canal 1112 hacia la unión 1116. Como resultado, la sangre que contenía células raras en el canal entrante 1112 se desvió hacia el canal de salida izquierdo 1114 (véase el panel B, 0 ms). Para dirigir la alícuota 1130 al canal de salida derecho 1115, el pistón solenoide 1120 se retiró de la membrana PDMS en la parte superior del canal 1111 mientras que el pistón solenoide 1121 empujó hacia abajo la membrana PDMS sobre el canal 1112. Esto dio como resultado dirigir una alícuota 1130 de sangre que contenía células raras al canal de salida derecho 1115 (panel C, 5 ms y panel D, 10 ms). La redirección de alícuotas usando pistones solenoides como se describe requiere un tiempo tan corto como 5 ms.

K. Ejemplo 11

El panel A de la figura 12 ilustra el dispositivo 1210 utilizado para dividir en alícuotas la suspensión con cinco canales de fluido (1211, 1212, 1213, 1214 y 1215) unidos en la unión 1240. Los canales de fluido 1211, 1212 y 1213 llevaban fluido hacia la unión 1240, mientras que los canales de fluido 1214 y 1215 llevaban fluido fuera de la unión 1240. La válvula solenoide 1220 se conectó al puerto 1216 en comunicación de fluido con el canal 1211 a través de la tubería 1221, y la válvula solenoide 1222 se conectó al puerto 1217 en comunicación de fluido con el canal 1212 a través del tubo 1223.

Las válvulas solenoides 1220 y 1222 se accionaron para cerrarse o abrirse con una señal electrónica o informática (por ejemplo, señal TTL). Cuando la válvula solenoide 1220 se cerró mientras la válvula solenoide 1222 permaneció abierta, la alícuota 1260 de sangre que contenía células raras en el canal entrante 1213 se desvió al canal de salida izquierdo 1214 (véase el panel B, 0 ms). Cuando se abrió la válvula solenoide 1220 mientras se mantuvo cerrada la válvula solenoide 1222, una alícuota 1260 de sangre que contenía células raras en el canal entrante 1213 se desvió hacia el canal de salida derecho 1215 (véase el panel C, 2 ms). La redirección de alícuotas usando una combinación de electroválvulas 1220 y 1222 podría canalizar la alícuota de un canal a otro en tan sólo 2 ms.

L. Ejemplo 12

Para probar el rendimiento del dispositivo eDAR, se preparó una mezcla de sangre y células cancerosas de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se marcaron 1×10^6 /ml de células MCF-7 con 20 μ l de anticuerpo fluorescente EpCAM. Esta mezcla de células se diluyó después a 1×10^5 células/ml con diluyente hematológico Isoton. Después se añadieron 10 μ l de la mezcla celular diluida a 2 ml de sangre humana completa y fluyó a través del dispositivo de división en alícuotas. El caudal en el dispositivo de división en alícuotas fue nominalmente 30 μ l/min a menos que se indique otra cosa.

La figura 13 muestra las señales de fluorescencia recogidas de 2 fotodiodos de avalancha (APD) situados en diferentes lugares aguas arriba y aguas abajo de la unión 1116 (o 1240). El gráfico 1310 muestra la huella de señal 1311 de un APD configurado para detectar la presencia de la molécula de EpCAM en una

alícuota al volumen de detección 1140 (o 1270), mientras que el gráfico 1320 muestra a huella de señal 1321 de un segundo APD configurado para detectar la presencia de la molécula de EpCAM en el canal 1114 (o 1214). Los picos de señal 1312 coincidían sustancialmente con los picos de señal 1322, indicando que la canalización de la alícuota era correcta, dando como resultado una alta recuperación de células raras.

Con el fin de investigar más a fondo el rendimiento del dispositivo eDAR, se contó el número de células cancerosas dirigidas al canal de flujo correcto y posteriormente se recogieron ("recuperaron") mientras se ajustó la longitud de tiempo que la válvula solenoide (1220, 1222) o el pistón 1120, 1121) permanecen cerrados o abiertos ("longitud de pulso"). El porcentaje de recuperación se calculó dividiendo el número de células raras recogidas en el canal correcto por el número de células raras detectadas por un APD en el volumen de detección 1140 o 1270. El gráfico 1410 de la figura 14 muestra el porcentaje de células cancerosas recuperado en función de la longitud de pulso. La huella 1420 indica que cuando el ancho de pulso era de 10 ms o menos, el 100 % de las células cancerosas se recogieron en el canal correcto. A medida que el ancho de pulso aumentó, la huella 1420 disminuyó, indicando una pérdida de células en el canal incorrecto.

Ajustando el caudal del canal entrante 1113 (o 1213), también se observó que la recuperación podría optimizarse. La figura 15 muestra el gráfico 1510 indicando la huella 1520 el porcentaje de células raras recuperadas en función del caudal entrante. Cuando el caudal fue inferior a 30 $\mu\text{l}/\text{min}$, la recuperación estuvo entre el 89-100 %. Sin embargo, a medida que aumentó el caudal, la recuperación disminuyó, indicando una pérdida creciente de células raras en el canal equivocado.

