

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 699 679**

51 Int. Cl.:

G01N 27/403 (2006.01)

G01N 27/404 (2006.01)

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

B03C 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.04.2009 PCT/US2009/039565**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.12.2009 WO09146143**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.04.2009 E 09755505 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018 EP 2260297**

54 Título: **Sistema multidimensional ex-vivo para la separación y el aislamiento de células, vesículas, nanopartículas y biomarcadores**

30 Prioridad:

03.04.2008 US 42228

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

12.02.2019

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**HELLER, MICHAEL;
SULLIVAN, BENJAMIN;
KRISHNAN, RAJARAM;
CARSON, DENNIS y
ESENER, SADIK**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 699 679 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema multidimensional ex-vivo para la separación y el aislamiento de células, vesículas, nanopartículas y biomarcadores

Antecedentes

5 En la investigación biomolecular y en el diagnóstico clínico es importante y un desafío separar e identificar células raras, bacterias, virus y biomarcadores (p. ej., ADN, ARN, anticuerpos, otras proteínas, etc.) en muestras de fluidos complejos, tales como sangre, plasma, suero, saliva y orina. Adicionalmente, el advenimiento de la bio-
 10 nanotecnología ha conducido a numerosos enfoques de administración de fármacos que implican la encapsulación de fármacos y agentes formadores de imágenes en nanovesículas y nanopartículas. Enfoques de este tipo significan que ahora también será importante identificar y separar nanovesículas y nanopartículas residuales que permanecen en el torrente sanguíneo. Se puede utilizar una diversidad de técnicas y mecanismos físicos, electrónicos y biológicos para la preparación de muestras y el aislamiento de células específicas, nanovesículas y biomoléculas de muestras complejas tales como la sangre. Estas técnicas y mecanismos incluyen centrifugación, filtración en gel, unión de afinidad, electroforesis de CC y diversas combinaciones incorporadas en laboratorio en un chip, dispositivos microfluídicos y sistemas de muestra a respuesta.
 15

Muchas de estas técnicas convencionales (o combinaciones) son procesos que requieren relativamente tiempo y no están exentos de problemas y limitaciones. En particular, sigue siendo difícil el aislamiento de células raras (células cancerosas, células fetales y células madre), un bajo número de bacterias y virus o un número muy bajo de anticuerpos específicos, proteínas, enzimas, ADN y moléculas de ARN. En el caso de los diagnósticos clínicos, la
 20 detección de células raras y biomarcadores también puede estar limitada por el tamaño de la muestra; es decir, solo una cantidad relativamente pequeña de sangre puede ser extraída de pacientes muy enfermos, ancianos y bebés. Así, los procesos de preparación de muestras que son ineficientes o que requieren una alta dilución de la muestra original fallan a menudo o no son fiables para aislar células y otros marcadores relacionados con enfermedades a una baja concentración. Esto es en particular un problema para la detección temprana de cáncer, enfermedad residual, células fetales/ADN/ARN en la sangre materna, bacterias y virus en sangre (infección séptica) y la
 25 detección de bajos números de patógenos (p. ej., bacterias, virus, etc.) y agentes bio-terror en grandes volúmenes de aire, agua o en alimentos.

Técnicas de electrocinética de corriente alterna que implican el uso de campos de CA para manipular células y nanopartículas ofrecen algunos mecanismos particularmente atractivos para la separación de células [véanse las Referencias 2-5], biomarcadores (ADN [Ref. 5-8], proteínas [Ref. 9], etc.), y en última instancia, nanovesículas de administración de fármacos [Ref. 10]. Estas técnicas se pueden dividir en tres fenómenos distintos: (1) electro-
 30 ósmosis de CA, que es un flujo de fluido en superficie debido a la carga de la superficie en un electrodo; (2) flujo electrotérmico, que es flujo a granel en solución debido a gradientes térmicos producidos por los campos eléctricos; y (3) dielectroforesis (DEP), que es un movimiento inducido de partículas producido por las diferencias dieléctricas entre las partículas y los medios en un campo eléctrico de CA [Ref. 10]. Desafortunadamente, la mayoría de las formas convencionales de DEP y los efectos electrocinéticos relacionados tienen problemas que limitan la utilidad de estas tecnologías para la preparación de muestras y diagnósticos clínicamente relevantes.
 35

En primer lugar, las separaciones eficientes de DEP en términos de velocidad y control de selectividad tienen que llevarse a cabo, habitualmente, con una conductancia relativamente baja del orden de <math><10-100\text{ mS/m}</math> [Ref. 11]. Adicionalmente, la capacidad de aislar las entidades/los analitos deseados, tales como nanopartículas o biomarcadores de ADN en las regiones de campo alto positivo o DEP (habitualmente alrededor de o sobre los electrodos) se vuelve más difícil a medida que aumenta la fuerza iónica de la solución y la conductancia se vuelve mayor que 10 mS/m. Por lo tanto, muestras biológicas, tales como sangre o plasma que tienen fuerzas iónicas en el intervalo de 100-200 mM (conductancia ~ 500-1000 mS/m) deben diluirse y/o procesarse significativamente antes de
 40 que se puedan realizar las separaciones de DEP [Ref. 13, 14]. Esto solo limita a menudo la utilidad de la DEP para el diagnóstico clínico que implica la detección de células raras o bajos números de biomarcadores. En los casos en que una muestra (un ml de sangre) se debe diluir de 100 a 1000 veces, significa ahora que se debe procesar un volumen de muestra muy grande, lo que puede llevar mucho tiempo de forma prohibitiva. Si las células se concentran primero por mecanismos físicos, tales como centrifugación o filtración, y luego se diluyen en tampones de baja conductancia, estos procesos no solo requieren mucho tiempo, sino que también son costosos y provocan una perturbación considerable en la muestra. En el caso de que la DEP se utilice para separaciones de células madre, la dilución en baja fuerza iónica, menos amortiguadores de tipo fisiológico pueden ocasionar la perturbación de células madre sensibles y pueden afectar a su diferenciación ulterior. El aislamiento de ADN, ARN y biomarcadores de proteínas de la sangre también es importante para futuros diagnósticos clínicos, en particular para
 45 la vigilancia de la quimioterapia contra el cáncer [Ref. 15], enfermedad residual [Ref. 16] y detección precoz del cáncer [Ref. 17].
 50
 55

Aunque DEP se ha utilizado para el aislamiento de ADN y proteínas, existen problemas y limitaciones en el uso de DEP para llevar a cabo la detección de ADN en sangre. El primer problema es nuevamente la necesidad de diluir y/o procesar la muestra de sangre antes del análisis DEP. En el caso de biomarcadores de ADN y ARN circulantes, libres de células y clínicamente relevantes en sangre, es importante encontrar y medir la cantidad de ADN/ARN, su tamaño y composición base (mutaciones y polimorfismos) [Ref. 17-19]. El procesamiento de muestras que implica o requiere centrifugación, filtración y procedimientos de lavado puede provocar la liberación de moléculas de ADN por parte de células normales que están dañadas o lisadas en el proceso, así como cizallar el ADN clínicamente relevante en fragmentos más pequeños. La liberación de fragmentos de ADN extraños y el daño por el procesamiento al ADN clínicamente relevante compromete y limita en gran medida el valor diagnóstico de utilizar procedimientos de este tipo. Un procesamiento de muestras de este tipo también es altamente ineficiente, y hasta el 60% del ADN y más del 90% del ARN en la sangre se puede perder durante el procedimiento [17].

Una segunda área problemática es que la mayoría de los dispositivos de separación de DEP que se han utilizado para separaciones de ADN, proteínas y nanopartículas utilizan microelectrodos polinomiales de oro creados con una separación muy pequeña (6 μm o menos) entre ellos para servir como trampas de partículas; o utilizan matrices de microelectrodos de oro con una separación de 6 a 8 micras o menos entre ellas [Ref. 18-19]. Estos dispositivos de matriz de microelectrodos de oro se fabrican habitualmente pulverizando oro sobre un material de sustrato de vidrio. También existe un cierto número de enfoques DEP que implican el uso de nanoelectrodos [20]. El problema con estos enfoques es que las matrices tienen un rendimiento intrínsecamente bajo, ya que el espacio real para capturar el ADN u otras biomoléculas es relativamente pequeño y el efecto del campo eléctrico se reduce significativamente cuando aumenta la distancia desde el nanoelectrodo (p. ej., > 10 nm). Si este tipo de dispositivo se incrementa para la preparación de muestras (p. ej., para procesar 1-10 ml de sangre), el área de muestra real que puede ser interrogada por el campo limitado de DEP cerca de los electrodos significa que se perderá la mayor parte del ADN, o se requeriría un tiempo de procesamiento de muestras extremadamente largo. Si el dispositivo está diseñado para restringir el flujo de líquido de modo que pase dentro de los diez nanómetros de los nanoelectrodos, entonces el tiempo de procesamiento es extremadamente largo o se requerirá un dispositivo masivamente grande (dimensión x-y). Existe una diversidad de otros problemas que incluyen corrientes parásitas fluidas no controladas debido a otros efectos electrocinéticos y fuerzas osmóticas. En otras aplicaciones de DEP, también se han utilizado matrices que utilizan microelectrodos de platino circulares (50 μm a 80 μm de diámetro) con una separación de aproximadamente 200 μm y recubiertas con un hidrogel poroso para llevar a cabo la separación de bacterias de la sangre por DEP [Ref. 13, 14]. Nuevamente, para estas separaciones por DEP, la muestra de sangre se centrifugó y una pequeña fracción de las células se resuspendió en un tampón de baja fuerza iónica [Ref. 13, 14, 24-26].