REIVINDICACIONES

1.Un aparato para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el aparato:

- 5 (a) al menos un canal de entrada;
 (b) al menos un canal de salida;
 (c) al menos un detector;
 (d) un mecanismo capaz de dirigir un flujo de una alícuota de fluido, en el que la alícuota comprende una pluralidad de partículas distribuidas aleatoriamente a lo largo de un espacio tridimensional; y
 10 (e) un ordenador capaz de asignar un valor a la alícuota en base a la presencia, ausencia, identidad, composición o cantidad de las partículas raras en la alícuota, en el que el ordenador está en comunicación con el detector y el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota y en el que la partícula rara es una célula o macromolécula presente en la muestra de fluido a un nivel bajo que comprende menos de aproximadamente 1 parte por 10^3 de la población total de partículas en la muestra de fluido.
 15

2.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende al menos dos canales de salida; opcionalmente, en el que el mecanismo dirige el flujo de la alícuota a un primer canal de salida si la alícuota contiene la partícula rara o un segundo canal de salida si la alícuota no contiene la partícula rara; opcionalmente en el que el mecanismo dirige el flujo de la alícuota que contiene la partícula rara a un canal de salida dependiendo de la identidad, composición o cantidad de la partícula rara.
 20

3.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota comprende un electrodo, un elemento magnético, un elemento acústico o un elemento electroaccionado; o en el que el mecanismo para dirigir el flujo de la alícuota comprende una o más válvulas o pistones electroaccionados, en el que las válvulas o pistones controlan el flujo de la alícuota en al menos un primer canal de flujo direccional que cruza con el canal de entrada y el canal de salida en una primera unión.
 25
 30

4.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal de salida está en comunicación de fluido con el canal de entrada.

5.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende:
 35 una tubería, un puerto o una interconexión en comunicación de fluido con el canal de entrada; opcionalmente en el que una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido se forman externamente al aparato y fluyen hacia el canal de entrada del aparato a través de la tubería, el puerto o la interconexión en comunicación de fluido con el canal de entrada; y/o,
 40 una pluralidad de canales de flujo, y en el que una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido se separan físicamente en la pluralidad de canales de flujo.

6.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

45 el mecanismo es capaz de dirigir en paralelo la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; y/o, el detector comprende un dispositivo de formación de imágenes; y/o, el detector comprende más de un dispositivo de detección; o en el que el detector comprende un único dispositivo de detección; y/o,
 50 el detector se selecciona del grupo que consiste en una cámara, un multiplicador de electrones, un sensor de imagen de dispositivo de carga acoplada (CCD), un tubo fotomultiplicador (PMT), un fotodiodo de avalancha (APD), un diodo de avalancha de fotón único (SPAD), y un sensor de imagen de semiconductor de óxido metálico complementario (CMOS); o comprende un fotodetector, electrodetector, detector acústico o magnético; o en el que el detector incorpora imágenes de microscopía por fluorescencia.
 55

7.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

60 el aparato comprende una fuente de radiación electromagnética para la interrogación de la alícuota; y/o, el detector es capaz de detectar en paralelo la presencia o ausencia de la partícula rara en la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; o la formación en imágenes en paralelo de la partícula rara en la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido.

8.Un método para detectar una partícula rara en una muestra de fluido, comprendiendo el método:

- 65 (a) detectar la presencia o ausencia de la partícula rara en una alícuota de la muestra de fluido;
 (b) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de la partícula rara en la alícuota,

en el que la partícula rara es una célula o macromolécula presente en la muestra de fluido a un nivel bajo que comprende menos de aproximadamente 1 parte por 10^3 de la población total de partículas en la muestra de fluido; y
(c) dirigir un flujo de o recoger la alícuota basándose en el valor asignado.

5

9.El método de la reivindicación 8, en el que la dirección del flujo de la alícuota comprende el uso de un mecanismo capaz de dirigir el flujo de la alícuota, y en el que la alícuota comprende una pluralidad de partículas distribuidas aleatoriamente a lo largo de un espacio tridimensional.

10

10.El método de la reivindicación 8, en el que la detección comprende:

(i) poner en contacto la muestra de fluido con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende el reactivo de detección y una partícula rara; y

15

(ii) detectar la presencia o ausencia del complejo formado en (i) en la alícuota de la muestra de fluido.

11.El método de la reivindicación 8, que comprende:

20

(i) poner en contacto un fluido biológico de un sujeto con un reactivo de detección en condiciones adecuadas para transformar el reactivo de detección en un complejo que comprende el reactivo de detección y la partícula rara, en el que la partícula rara es una célula o macromolécula presente en el fluido biológico en un nivel bajo;

25

(ii) detectar la presencia o ausencia de un complejo formado en (i) en la alícuota del fluido biológico;

(iii) asignar un valor a la alícuota en base a la presencia o ausencia de un complejo formado en (i).

12.El método de la reivindicación 8, en el que la partícula rara se pone en contacto con un reactivo de detección diferenciable.

30

13.El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que a la alícuota se le asigna un primer valor si la alícuota contiene la partícula rara, o un segundo valor si la alícuota no contiene la partícula rara; opcionalmente en el que el primer valor depende de la identidad de la partícula rara o de la concentración de la partícula rara en la alícuota; opcionalmente en el que múltiples alícuotas que tienen el mismo valor asignado se agrupan entre sí.

35

14.El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende dirigir un flujo o recoger la alícuota en base al valor asignado, en el que dirigir el flujo de la alícuota comprende usar un mecanismo capaz de dirigir el flujo de la alícuota, y en el que la alícuota comprende una pluralidad de partículas distribuidas aleatoriamente a lo largo de un espacio tridimensional.

40

15.El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

la detección se realiza durante el flujo continuo de la muestra de fluido a través de un canal de flujo; y/o,

45

la dirección comprende utilizar un mecanismo capaz de dirigir en paralelo el flujo de la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; opcionalmente en el que la pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido están físicamente separadas antes de la detección; opcionalmente en el que las alícuotas en la pluralidad de alícuotas se dividen en canales o cámaras de flujo separadas antes de la detección; y/o,

50

la detección comprende:

(i) interrogar la alícuota con una fuente externa de radiación electromagnética; y

(ii) detectar la fluorescencia de la partícula rara; y/o

55

la detección comprende usar más de un dispositivo de interrogación y/o dispositivo de detección; o en el que la detección comprende el uso de un único dispositivo de interrogación y/o dispositivo de detección; y/o,

la detección comprende detectar la bioluminiscencia o quimioluminiscencia de la partícula rara; y/o,

60

el reactivo de detección es diferenciable por fluorescencia a diferentes longitudes de onda; y/o, la muestra de fluido se pone en contacto simultáneamente con una pluralidad de reactivos de detección diferenciables, teniendo cada uno una especificidad diferente en condiciones suficientes para transformar la pluralidad de reactivos de detección en una pluralidad de complejos que comprenden los reactivos de detección y una pluralidad de partículas raras; opcionalmente en el que la pluralidad de complejos se detectan en paralelo; y/o

65

la detección comprende detectar en paralelo la presencia o ausencia de la partícula rara en una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido; o formar imágenes en paralelo de la partícula rara en una pluralidad de alícuotas de la muestra de fluido.

16.El aparato de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores o el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que:

- 5 una alícuota en la pluralidad de alícuotas comprende un volumen discreto; y/o,
 la partícula rara es una célula rara; y/o,
 la alícuota contiene más de una partícula rara; y/o,
 la muestra de fluido es un fluido biológico.