Un tercer problema general para las técnicas electrocinéticas de CA es a menudo que las relaciones de sensibilidad frente a especificidad resultantes no son suficientemente altas para llevar a cabo separaciones importantes o clínicamente relevantes. Para las separaciones de células utilizando dielectroforesis (DEP), es difícil llevar a cabo separaciones de células raras eficientes con relaciones de uno en un millón. Debido a que muchos diagnósticos tempranos de enfermedades requieren una detección de biomarcadores de células raras o de bajo nivel, es importante poder mejorar la sensibilidad frente a las relaciones de especificidad tanto como sea posible. En general, la mayoría de los dispositivos de DEP no se incrementan adecuadamente para lidiar con la realidad clínica del aislamiento y la detección de biomarcadores de células raras o de bajo nivel, en que una muestra relativamente grande de 1-10 ml de sangre puede ser necesaria por razones estadísticas simples. Cuando los dispositivos de DEP están diseñados para muestras grandes, generalmente son ineficientes y son incapaces de funcionar en condiciones de alta conductancia y, por lo tanto, requieren una dilución adicional de la muestra.

Un cuarto problema para las técnicas electrocinéticas de CA es llevar a cabo procesos de separación eficientes (baja pérdida) y altamente selectivos en muestras biológicas complejas (p. ej., sangre, plasma, suero, etc.) para analitos y biomarcadores que incluyen; células raras, bacterias, virus, ADN, ARN y proteínas, en que todas las entidades pueden tener 2-3 órdenes de diferencia de magnitud en el intervalo de tamaños, y aún es necesario lograr una separación eficiente entre las entidades que son más similares en tamaño y composición. Un ejemplo importante es la separación de nanopartículas de ADN (20-50 kb), ADN de alto peso molecular (5-20 kb), ADN de peso molecular intermedio (1-5 kb) y ADN de peso molecular más bajo (0,1-1 kb).

El problema final y más grave para los dispositivos y técnicas electrocinéticos de CA (DEP) es la introducción de la electroquímica que se hace más pronunciada en soluciones de conductancia más alta (> 100 mS/m), a frecuencias de CA más bajas (< 20 kHz) y en tensiones más altas (> 20 voltios pt-pt). Tal como se mostrará en la sección Descripción Detallada de este documento, una electroquímica de este tipo puede provocar un cierto número de efectos adversos que incluyen burbujeo, calentamiento, turbulencia fluidica, degradación de electrodos y destrucción de analitos lábiles. Estos efectos adversos limitan en gran medida el rendimiento general del dispositivo de DEP, impiden que la acumulación, el aislamiento y la detección de entidades específicas (células, nanopartículas, ADN y proteínas) se produzcan en las regiones de alto campo de DEP e interfieren con el aislamiento de células y analitos en las regiones de bajo campo de DEP.

Se han utilizado otros tipos de dispositivos electrocinéticos de CA para separar células y nanopartículas, pero no han resultado viables en soluciones de alta conductancia. Uno de los argumentos más convincentes para la no viabilidad de los dispositivos electrocinéticos de CA y de DEP es el hecho de que, a diferencia de la electroforesis CC, que tiene un uso generalizado en la investigación biológica y el diagnóstico clínico, la DEP no se ha utilizado para ninguna aplicación práctica.

El documento WO 2007/107910 A1 describe un biosensor microelectrónico, que comprende una matriz de electrodos de campo para generar un campo eléctrico alternante en una cámara de muestras adyacente.

Sería deseable realizar una dielectroforesis con características de alto rendimiento que permita separaciones en muestras y tampones biológicos de alta conductancia.

10 Sumario

La presente invención se define por la reivindicación 1 independiente. Las reivindicaciones dependientes representan otras realizaciones de la invención. Realizaciones de la presente memoria descriptiva se refieren a nuevos sistemas, dispositivos, métodos y técnicas de preparación de muestras, muestra a respuesta y punto de atención que implican combinaciones únicas de técnicas de electrocinética CA multidimensional y dielectroforéticas (DEP), electroforéticas CC, microelectroforesis en dispositivo y de fluidos para separar e identificar células raras, bacterias, virus, nanovesículas y nanopartículas de administración de fármacos, organelas y estructuras celulares (núcleos, mitocondrias, vacuolas, cloroplastos, quilomicrones, etc.), biomarcadores de ADN/ARN circulantes libres de células y otras nanopartículas celulares relacionadas con la enfermedad (p. ej., componentes celulares parcialmente degradados que son liberados en la sangre, linfa u órganos por parte de células cancerosas, enfermas o dañadas), anticuerpos, complejos de anticuerpos, proteínas, enzimas y fármacos y terapias directamente en sangre u otras muestras biológicas o tampones. En las realizaciones descritas, una combinación de fuerzas electroforéticas continuas y/o pulsadas electrocinéticas/dielectroforéticas (DEP), fuerzas electroforéticas CC continuas y/o de campo pulsado, separación por tamaño de microelectroforesis en el dispositivo y flujo de fluido controlado (bombeado externamente y/o accionados por electrocinética CC/CA) se utilizan a través de nuevos dispositivos de cámara y otros dispositivos que incorporan matrices de electrodos robustos (tamaño micro y/o macro) con estructuras porosas superpuestas que se utilizan para llevar a cabo la preparación de muestras complejas, separaciones de biomoléculas y análisis de diagnóstico.

Como un ejemplo, esta memoria descriptiva describe primero nuevos dispositivos y sistemas electrocinéticos de DEP, en los que los electrodos se colocan en cámaras separadas y se crean regiones de DEP positivas y regiones de DEP negativas dentro de una cámara interior mediante el paso del campo de CA de DEP a través de estructuras de poros o agujeros. Se pueden utilizar diversas geometrías para formar las regiones deseadas positivas de DEP (campo alto) y regiones DEP negativas (campo bajo) para realizar separaciones de células, nanopartículas y biomarcadores. Dichas estructuras de poros o agujeros pueden contener (o estar llenas de) material poroso (hidrogeles) o pueden estar cubiertas con estructuras de tipo membrana porosa. Al segregar los electrodos en cámaras separadas, esos dispositivos de DEP con estructura de poros/agujeros eliminan básicamente que se produzca cualquier efecto electroquímico, calentamiento o movimiento de fluidos caótico en la cámara de separación interna durante el proceso DEP (véanse la Figura 1 y la Figura 2).

La memoria descriptiva también describe el uso de matrices a sección aumentada (dimensiones x-y) de electrodos robustos y disposiciones colocadas estratégicamente (dimensiones x-y-z) de electrodos auxiliares que combinan DEP, fuerzas electroforéticas y de fluidos, de modo que los volúmenes de sangre, suero, plasma u otras muestras clínicamente relevantes puedan analizarse más directamente en condiciones de mayor fuerza iónica/conductancia. Esta memoria descriptiva describe la superposición de estructuras de electrodos robustos (p. ej., platino, paladio, oro, etc.) con una o más capas porosas de materiales (hidrogeles porosos naturales o sintéticos, membranas, materiales de nanoporos controlados y materiales en capas dieléctricas delgadas) para reducir los efectos de cualquier reacción de electroquímica (electrólisis), calentamiento y movimiento caótico del fluido que se produzca en o cerca de los electrodos, y que aún permiten llevar a cabo la separación efectiva de células, bacterias, virus, nanopartículas, ADN y otras biomoléculas (Figuras 3-8). Además de utilizar los puntos de cruce de frecuencia de CA para lograr separaciones de mayor resolución, la microelectroforesis de CC en el dispositivo (en la matriz) también se puede utilizar para las separaciones secundarias. Por ejemplo, la separación de nanopartículas de ADN (20-50 kb), ADN de alto peso molecular (5-20 kb), ADN de peso molecular intermedio (1-5 kb) y fragmentos de ADN de peso molecular más bajo (0,1-1 kb) (Figuras 9-12). El hecho de que el dispositivo se pueda subdividir significa que separaciones concurrentes de diferentes células de la sangre, bacterias y virus, y ADN se pueden llevar a cabo simultáneamente en dicho dispositivo (Figuras 13-16).

Realizaciones de la presente memoria descriptiva también se refieren al uso del control de temperatura para proporcionar separaciones de células más selectivas y eficientes (p. ej., de células cancerosas y madre). Estas realizaciones se refieren, por lo tanto, en un aspecto a sistemas de diagnóstico de preparación de muestras ex-vivo, muestra-a-respuesta sin interrupciones, chip en un laboratorio y punto de atención (POC) que se pueden utilizar para vigilar y/o analizar la sangre en cuanto a células cancerosas, bacterias, virus, nanovesículas (administración de

fármacos), nanopartículas, nanopartículas de ADN de alto peso molecular, orgánulos celulares, proteínas, anticuerpos y complejos de anticuerpos, y una diversidad de otros biomarcadores clínicamente relevantes de la enfermedad y el estado metabólico. Sistemas y dispositivos ex-vivo de este tipo pueden monitorear o escanear la sangre por medio de campos eléctricos de CA, separando, aislando, concentrando altamente y detectando analitos y entidades clínicamente relevantes. Los sistemas se pueden utilizar para recopilar de forma selectiva dichas entidades para un análisis más complejo que incluye, pero no se limita a inmunquímica; hibridación de sonda de ADN/ARN; reacción en cadena de la polimerasa (PCR), amplificación por círculo rodante (RCA), amplificación por desplazamiento de la cadena (SDA) y otras técnicas de genotipado, análisis de secuencias, expresión génica, todo dentro de la misma cámara de muestra (muestra a respuesta sin interrupciones), o a través de dispositivos analíticos asociados y/o sistemas de recogida. Un dispositivo nuevo utilizado de acuerdo con la invención podría ser un sistema de muestra a respuesta sin interrupciones en el punto de atención (POC) que permita realizar diagnósticos moleculares rápidos en una muestra de sangre sin diluir. Otro dispositivo nuevo utilizado de acuerdo con la invención podría ser un sistema de vigilancia de quimioterapia contra el cáncer ex vivo que permitiera que la sangre se desvíe del paciente, se analice rápidamente (mida el ADN de los biomarcadores, los niveles de nanoveículos de fármaco o de administración de fármaco y aisle las células cancerosas), y luego sea devuelto al paciente (a través de circuito cerrado) con una dilución mínima o una perturbación física/química de la muestra. Sistemas ex-vivo de este tipo también podrían utilizarse para vigilar otras terapias, enfermedades y disposiciones del paciente, particularmente en situaciones de cuidados críticos.

Los métodos y las técnicas descritos que incorporan la invención permiten que la separación de células, nanopartículas y entidades biomarcadoras se lleve a cabo ahora en condiciones de fuerza iónica de conductancia mayor (> 100 mS/m), a menores frecuencias CA (DEP) (< 20 kHz) y a intensidades de campo más altas (> 20 tensiones pk-pk) que las utilizadas para la mayoría de las separaciones de DEP previas. Más específicamente, las separaciones de DEP pueden llevarse a cabo no solo en condiciones de mayor fuerza iónica, sino también directamente en muestras biológicas complejas que incluyen sangre, plasma, suero y tampones no diluidos en que ahora se pueden aislar analitos y entidades a nanoescala (500 nm a 5 nm) en regiones de campo alto DEP, mientras que las entidades más grandes (células, partículas de micras, etc.) pueden aislarse en las regiones de campo bajo DEP entre los electrodos.

Los nuevos dispositivos mejoran la electroquímica, el calentamiento y los efectos fluidos caóticos que se producen con el uso de matrices de electrodos DEP almenadas, que son actualmente un método preferido para separar nanopartículas y biomoléculas. En otro aspecto, los dispositivos y procesos pueden utilizar disposiciones a escala macroscópica de electrodos múltiples robustos en matrices seccionadas, lo que no solo permite que se interroguen de forma más rápida y eficiente volúmenes de muestras más grandes, sino que esencialmente permite aislar un número muy pequeño de células cancerosas, bacterias, virus, nanopartículas y materiales en nanopartículas y concentraciones muy bajas de ADN, biomarcadores de ARN y complejos de anticuerpos de muestras complejas que contienen números muy grandes de células normales, es decir, sangre. Esencialmente, el uso de un sistema macroscópico de electrodos "aumentado en escala apropiadamente" cambia los procesos de encontrar una célula específica (u otra entidad) en un millón, para encontrar una célula específica en mil, es decir, la muestra se distribuye en muchos subgrupos de electrodos, creando un mecanismo de clasificación jerárquico paralelo. Este proceso de separación se puede aplicar para tratar la sangre y eliminará el ADN, el ARN y el ADN de mayor peso molecular de las proteínas, así como de las células. Como resultado del tamaño de los electrodos (10-100 micras de diámetro, con una separación de 20-100 micras) y la capacidad de utilizar muestras menos diluidas, el proceso de separación se puede ahora completar de manera rápida y de alto rendimiento en dispositivos de matriz a escala, que tienen de 2-100 secciones de matriz, cada una de las cuales puede contener de 100-1000 electrodos individuales. El dispositivo también incorporaría electrodos auxiliares colocados estratégicamente en las dimensiones x-y-z.

Las realizaciones descritas en esta memoria demuestran que los dispositivos y los sistemas de matriz descritos pueden utilizarse para separar nanopartículas y nanopartículas celulares en intervalos de frecuencia más bajos (10-50 kHz) de entidades de tamaños más grandes (células y partículas de tamaño micrónico) en base a los efectos del factor de Clausius Mossotti (junto con otros fenómenos electrocinéticos de CA) inherentes a cada material en nanopartículas menor que o igual a aproximadamente 500 nm de diámetro. Esta memoria descriptiva también revela que cuando los efectos electrocinéticos de CA se utilizan en unión con el flujo de fluido, el proceso aliviará el exceso de calor acumulado. Esta memoria descriptiva describe, además, que cuando el flujo de fluido y la electroforesis de CC se combinan con los efectos electrocinéticos de CA, tanto las células como las proteínas pueden moverse aguas abajo de manera efectiva hacia la sección de la matriz inferior de los dispositivos ilustrados, mientras que los materiales en nanopartículas de ADN altamente cargadas negativamente y las moléculas de ADN se pueden concentrar aguas arriba en la sección de la matriz superior de los dispositivos. Por lo tanto, las diferentes secciones de la matriz de los dispositivos ilustrados se pueden utilizar ahora para llevar a cabo un proceso de separación más selectivo, tal como: multiplexación con glóbulos rojos, glóbulos blancos, separaciones de células cancerosas y eliminación de proteínas en la sección inferior de la matriz; bacterias, virus, nanopartículas y nanoveículos en la sección de la matriz central; y nanopartículas de ADN y moléculas de ADN en la sección de la matriz superior de los dispositivos.

Finalmente, esta memoria descriptiva también describe dispositivos con cámaras de electrodos separadas y estructuras de poros/orificios que conducen a una cámara de separación aislada, así como dispositivos de matriz de electrodos robustos que están recubiertos con materiales nanoporosos (de un nanómetro a un milímetro de espesor) que se pueden utilizar para llevar a cabo procesos de separación de tamaño secundarios simultáneos o posteriores.

5 Por ejemplo, si la sección de la matriz superior de un dispositivo ilustrado se puede utilizar para concentrar una mezcla compleja de componentes de ADN, entonces se puede utilizar una combinación de efectos electrocinéticos de CA y fuerzas electroforéticas de CC para lograr la separación secundaria de nanopartículas de ADN de alto peso molecular (5-50 kb), ADN de peso molecular intermedio (1-5 kb) y ADN de peso molecular inferior (0,1-1 kb).
10 Adicionalmente, las realizaciones ilustradas permiten que se utilice la microelectroforesis de CC dentro de las capas nanoporosas para llevar a cabo la separación por tamaño de los diversos fragmentos de ADN.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un nuevo dispositivo electrocinético de DEP en el que los electrodos se han colocado en cámaras separadas y se crean campos de DEP dentro de una cámara interior mediante el paso a través de estructuras de poros.

15 La Figura 2 muestra la geometría de los poros/agujeros de la superficie para el nuevo dispositivo DEP electrocinético mostrado en la Figura 1.

La Figura 3 muestra una disposición de electrodos construida de acuerdo con la invención, con un flujo de fluido ejemplar y una muestra indicada.

La Figura 4 ilustra la disposición de electrodos de la Figura 3 con electrodos pulsantes de acuerdo con la invención.

20 La Figura 5 muestra la disposición de electrodos de la Figura 3 con activación selectiva de electrodos para lograr mejores resultados de separación.

La Figura 6 muestra un esquema más detallado del proceso de separación de muestras de sangre, antes de que se aplique la electroforesis combinada de DEP de CA pulsada/electroforesis de CC/flujo fluido controlado.

25 La Figura 7 muestra una muestra de sangre en la fase inicial de electroforesis combinada de DEP de CA pulsada/electroforesis de CC/flujo de fluido controlado.

La Figura 8 muestra una muestra de sangre en la etapa final de electroforesis combinada de DEP de CA pulsada/electroforesis de CC/flujo de fluido controlado.