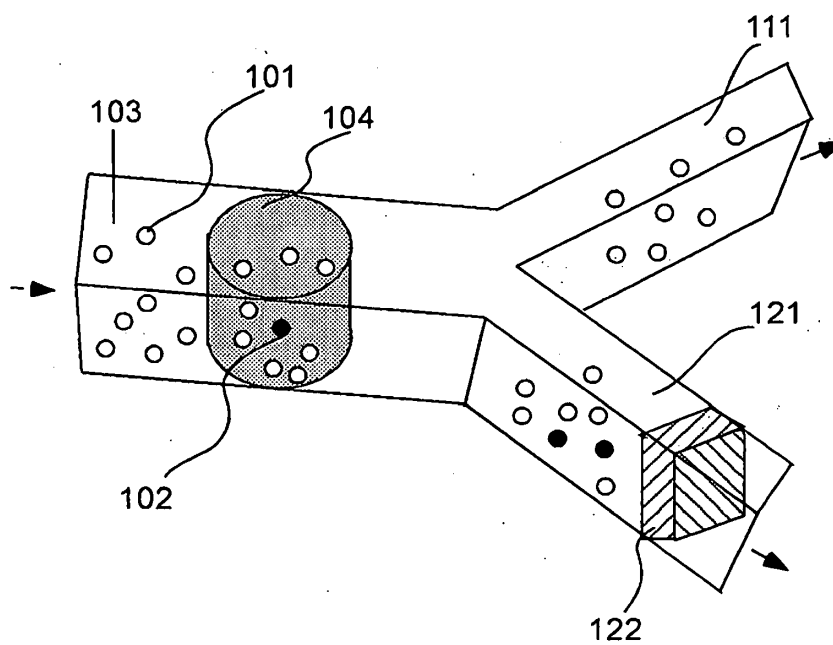


FIG 1

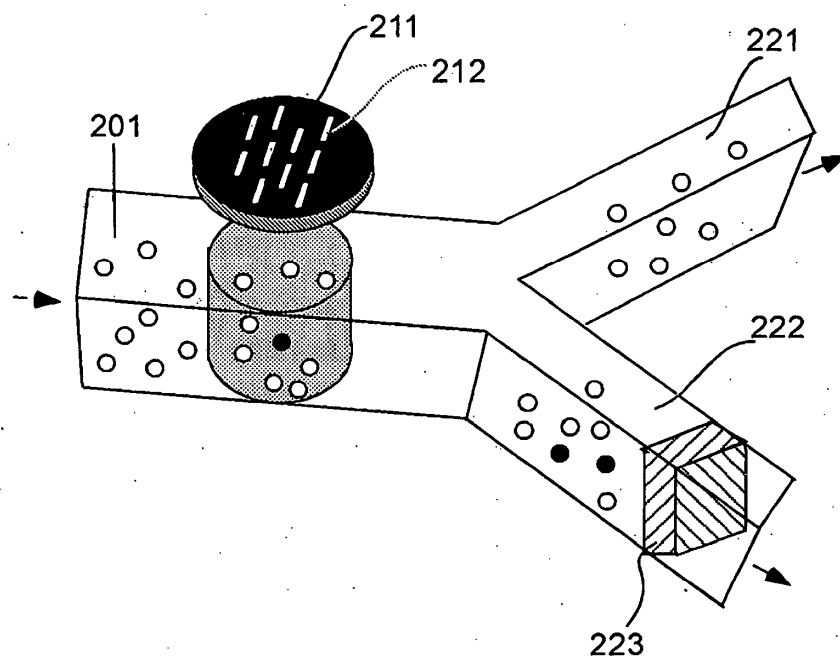


FIG 2

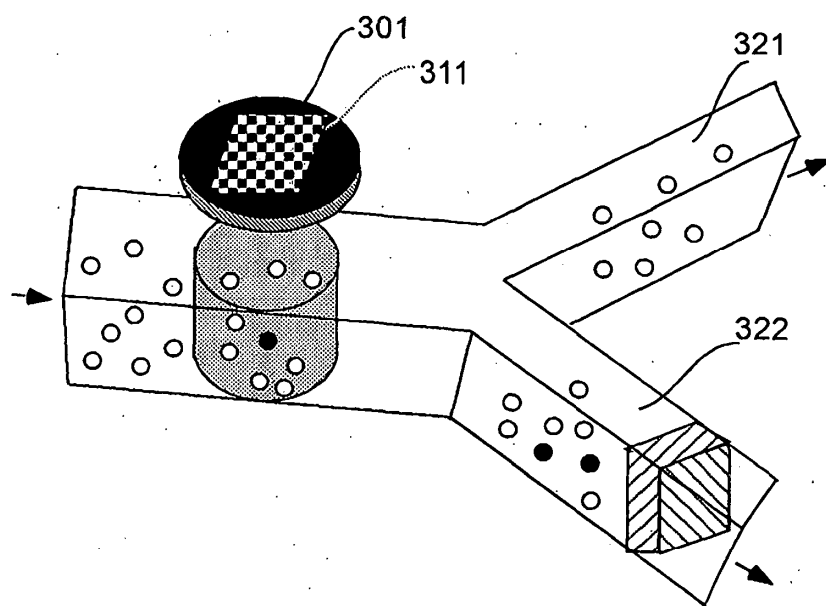


FIG 3

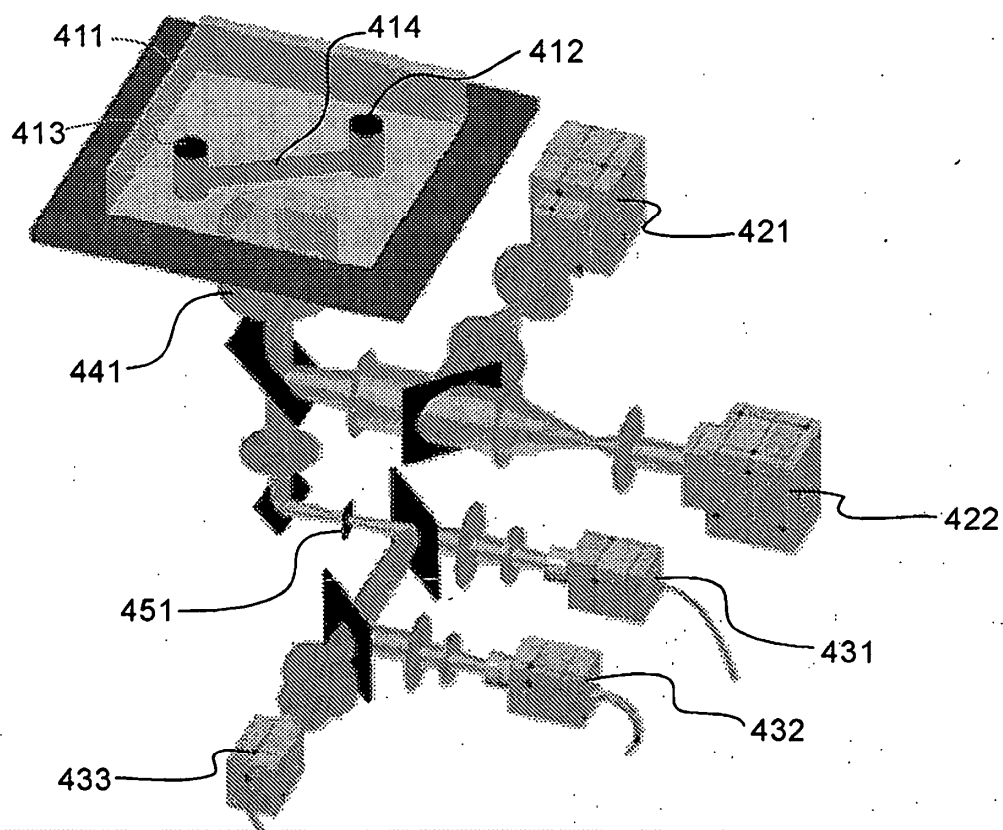


FIG 4

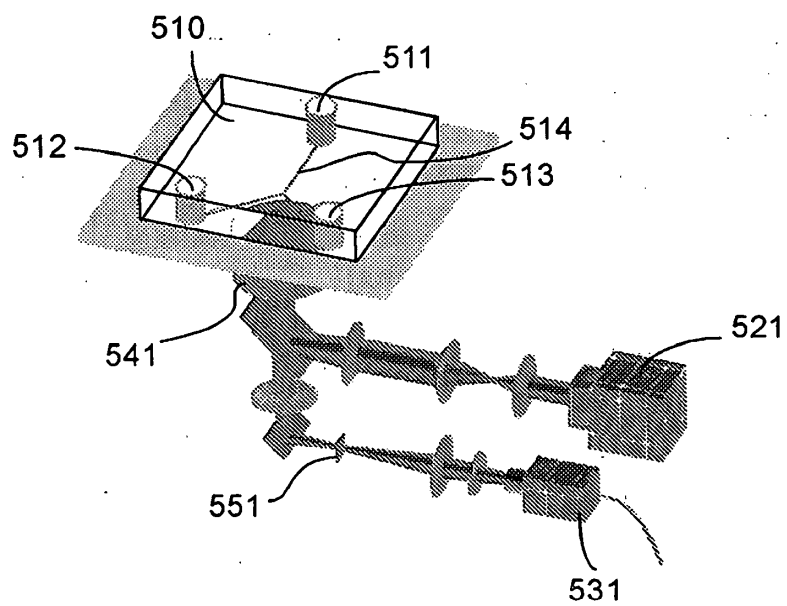


FIG 5

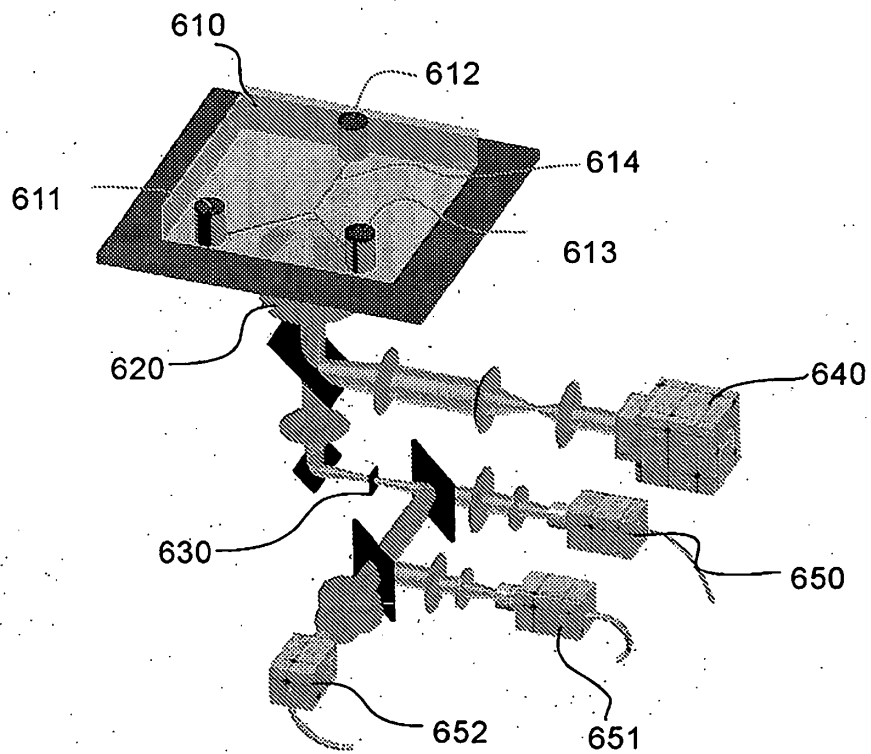


FIG 6

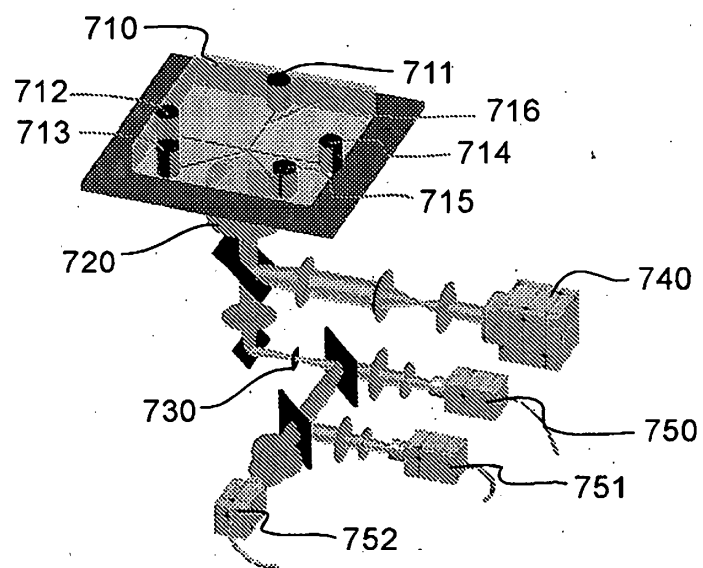


FIG 7