30 La Figura 9 muestra la DEP de CA pulsada y la electroforesis CC de materiales en nanopartículas de ADN teñidos con fluorescencia, ADN de muy alto peso molecular y selección y separación de ADN de peso molecular intermedio-bajo en la sección superior de la matriz.

La Figura 10 muestra la DEP de CA pulsada y la electroforesis CC de materiales en nanopartículas de ADN teñidos con fluorescencia combinada inicial, ADN de muy alto PM y selección de ADN de PM intermedio-bajo y separación en la sección superior de la matriz.

35 La Figura 11 muestra la DEP de CA pulsada y la electroforesis CC de materiales en nanopartículas de ADN teñidos con fluorescencia combinada final, la selección de ADN de muy alto PM-y-ADN de PM 10 intermedio y separación en secciones de la matriz superior.

La Figura 12 muestra la eliminación de materiales en nanopartículas de ADN y ADN de PM muy alto y separación por tamaño electroforético de CC en la matriz de los fragmentos de ADN de PM intermedio y bajo.

40 La Figura 13 muestra la DEP de CA pulsada inicial aplicada a glóbulos rojos y blancos en la sección de la matriz inferior del dispositivo.

La Figura 14 muestra la DEP de CA pulsada final aplicada a glóbulos rojos y blancos en la sección de la matriz inferior del dispositivo.

La Figura 15 muestra la DEP de CA pulsada inicial para la separación de bacterias, virus y nanovesículas en la sección de la matriz central del dispositivo.

La Figura 16 muestra la DEP de CA pulsada final para la separación de bacterias, virus y nanovesículas en la sección de la matriz central del dispositivo.

La Figura 17A-H muestra la separación por DEP de nanopartículas de 60 nm y 200 nm en condiciones de conductancia intermedia y alta.

- 5 La Figura 18A-D muestra la separación por DEP de nanopartículas de 200 nm en condiciones de conductancia intermedia y alta.

La Figura 19A-H muestra imágenes de intensidad fluorescente en 3D para la separación de DEP de nanopartículas de 60 nm y 200 nm en condiciones de conductancia intermedia y alta.

- 10 La Figura 20A-D muestra la imagen real e imágenes de intensidad en 3D para la separación de DEP de nanopartículas de 60 nm en condiciones de alta conductancia.

La Figura 21A-B muestra gráficas del aumento de la intensidad de fluorescencia de las nanopartículas frente al aumento de la conductancia para nanopartículas de 60 nm y 200 nm.

La Figura 22 muestra el gráfico de los resultados experimentales frente a las curvas de cruce de DEP teóricas para nanopartículas de 60 nm y 200 nm en función de la conductancia.

- 15 La Figura 23A-H muestra imágenes tanto reales como imágenes de intensidad en 3D para la separación por DEP de nanopartículas de 200 nm en electrodos de platino no recubiertos y recubiertos de hidrogel a conductancias crecientes (muestra el oscurecimiento del electrodo).

La Figura 24A-F muestra imágenes de microscopio óptico y SEM del daño del electrodo después de una DEP de alta conductancia sin nanopartículas presentes.

- 20 La Figura 25A-H muestra imágenes SEM de daño de electrodo y fusión de nanopartículas de 200 nm después de una DEP de alta conductancia.

La Figura 26A-C muestra imágenes fluorescentes y SEM de nanopartículas de 60 nm y el daño de electrodo tras una DEP de alta conductancia.

- 25 La Figura 27 muestra un proceso sin fisuras de muestra-a-respuesta de ADN de alto PM en sangre que comprende la etapa 1.

La Figura 28 muestra un proceso sin fisuras de muestra-a-respuesta de ADN de alto PM en sangre que comprende la etapa 2.

La Figura 29 muestra un proceso sin fisuras de muestra-a-respuesta de ADN de alto PM en sangre que comprende la etapa 3.

- 30 La Figura 30 muestra un proceso sin fisuras de muestra-a-respuesta de ADN de alto PM en sangre que comprende la etapa 4.

La Figura 31 muestra un proceso sin fisuras de muestra-a-respuesta de ADN de alto PM en sangre que comprende la etapa 5.

La Figura 32 muestra un proceso sin fisuras de muestra a respuesta con una muestra compleja.

- 35 La Figura 33 muestra un proceso sin fisuras de muestra de complejo de muestra a respuesta con PCR y análisis de inmunoensayo.

La Figura 34 muestra un proceso sin fisuras de muestra de complejo de muestra a respuesta con PCR y análisis de inmunoensayo y detección.

Descripción detallada

Este documento enseña sistemas dispositivos, métodos y técnicas nuevos de separación de muestras y de muestra a respuesta, que combinan electrocinética de CA multidimensional, incluyendo dielectroforesis (DEP), electroforética de CC, microelectroforesis y fluidos de formas únicas que pueden ser utilizados para separar e identificar células, nanovesículas y nanopartículas, bacterias y/o virus, así como un huésped de otros biomarcadores clínicamente relevantes de la enfermedad de volúmenes relevantes de muestras biológicas y clínicas de alta conductancia (fuerza iónica) y tampones, que incluyen, pero no se limitan a sangre, plasma, suero, orina, líquido linfático, saliva, muestras de biopsias, cultivos celulares (células madre), bacterias y cultivos de fermentación. Aun cuando las realizaciones descritas de la invención permiten llevar a cabo la separación por DEP de células, nanopartículas y otros analitos directamente en muestras no diluidas (sangre, plasma, tampones biológicos), las realizaciones no excluyen el uso de los dispositivos y métodos descritos para muestras o tampones parcialmente diluidos, o para muestras que han pasado por otros procedimientos de preparación de muestras.

El uso de nuevos dispositivos de cámaras múltiples y dispositivos de matriz de electrodos con electrodos robustos de diámetro y distancias de separación definidos permite llevar a cabo una DEP viable en soluciones de alta conductancia (fuerza iónica). Estos nuevos dispositivos de DEP están diseñados de tal manera que el burbujeo, el calentamiento y otros efectos adversos debidos a la electroquímica incrementada que se produce en condiciones de alta conductancia no reducen la eficiencia ni impiden la separación, concentración y detección de analitos o entidades específicos a partir de muestras biológicas complejas y tampones de alta fuerza iónica. La realización de separaciones por DEP en condiciones de alta conductancia ha sido un problema importante y una limitación para la mayoría de los dispositivos de separación electrocinéticos y dielectroforéticos de CA problemáticos [Ref. 1-28]. Incluso cuando se pudiera lograr un cierto grado de separaciones por DEP de alta conductancia durante un corto período de tiempo utilizando dispositivos de micromatrices con recubrimiento de hidrogel sobre los electrodos, tales dispositivos no eran viables como una herramienta de separación de muestras y dispositivo de diagnóstico [Ref. 13, 14, 24-28].

Para demostrar mejor esta limitación de conductancia de la DEP, un primer ejemplo inicial descrito en esta memoria muestra la separación por DEP de nanopartículas en un tampón de baja conductividad. Este ejemplo implica la separación de nanopartículas derivadas de ADN de 60 nm de partículas de 10 μm en agua MilliQ (5,5 $\mu\text{S}/\text{m}$). La separación se llevó a cabo a 10 kHz de CA a 10 voltios pico a pico (pk-pk). La Figura 17a muestra las condiciones iniciales bajo luz blanca antes de que se aplique el campo eléctrico de CA con una distribución aleatoria de las partículas de 10 μm sobre la matriz de microelectrodos. Las condiciones iniciales bajo la detección de fluorescencia roja muestran una neblina fluorescente roja a través de la micromatriz como sería de esperar de las nanopartículas fluorescentes derivadas de ADN de 60 nm (véase la Figura 17b). Después de haber aplicado el campo de DEP de CA durante solo 30 segundos, la mayoría de las partículas de 10 μm se han concentrado en disposiciones muy ordenadas en las regiones de campo bajo de DEP negativo (véase la Figura 17c). Después de una aplicación de 1 minuto del campo de CA, las nanopartículas derivadas de ADN de 60 nm se concentraron en las regiones de campo alto de DEP positivo sobre los microelectrodos (véase la Figura 17d). La alta intensidad de fluorescencia en los microelectrodos junto con la disminución de la intensidad de fluorescencia en las áreas circundantes indica que la mayoría de las nanopartículas se han concentrado en las regiones de alto campo. El siguiente ejemplo muestra la separación de DEP de nanopartículas de 200 nm mezcladas con partículas de 10 μm en 0,01x TBE (1,81 mS/m) llevada a cabo a una CA de 3 kHz a 10 voltios pk-pk. La vista inicial de luz blanca muestra una distribución aleatoria de las partículas de 10 μm antes de que se aplique el campo (Figura 17e), y la vista de fluorescencia verde no muestra acumulación alguna de las nanopartículas de 200 nm en las regiones de campo alto (Figura 17f). En menos de 10 minutos, las partículas de 10 μm se concentran en las regiones de campo bajo (Figura 17g), y las nanopartículas de 200 nm se concentran altamente en las regiones de campo alto DEP positivas (Figura 17h). Estos resultados de DEP de baja conductividad son generalmente consistentes con otras separaciones de nanopartículas de DEP de baja conductividad citadas en la bibliografía, y se esperan de la teoría clásica de DEP [Ref. 11-14].

El siguiente conjunto de ejemplos de DEP muestra las separaciones de nanopartículas derivadas de ADN de 60 nm, nanopartículas de 200 nm y partículas de 10 μm en soluciones tampón con conductividades superiores a 100 mS/m. Para 1x TBE (0,109 S/m), después de aplicar el campo de CA durante 20 minutos, la separación entre nanopartículas de 200 nm y partículas de 10 μm en condiciones de luz blanca mostró partículas de 10 μm concentradas en las regiones del campo bajo (Figura 18a). Bajo fluorescencia verde, las nanopartículas de 200 nm se concentraron en las regiones del campo alto de DEP positivo en la parte superior de los microelectrodos (Figura 18b). Para los experimentos de DEP llevados a cabo en 1x PBS (1,68 S/m), después de 20 minutos las partículas de 10 μm se concentran en las regiones de campo bajo (Figura 18c). La imagen de fluorescencia verde de 20 minutos para el experimento de tampón 1x PBS de alta conductancia se tomó después de la eliminación de algunas burbujas pequeñas y con una ganancia aumentada (Figura 18d). La imagen muestra que las nanopartículas de 200 nm se han concentrado en las regiones del alto campo de DEP positivas de cuatro microelectrodos. Los microelectrodos, sin embargo, muestran ahora un oscurecimiento significativo y dos de los microelectrodos han burbujeado. La

observación de que las nanopartículas de 200 nm se han concentrado predominantemente en estos cuatro microelectrodos es consistente con el hecho de que producen campos ligeramente más altos.

Los experimentos de alta conductancia en tampón 1x PBS que se llevaron a cabo utilizando nanopartículas derivatizadas de ADN de 60 nm también proporcionaron resultados similares, es decir, debido a que aún se observaba que las nanopartículas de 60 nm se concentraban en las regiones del campo alto de DEP positivas sobre tres de los microelectrodos. Se realizó un análisis adicional de las imágenes de fluorescencia en un modelo matemático utilizando MATLAB para producir picos tridimensionales, que demuestran mejor la concentración de las nanopartículas fluorescentes sobre las regiones de alto campo. Para los experimentos en 1x TBE con nanopartículas derivatizadas de ADN de 60 nm, los datos de fluorescencia en 3D mostraron un aumento significativo desde los momentos 0 minutos (Figura 19a), 2 minutos (Figura 19b), 8 minutos (Figura 19c) y 16 minutos (Figura 19d). De manera similar, los datos de fluorescencia en 3D para las nanopartículas de 200 nm en 1x PBS mostraron también un incremento desde los momentos 0 minutos (Figura 19e), 8 minutos (Figura 19f), 16 minutos (Figura 19g) y después de 20 minutos (Figura 19h).

Para las nanopartículas derivatizadas de ADN de 60 nm en 1x PBS, todavía hay concentración tal como se ve en la imagen fluorescente (Figura 20a). Los datos de imágenes fluorescentes en 3D también muestran un aumento de fluorescencia similar de 0 minutos (Figura 20b), a 8 minutos (Figura 20c) y a 20 minutos (Figura 20d). Debido a la activación de uno de los microelectrodos (tercera fila, segunda columna) mostrada en la Figura 20a, el patrón del campo eléctrico se altera ligeramente. Los datos globales de fluorescencia se compilaron utilizando MATLAB para experimentos en tampones de 1x TBE, 0,1x PBS (0,177 S/m) y 1x PBS en los momentos de 0, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16 y 20 minutos. Los resultados para las nanopartículas derivatizadas de ADN de 60 nm se muestran en el gráfico (Figura 21a), y los resultados para las nanopartículas de 200 nm se muestran en el gráfico (Figura 21b). Estos ejemplos muestran un aumento en la concentración de las nanopartículas fluorescentes a lo largo del tiempo. Más importante aún, estos ejemplos también muestran una disminución significativa en la concentración global de las nanopartículas fluorescentes a medida que aumenta la conductividad de los tampones, es decir, se necesita un tiempo mucho más largo para concentrar las entidades en las condiciones de conductancia más altas.

La Figura 22 muestra ahora las curvas teóricas y los intervalos para los resultados experimentales para la parte real del factor de Clausius-Mossotti ($\text{Re}(K(\omega))$) frente a la conductividad para las nanopartículas derivatizadas de ADN de 60 nm y las nanopartículas de 200 nm. El gráfico indica que los valores de $\text{Re}(K(\omega))$ teóricos deberían ser negativos para las conductividades utilizadas en estos ejemplos y, por lo tanto, las nanopartículas deberían haberse acumulado en las regiones del campo bajo. No obstante, los resultados reales muestran que la acumulación de nanopartículas continúa en la región del campo alto. Desafortunadamente, bajo estas condiciones de alta conductancia, se producen burbujas (> 100 mS/M), un oscurecimiento del electrodo y fallos del electrodo, y se requieren tiempos de DEP mucho más largos que producen separaciones relativamente ineficientes.

Se ha descubierto que estos efectos adversos relacionados con la DEP se deben a la actividad electroquímica incrementada que se produce cuando se utilizan tampones de mayor fuerza iónica que contienen electrolitos de sodio (Na^+) y cloruro (Cl^-) [Ref. 29-30]. Fue necesaria una mejor comprensión de estos efectos para desarrollar dispositivos de DEP más viables y robustos para aplicaciones de diagnóstico molecular. Ejemplos adicionales demuestran claramente las interacciones adversas de microelectrodo/nanopartícula/electrolito en condiciones de alta conductancia en los ejemplos descritos en esta memoria. Estos ejemplos implicaron llevar a cabo la separación y detección de nanopartículas de poliestireno fluorescentes de color verde amarillo de 200 nm a partir de esferas de 10 micras en diferentes condiciones de conductancia (fuerza iónica), en estructuras de microelectrodos de platino con hidrogeles (Figuras 23 A-F) y sin capas de hidrogel (Figuras 23 G-H). Los resultados para todos los tampones (0,01x TBE, 1x TBE, 1x PBS) muestran la separación y concentración de las nanopartículas verdes fluorescentes de 200 nm en las regiones del campo alto de DEP sobre los microelectrodos, y la concentración de las esferas de 10 μm en las regiones del campo bajo entre los microelectrodos. Nuevamente, la concentración de nanopartículas de 200 nm parece ser la más alta para 0,01x TBE y disminuye a medida que aumenta la fuerza iónica del tampón a 1x PBS (véanse las Figuras 23B, 23D, 23F y 23H). La concentración de nanopartículas se produce más en el centro de los microelectrodos con hidrogeles, y en el perímetro exterior de los microelectrodos sin recubrimiento (Figuras 23A, 23C, 23E, 23G). A la conductancia del tampón más alta (1x PBS), tanto los microelectrodos recubiertos con hidrogel (Figura 23E) como los microelectrodos sin recubrimiento muestran un oscurecimiento significativo de los electrodos (Figura 23G).

Aunque no se muestra en estas figuras, también se observó un micro-burbujeo incrementado en el tampón 1x PBS tanto en los microelectrodos recubiertos de hidrogel como en los no recubiertos después de cuatro minutos de DEP. No obstante, el micro-burbujeo apareció más pronunciado en los microelectrodos no recubiertos. También, en tampón 1x PBS, se produce un burbujeo caótico en casi todos los electrodos cuando la tensión de CA aumenta por encima de 20 voltios pt-pt. Mientras que la concentración de nanopartículas y el oscurecimiento se podían observar tanto en el recubrimiento de hidrogel como en los microelectrodos de platino no recubiertos, los microelectrodos no

recubiertos proporcionaron una oportunidad de utilizar microscopía electrónica de barrido (SEM) para analizar los efectos electroquímicos y verificar la concentración y adhesión de las nanopartículas.

En el siguiente conjunto de ejemplos se llevó a cabo una DEP en tampón 1x PBS de alta conductividad en microelectrodos no recubiertos sin nanopartículas presentes. La matriz de microelectrodos se lavó, se secó y luego se tomó una imagen utilizando SEM. La Figura 24A muestra primero las imágenes de microscopio óptico de un microelectrodo de control no activado, y un microelectrodo activado (Figura 24B) después de 10 minutos de DEP a 3000 Hz, 10 voltios pk-pk. Se observa claramente un oscurecimiento significativo del microelectrodo activado. Las Figuras 24C y 24D muestran ahora las imágenes SEM de los mismos microelectrodos no activados y activados. El daño significativo y la degradación del microelectrodo activado se observan claramente en la imagen SEM. Las Figuras 24E y 24F son imágenes SEM de mayor aumento de los microelectrodos, y muestran incluso más claramente la degradación de la capa de platino que se ha producido alrededor del perímetro del microelectrodo (Figura 24F).