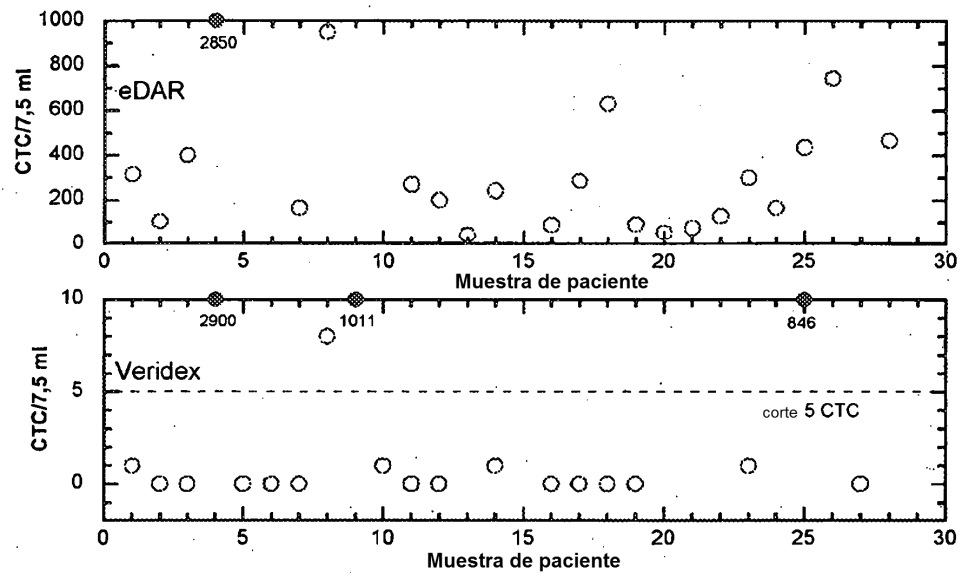


FIG 8

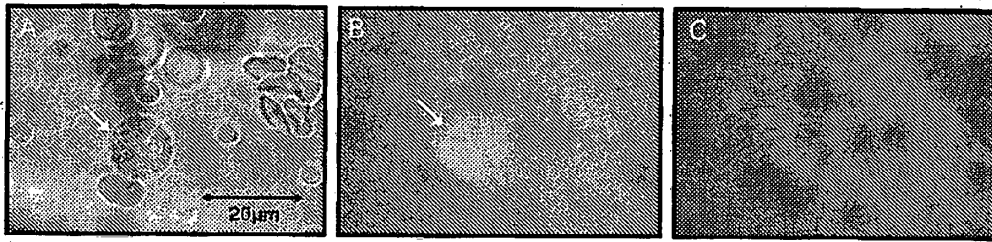


FIG 9A

FIG 9B

FIG 9C

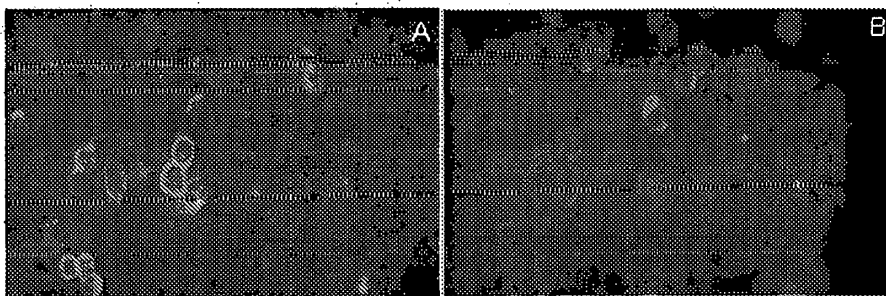


FIG 10A

FIG 10B