Se llevaron a cabo ejemplos similares de DEP en tampón 1x PBS de alta conductancia con las nanopartículas de 200 nm presentes. La Figura 25A muestra primero imágenes SEM del microelectrodo de control no activado después de dos minutos de DEP a 3000 Hz, 10 voltios pk-pk en tampón 1x PBS de alta conductividad. El microelectrodo de control sin activación muestra solo unas pocas nanopartículas de 200 nm distribuidas al azar por la estructura. La Figura 25B muestra una imagen SEM de mayor aumento del borde de un microelectrodo de control, en donde algunas nanopartículas aparecen atrapadas al azar en la zona entre el borde del microelectrodo de platino. La Figura 25C muestra la imagen SEM de un microelectrodo, que se activó durante 2 minutos con las nanopartículas de 200 nm presentes. Un gran número de nanopartículas se han concentrado y adherido al microelectrodo, especialmente en los bordes. La imagen de primer plano (Figura 25D) muestra mucho mejor los racimos concentrados de nanopartículas e indica una cierta degradación del platino en el borde del microelectrodo. Las figuras 25E y 25F muestran ahora imágenes de un microelectrodo activado después de 5 minutos de DEP con nanopartículas de 200 nm. Nuevamente, se observa claramente la concentración y el agrupamiento de las nanopartículas de 200 nm, pero la estructura del microelectrodo de platino aparece ahora más dañada y degradada. La Figura 25G es una imagen SEM de mayor aumento del borde del microelectrodo de la Figura 25D, mostrando nuevamente el agrupamiento de las nanopartículas. Finalmente, la Figura 25H es una imagen de mayor aumento del microelectrodo degradado (visto en la Figura 25F), que muestra los racimos de nanopartículas entremezclados con racimos fusionados o fundidos de nanopartículas. Estos racimos fusionados de nanopartículas son los resultados de la actividad electroquímica agresiva (calor, H^+ y OH^-) en los tiempos de activación de la DEP más largos.

Otro conjunto de ejemplos implicó llevar a cabo la separación por DEP y la detección de nanopartículas fluorescentes rojas de 40 nm de esferas de 10 micras en tampón 1x PBS de alta conductancia en estructuras de microelectrodos sin un hidrogel. La Figura 26A es una imagen fluorescente roja del microelectrodo antes de la activación por DEP que no muestra concentración de las nanopartículas de 40 nm. La Figura 26B es la imagen fluorescente roja del microelectrodo después de la activación por DEP durante 4 minutos a 10.000 Hz, 10 voltios pk-pk, que ahora muestra claramente la concentración de nanopartículas de 40 nm en el perímetro de los microelectrodos. La Figura 26C es una imagen de gran aumento de SEM que muestra el microelectrodo dañado y el agrupamiento de las nanopartículas de 40 nm.

Estos ejemplos demuestran claramente que se está produciendo una actividad electroquímica incrementada cuando la DEP se lleva a cabo en condiciones de alta conductancia (> 100 mS/m). Esta electroquímica muy agresiva provoca un micro-burbujeo y un oscurecimiento de los microelectrodos. Más importante aún, demuestra que se está produciendo una degradación significativa del microelectrodo, lo que en última instancia conduce a un fallo del electrodo, y demuestra que la destrucción de este microelectrodo aumenta a medida que aumenta el tiempo de activación por DEP. El hecho de que se observó una fusión de las nanopartículas de poliestireno en las estructuras de microelectrodos degradadas sugiere que se está produciendo un calentamiento significativo, a pesar de que la DEP es un proceso electrocinético de CA. Estos resultados pueden atribuirse a reacciones de electrólisis de CC que producirían O_2 , H_2 , H^+ , OH^- , calor y burbujas. La presencia de electrolitos de sodio (Na^+), potasio (K^+) y cloruro (Cl^-) en el tampón 1x PBS también puede contribuir a las condiciones generales de corrosión presentes en las superficies de microelectrodos durante la DEP. Además de la alta conductancia, la mayoría de las muestras biológicas y clínicas y tampones tienen concentraciones relativamente altas de sodio (Na^+), potasio (K^+) y cloruro (Cl^-). Estos resultados dejan claro de inmediato por qué la DEP clásica, que utiliza electrodos de oro pulverizado menos robustos, solo podría llevarse a cabo en condiciones de baja conductancia (Ref. 29, 30), es decir, los electrodos se destruirían en segundos.

Aunque los microelectrodos de platino recubiertos con hidrogel permiten la separación de nanopartículas en condiciones de alta conductancia, no obstante son inadecuados para cualquier aplicación práctica por las siguientes razones. En primer lugar, el burbujeo aleatorio pronunciado y el fallo del electrodo harían que el dispositivo en sí no fuera fiable para que cualquier tipo de muestra responda a los diagnósticos moleculares utilizando sangre. En experimentos adicionales que implican la separación de nanopartículas de la capa leucocitaria y sangre entera, se

observaron un burbujeo, un oscurecimiento del electrodo y un fallo del electrodo. Si bien las nanopartículas se podían aislar en las regiones de campo alto, eran difíciles de separar mediante lavado con fluidos, lo que indica que un calentamiento adverso puede haberlas fusionado a la superficie de la matriz. En segundo lugar, para separaciones de muestras biológicas y análisis moleculares subsiguientes (p. ej., PCR, inmunoensayo, etc.), este calentamiento y la electroquímica agresiva serían muy dañinos para las células, el ADN, las proteínas y la mayoría de los otros analitos. En tercer lugar, con el fin de mejorar la eficiencia de separación (aumentar la cantidad total de analito concentrado), se requerirían tiempos de DEP más largos, lo que produciría efectos aún más adversos. En cuarto lugar, si se utilizan tensiones de CA más altas (p. ej., 20 voltios pt-pt) para aumentar la velocidad de concentración, esto también provocaría incluso más efectos de burbujeo y electroquímica. Este descubrimiento de las razones subyacentes de las limitaciones para dispositivos de DEP clásicos y de conductancia proporciona ahora la oportunidad de crear dispositivos de preparación de muestras por DEP más viables y nuevos sistemas de diagnóstico "sin interrupciones" de muestra a respuesta. Estos nuevos dispositivos de DEP permitirán que células raras, nanopartículas y una diversidad de biomarcadores de enfermedades importantes se aislen, concentren y detecten directamente en sangre, plasma, suero y en la mayoría de las otras muestras biológicas y tampones.

La siguiente descripción describe una combinación de fuerzas electrocinéticas/dielectroforéticas (DEP) continuas y/o pulsadas, fuerzas electroforéticas de CC continuas y/o pulsadas, separación por tamaño microelectroforética en el dispositivo (en la matriz) y flujo de fluido controlado (externamente bombeado y/o accionado por electrocinética CC/CA) junto con los nuevos dispositivos de esta memoria descriptiva que se pueden utilizar para llevar a cabo la preparación de muestras complejas, lo que conduce a la separación y concentración de analitos específicos y a los posteriores análisis y detección de diagnóstico molecular. Esto puede incluir, pero no se limita a (1) tanto la separación como detección por DEP de analitos marcados y/o la detección posterior de analitos no marcados después de la separación por DEP, utilizando técnicas de inmunoquímica y de unión de ligandos que incluyen anticuerpos fluorescentes, anticuerpos no fluorescentes, nanopartículas derivatizadas de anticuerpos, microesferas derivatizadas de anticuerpos, superficies derivatizadas de anticuerpos (sitios específicos en el dispositivo de DEP), biotina/estreptavidina y diversas lectinas; (2) el uso pre-DEP o post-DEP de tinciones de color generales y/o específicas, colorantes fluorescentes, nanopartículas fluorescentes, puntos cuánticos para detectar células específicas, bacterias, virus, ADN, ARN, núcleos, membranas, orgánulos celulares y materiales en nanopartículas celulares (es importante tener en cuenta que la DEP es intrínsecamente una técnica de "marcar menos" y que las células, las nanopartículas y otros analitos pueden identificarse por sus frecuencias de cruce; el marcaje se utiliza para aumentar la sensibilidad de detección, identificar entidades individuales y llevar a cabo un análisis más detallado); y (3) el análisis posterior de células, núcleos, ADN y ARN por hibridación in situ con sonda fluorescente (FISH, etc.); y (4) el uso de métodos de análisis molecular bien conocidos para células, núcleos, ADN y ARN que incluyen, entre otros, PCR, RCA, SDA y otras técnicas de genotipificación, secuenciación y expresión génica - todas las cuales pueden llevarse a cabo en el mismo compartimiento de cámara en el que se ha producido la separación por DEP.

Los ejemplos anteriores no excluyen llevar a cabo análisis posteriores en otra cámara separada del dispositivo o el traslado de los analitos a un o unos tubos de recogida de muestras para el análisis, almacenamiento o archivo de muestras fuera del dispositivo. Adicionalmente, otros tipos de técnicas de detección que pueden utilizarse para el análisis incluyen, pero no se limitan a radioisótopos, colorimetría, quimioluminiscencia, métodos electroquímicos u otros métodos para la biosensibilidad o nanosensibilidad de los analitos, biomoléculas y células una vez que han sido aislados. Los dispositivos y procesos descritos en esta memoria se pueden considerar como un verdadero sistema de diagnóstico de muestra a respuesta "sin interrupciones" que se puede utilizar directamente con sangre no diluida u otras muestras clínicas o biológicas complejas. El proceso de muestra a respuesta sin interrupciones utilizando los dispositivos de DEP a modo de ejemplo en esta memoria se describe a continuación con más detalle.

La Figura 27 muestra la primera etapa en el diagnóstico de muestra a respuesta sin interrupciones, en donde una muestra de sangre se aplica directamente al dispositivo y se utiliza la DEP para llevar a cabo, en este caso, la separación de una concentración muy baja de ADN y/o ARN de alto peso molecular (hmw) de la muestra de sangre entera no diluida. Sin embargo, se debe tener en cuenta que podría separarse, concentrarse y detectarse casi cualquier analito que incluya, pero no se limite a células raras, nanopartículas, materiales en nanopartículas celulares, anticuerpos, inmunocomplejos, proteínas y ARN; y las muestras pueden incluir, pero no se limitan a plasma, suero, orina y saliva.

La Figura 28 muestra la segunda etapa en un proceso de diagnóstico de muestra a respuesta en el que el campo de DEP se aplica ahora a la frecuencia de CA adecuada y a la tensión que provoca que las células de la sangre (rojas y blancas) se muevan a regiones de bajo campo (DEP) negativas, y el ADN (ARN) de hmw se concentre en las regiones de alto campo (DEP) positivas (en el dibujo, las estructuras de bóveda representan las zonas de alta intensidad de campo de DEP).

La Figura 29 muestra la tercera etapa, en donde se utiliza un lavado fluido simple para separar las células de la sangre del dispositivo de matriz de DEP, mientras que el ADN (ARN) de hmw permanece altamente concentrado en

las regiones de alto campo de DEP. También está dentro del alcance de esta divulgación el uso de un flujo fluido continuo, pulsado o intermitente a través del dispositivo de DEP con el fin de procesar un mayor volumen de muestra y como un mecanismo para reducir el calentamiento, que es más pronunciado en soluciones de mayor conductancia. a frecuencias de CA más bajas (< 20 kHz) y a tensiones altas (> 20 voltios pt-pt).

5 La Figura 30 muestra el siguiente paso en el proceso, que implica el marcaje in situ del ADN (ARN) mediante la adición de un colorante fluorescente específico para ADN (ARN) (p. ej., CyberGreen, OliGreen, bromuro de etidio, TOTO, YOYO, naranja de acridina, etc.). En este proceso, una solución del colorante fluorescente apropiado se descarga a través del dispositivo de DEP para teñir el ADN o ARN. El ADN/ARN se puede mantener en su lugar manteniendo el campo de DEP mientras la tinción está en progreso. El ADN/ARN teñido fluorescente se puede
10 detectar y cuantificar ahora utilizando un sistema de detección epifluorescente (Figura 31). Sistemas y dispositivos de detección fluorescentes son bien conocidos en la técnica de la biología molecular y el diagnóstico clínico para el análisis de dispositivos de micromatrices, y una diversidad de sistemas está disponible comercialmente.

También está dentro del alcance de esta divulgación: (1) utilizar otros métodos y técnicas de detección de análisis molecular que incluyen, pero no se limitan a la PCR, la PCR en tiempo real con balizas moleculares, RCA y SDA; (2)
15 para hibridar la muestra de ADN/ARN durante el proceso de separación de DEP para capturar sondas (ADN, ARN, pNA, etc.) inmovilizadas en sitios específicos en el dispositivo de DEP para su posterior análisis/detección utilizando sondas informadoras fluorescentes; (3) para liberar el ADN/ARN de los sitios de concentración de DEP, amplificarlo utilizando PCR, RT-PCR, RCA o SDA, desnaturalizar y luego utilizar la electroforesis de CC selectiva para re-hibridar los amplicones para capturar las sondas inmovilizadas en el dispositivo DEP para el posterior análisis/detección
20 utilizando sondas informadoras fluorescentes; (4) utilizar hibridación in situ fluorescente con sondas de ADN/ARN/pNA específicas para la secuencia; (5) para liberar el ADN/ARN y transportarlo por DEP o por electroforesis (campos de CC) a otra ubicación específica en el dispositivo; y (6) para liberar el ADN/ARN y moverlo (por flujo de fluido) a otra cámara del dispositivo o a un tubo de recogida de muestras para su posterior análisis o almacenamiento.

25 La Figura 32 muestra cómo se puede utilizar el dispositivo de muestra a respuesta para llevar a cabo más separación por DEP multiplex de células raras, bacterias, virus, nanopartículas celulares o CNPs (membrana celular, núcleos, ADD de hmw, ARN de hmw, vacuolas, retículo endoplásmico, mitocondrias, etc.), proteínas, complejos de anticuerpos y otros biomarcadores de la sangre entera. La Figura 33 muestra los métodos de análisis molecular que ahora se pueden utilizar para identificar los analitos específicos que se han concentrado en el dispositivo; estos
30 métodos incluyen, pero no se limitan a tinción fluorescente, inmunoensayo fluorescente, FISH y procedimientos de PCR, RCA y SDA. Finalmente, la Figura 34 muestra la detección final de células, bacterias, virus, CNPs y complejos de anticuerpos utilizando técnicas fluorescentes bien conocidas y otras técnicas de detección.

Esta divulgación describe además métodos únicos que pueden utilizarse para potenciar la capacidad analítica y de diagnóstico de los dispositivos y sistemas de muestra a respuesta descritos en esta memoria. En el caso del
35 aislamiento y la detección de ADN y ARN, mientras que la DEP se puede utilizar para aislar y concentrar de manera eficiente el ADN/ARN de hmw, ADN y ARN de peso molecular más bajo (<10 kb) son más fáciles de aislar por DEP. En este caso, se encuentran disponibles anticuerpos específicos para ADN-ds de doble cadena y anticuerpos específicos para ADN-ss de cadena sencilla que se pueden utilizar para marcar el ADN y el ARN de peso molecular más bajo, creando nanoestructuras más grandes (> 5 nm). Estos complejos de ADN-anticuerpo más grandes se
40 pueden aislar y concentrar más eficazmente por DEP.

Adicionalmente, se puede habilitar una diversidad de nuevos ensayos de anticuerpos utilizando los dispositivos descritos en esta memoria. Más específicamente, la capacidad de DEP para separar anticuerpos individuales de complejos de anticuerpos más grandes significa que se pueden desarrollar numerosos ensayos de anticuerpos
45 simples y dobles en los que la formación del complejo anticuerpo-antígeno más grande se puede separar de la muestra clínica mediante DEP. En estos casos, los anticuerpos fluorescentes y/o los anticuerpos secundarios podrían añadirse directamente a la muestra, se aplica DEP y solo los complejos de anticuerpo-antígeno marcados de forma fluorescente se concentrarían en las regiones de alto campo de la DEP para la detección posterior. Dichos ensayos de anticuerpos basados en DEP pueden utilizarse para antígenos de moléculas pequeñas que incluyen, pero no se limitan a fármacos, hormonas, metabolitos y péptidos; así como para antígenos más grandes que
50 incluyen, pero no se limitan a proteínas, enzimas y otros anticuerpos. También está dentro del alcance de esta descripción permitir muchos otros ensayos de DEP similares que se basan en la formación de complejos más grandes, que incluyen, pero no se limitan a la detección de bacterias, virus, bacteriófagos, nanopartículas, CNPs que utilizan la unión selectiva de ligandos con anticuerpos, biotina/estreptavidina, lectinas, proteínas, enzimas, péptidos, dendrímeros, apatámeros, puntos cuánticos, nanopartículas fluorescentes, nanotubos de carbono y otras
55 nanoentidades diseñadas para el marcaje selectivo y fines de detección. Finalmente, además de fijar o inmovilizar sondas de captura de ADN/ARN/pNA en el dispositivo de DEP, también se puede fijar otras entidades de unión al dispositivo de DEP, incluyendo, pero no limitados a anticuerpos, biotina/estreptavidina, lectinas, proteínas, enzimas,

péptidos, dendrímeros y apatámeros. Ligandos inmovilizados de este tipo proporcionarán la unión selectiva de analitos al dispositivo de DEP, después de haber desconectado el campo de la DEP.