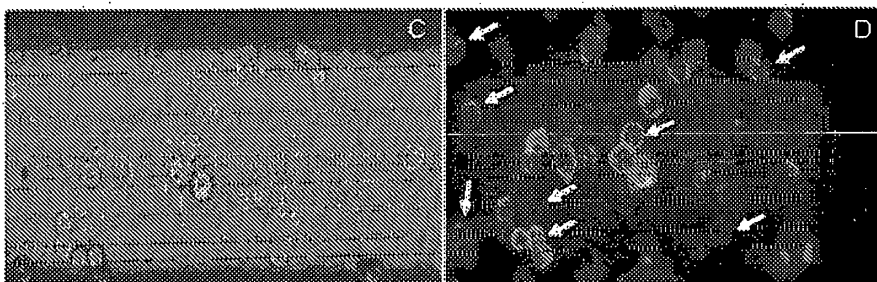


FIG 10C

FIG 10D

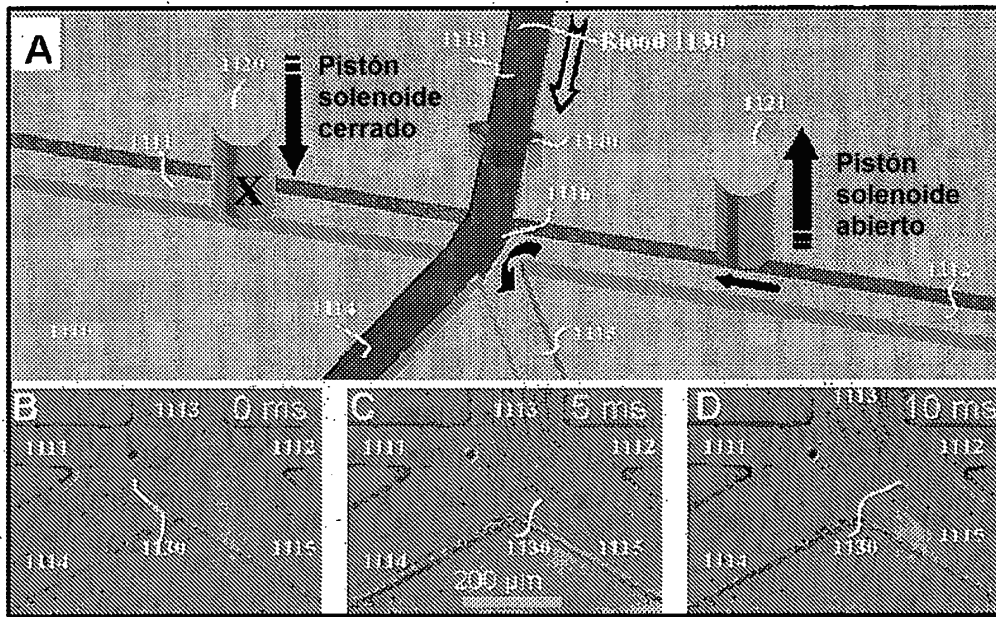


FIG 11

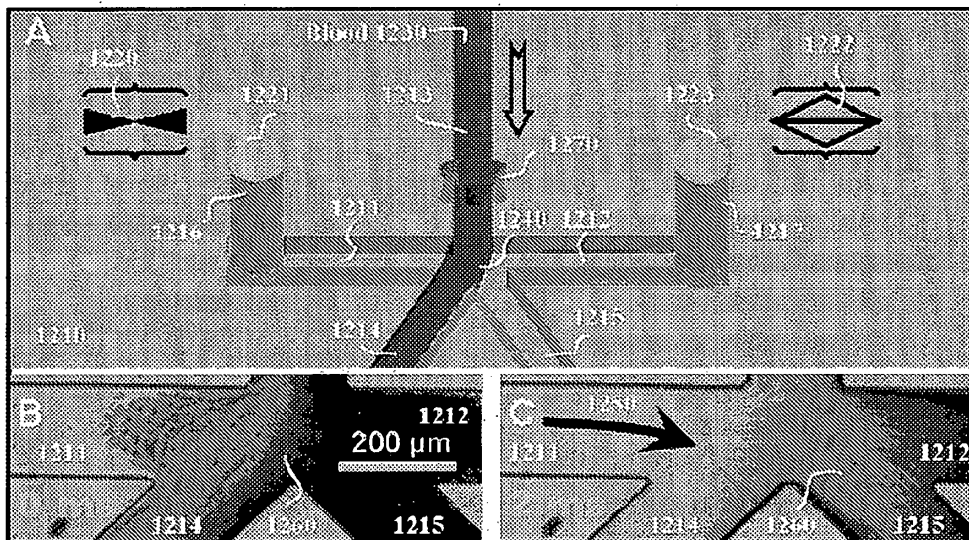


FIG 12

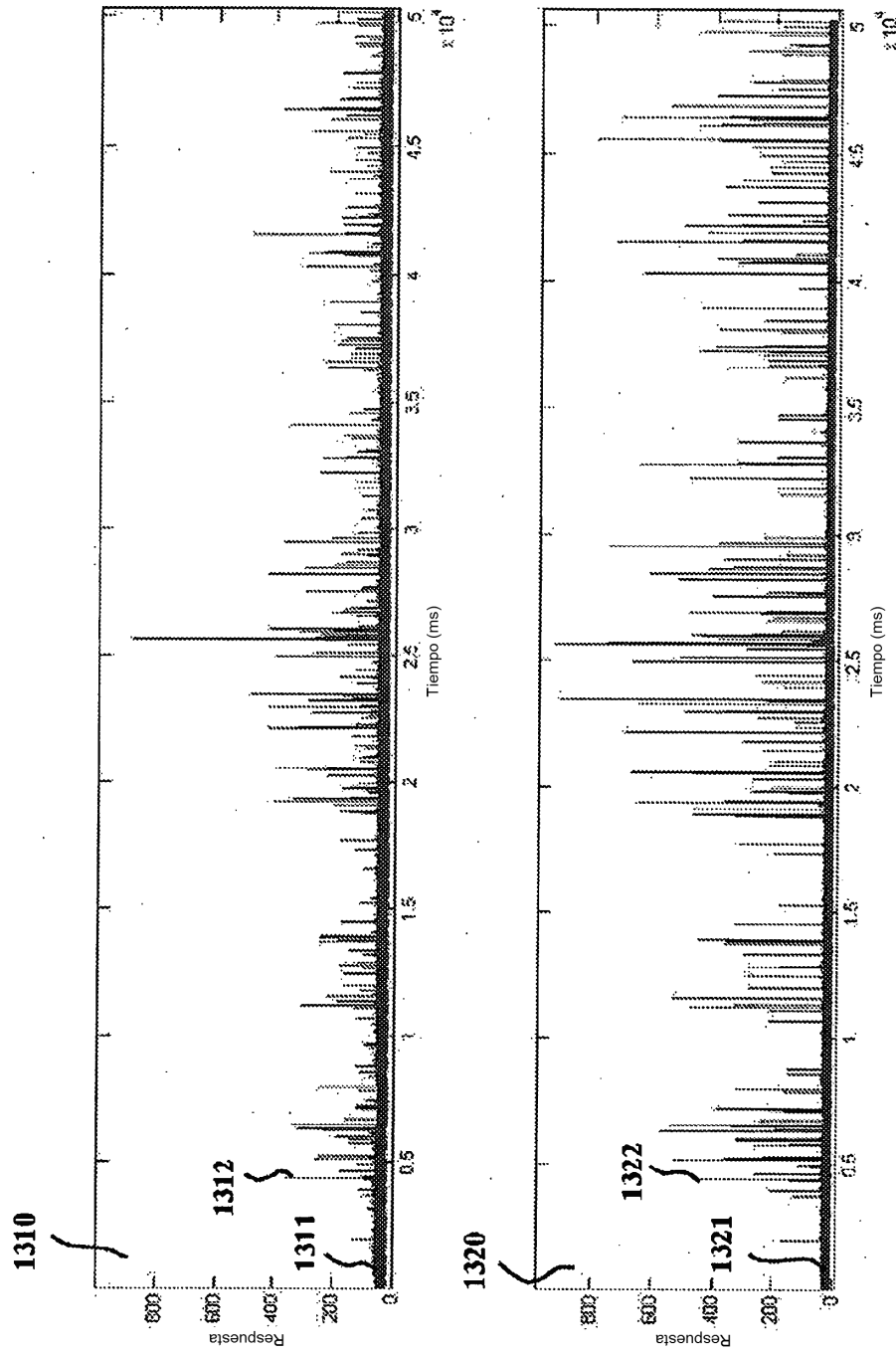


FIG 13

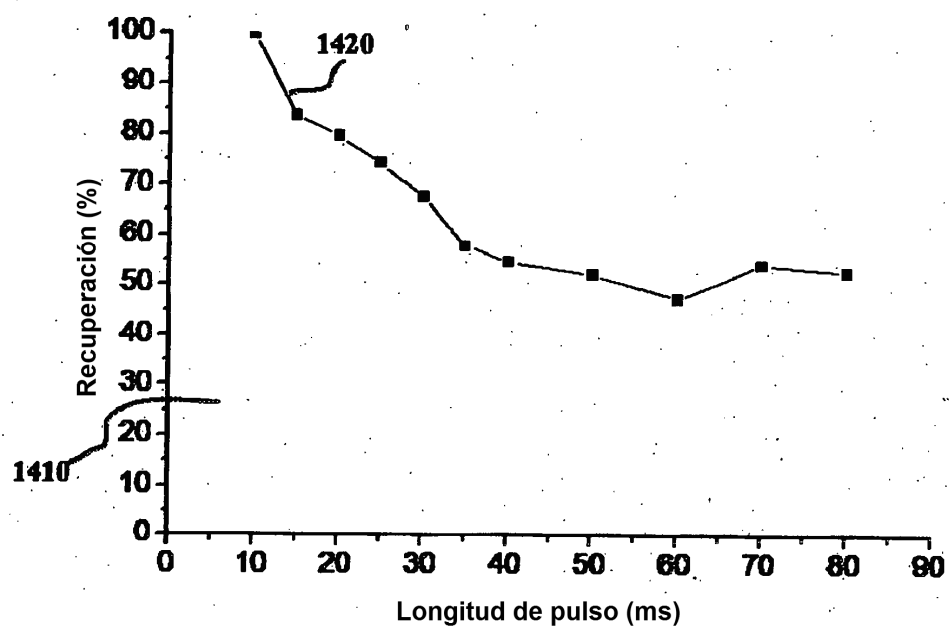


FIG 14

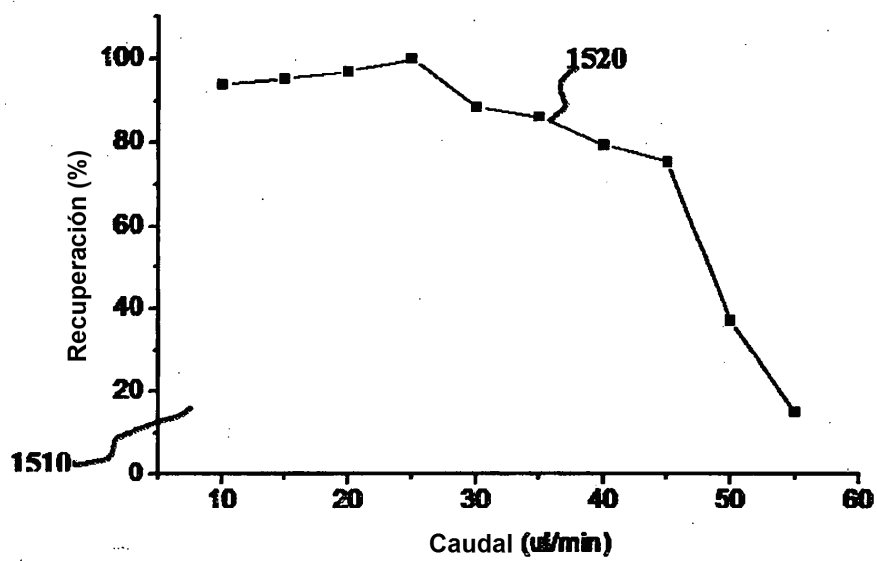


FIG 15

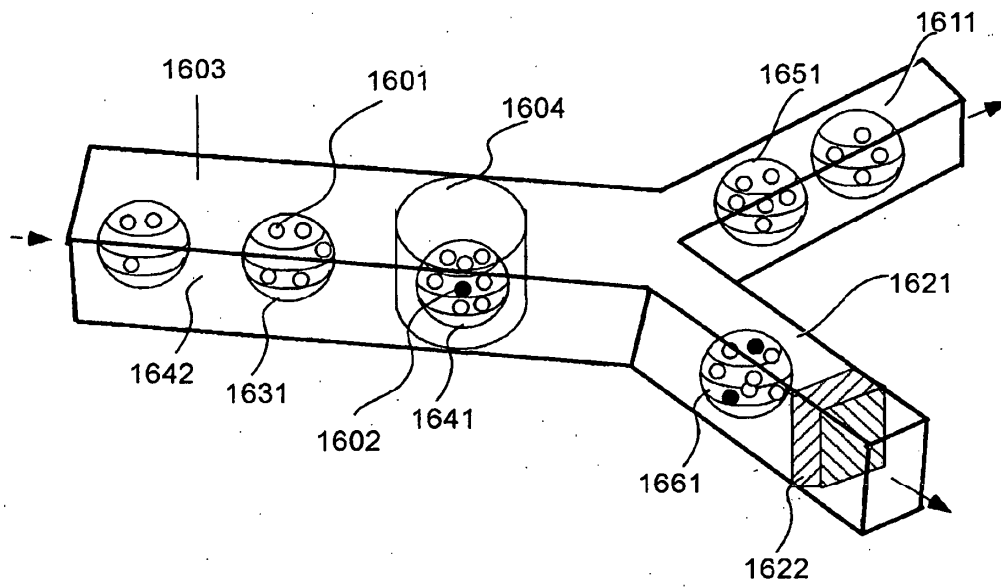


FIG 16