5 Se debe señalar que los nuevos dispositivos de DEP descritos en esta memoria permiten ahora todos estos métodos por el hecho de que estos nuevos dispositivos de DEP eliminan o reducen en gran medida los efectos adversos de burbujeo, calentamiento y electroquímica que de otra manera dañarían o destruirían a la mayoría de las biomoléculas (p. ej., ADN, ARN, anticuerpos, proteínas, etc.) que se utilizan para la inmovilización, así como los analitos y biomarcadores que se aíslan y concentran en sitios específicos de alto campo de la DEP en el dispositivo para detección y análisis.

10 Como un ejemplo, esta primera especificación describe con mayor detalle nuevos dispositivos y sistemas electrocinéticos de DEP, en los que los electrodos se colocan en cámaras separadas y se crean regiones de DEP positivas y regiones de DEP negativas dentro de una cámara de muestras interna mediante el paso del campo de DEP de CA a través de poros o estructuras de agujeros. Se pueden utilizar diversas geometrías para formar las regiones de DEP positivas (campo alto) y las regiones de DEP negativas (campo bajo) deseadas para llevar a cabo separaciones de células, nanopartículas y biomarcadores con la cámara de muestra. Dichas estructuras de poros o agujeros se pueden rellenar con un material poroso (agarosa o hidrogeles de poliacrilamida) o se pueden cubrir con estructuras del tipo de membrana porosa (papel, celulosa, nilón, etc.). Dichas estructuras de recubrimiento de membrana porosa pueden tener espesores de una micra a un milímetro, pero más preferiblemente de 10 micras a 15 100 micras; y tamaños de poros que varían de un nanómetro a 100 micras, pero más preferiblemente de 10 nanómetros a una micra. Al segregarse los electrodos en cámaras separadas, estos dispositivos de DEP únicos eliminan básicamente cualquier efecto electroquímico, el calentamiento o el movimiento fluido caótico que influye en las separaciones de analitos que se producen en la cámara de muestras interna durante el proceso de DEP. Estos dispositivos de cámara pueden funcionar a tensiones de CA muy altas (> 100 voltios pt-pt), y además de la DEP, también se pueden utilizar para llevar a cabo el transporte electroforético de CC y electroforesis en la cámara de muestras. En general, estos dispositivos y sistemas pueden funcionar en el intervalo de frecuencias de CA de 1000 Hz a 100 mHz, a tensiones que pueden variar desde 1 voltio a 2000 voltios pt-pt; y tensiones de CC de 1 voltio a 25 1000 voltios, a caudales de 10 microlitros por minuto a 10 mililitros por minuto y en intervalos de temperaturas de 1°C a 100°C. Los dispositivos de cámara se muestran en la Figura 1 y la Figura 2. Dichos dispositivos pueden crearse con una diversidad de estructuras de poros y/o agujeros (a nanoescala, microescala e incluso macroescala) y pueden contener membranas, geles o materiales filtrantes que pueden controlar, confinar o evitar que células, nanopartículas u otras entidades se difundan o sean transportadas a las cámaras internas. Sin embargo, los campos eléctricos de CA/CC, las moléculas de soluto, el tampón y otras moléculas pequeñas pueden pasar a través de las cámaras. 30

35 Como un ejemplo, las figuras 1 y 2 representan una versión más básica de los dispositivos de cámara. Dispositivos de este tipo incluyen, pero no se limitan a dispositivos de electrodos multiplexados y de cámara, dispositivos que permiten crear patrones de campo eléctrico reconfigurables, dispositivos que combinan procesos electroforéticos y fluidos de CC; dispositivos de preparación de muestras, dispositivos de preparación y diagnóstico de muestras que incluyen detección y análisis posteriores, dispositivos de laboratorio en chip, puntos de atención y otros sistemas o versiones de diagnóstico clínico. La Figura 1 es un diagrama esquemático de un dispositivo de procesamiento de muestras construido de acuerdo con las enseñanzas de esta memoria y muestra que el dispositivo 100 incluye una pluralidad de electrodos 102 y cámaras 104 que contienen electrodos dentro de un alojamiento 106. Un controlador 40 108 del dispositivo controla independientemente los electrodos 102 tal como se describe adicionalmente en esta memoria.

45 La Figura 2 muestra una vista en planta del dispositivo 100 que se ilustra con seis cámaras 104 de electrodos, cada una de las cuales tiene al menos un electrodo de platino robusto. La Figura 2 muestra el dispositivo configurado con una cámara de separación central principal 110, que tiene una disposición de dieciocho estructuras de poros/agujeros 112 de tamaño variable que están llenas de un hidrogel (la cámara interior también podría tener una membrana porosa que cubre los poros o agujeros). Las estructuras de poros/agujeros están dispuestas en tres grupos de seis estructuras de poros/agujeros. Mientras que la parte superior de la cámara de separación 110 no tiene separaciones físicas, la parte inferior está dividida en nueve compartimientos separados (indicados por la línea discontinua). Cada uno de estos compartimientos está en contacto fluido con una cámara de electrodos, pero no entre sí. Cuando se aplica un campo de DEP de CA a los electrodos, el campo pasa a través de los poros 112, creando regiones de campo alto de DEP positivas en la parte superior de las estructuras de poros y regiones de campo bajo de DEP negativas entre las estructuras de poros. Las muestras pueden añadirse y retirarse del dispositivo a través de la entrada 220 y la salida 222. El dispositivo puede tener entradas 224 y salidas 226 50 adicionales. El dispositivo que se muestra en las Figuras 1 y 2 representa solo una forma de un dispositivo de cámaras de DEP de alta conductancia; se debe entender que se puede crear un gran número de diferentes tipos de dispositivos con un mayor número de poros/agujeros y diferentes geometrías. 55

Otra realización del dispositivo implica el uso de matrices de electrodos con electrodos robustos de diámetro definido y distancias de separación que permitirán menos efectos electroquímicos y calentamiento, lo cual es un problema en los actuales dispositivos de separación electrocinéticos y dielectroforéticos. La construcción adecuada y el recubrimiento de electrodos robustos (p. ej., platino, paladio y oro) pueden reducir los efectos adversos de los productos electroquímicos en el proceso de separación y permitir que se apliquen tensiones mucho más altas, lo cual puede mejorar considerablemente los tiempos de separación. También, los dispositivos actuales tienen un rendimiento relativamente bajo y estas realizaciones descritas en esta memoria han superado ese problema al proporcionar un sistema que utiliza matrices de secciones paralelas multiplexadas y que permite que el dispositivo se utilice como una gran zona de separación y luego se cambie a zonas de separación controladas por separado, lo cual resulta en una sensibilidad y selectividad incrementadas del sistema global. Un tercer problema observado en otros sistemas convencionales es la incapacidad de separar los componentes de la muestra que son relativamente similares en tamaño y composición. Este problema se resuelve de acuerdo con la descripción de esta memoria al proporcionar un dispositivo que puede llevar a cabo procesos de separación secundarios tales como microelectroforesis, directamente en el dispositivo de matriz de DEP propiamente dicho.

Las fuerzas dielectroforéticas (DEP) negativas son relativamente más débiles que las fuerzas DEP positivas; por lo tanto, las entidades que experimentan DEP negativa pueden ser movidas por el flujo de fluidos, mientras que las entidades que experimentan DEP positiva permanecerán en su lugar. En las realizaciones actualmente descritas, mediante el uso de fuerzas electroforéticas tanto de fluido como de CC en direcciones opuestas, los fragmentos de ADN y las nanopartículas de ADN altamente cargadas se pueden separar de las células y proteínas en la sangre y otras muestras. De esta manera, al utilizar múltiples frecuencias de CA, electroforesis de CC pulsada y microelectroforesis, se puede lograr una separación por tamaños más completa de materiales en nanopartículas de ADN y fragmentos de ADN.

Los usos comerciales de tales sistemas y dispositivos nuevos que ahora permiten que se lleve a cabo la DEP en condiciones de alta conductancia (sangre, plasma, suero, etc.) probablemente incluirán numerosas investigaciones y aplicaciones de diagnóstico clínico, tales como los diagnósticos en puntos de atención, terapias y vigilancia de fármacos, vigilancia ambiental y de suministro de agua, y detección de agentes de bioterror. Numerosos analitos y entidades tales como células raras (células cancerosas, células fetales, células madre hematopoyéticas), bacterias, virus, ADN/ARN y biomarcadores de nanopartículas de ADN, nanovesículas de administración de fármacos, así como proteínas normales o aberrantes, se pueden detectar usando un sistema de este tipo.

Se construyó un sistema experimental de separación electroforética DEP de CA y CC (una versión de mesa de laboratorio descrita más adelante en la Sección Experimental) y se llevaron a cabo experimentos para refinar los nuevos prototipos de dispositivos. Los resultados obtenidos en estos dispositivos (que se describen arriba) conducen al importante descubrimiento de por qué la DEP clásica se ha limitado a soluciones de baja conductancia.

Ahora, nuevos dispositivos que utilizan matrices de electrodos de platino planas, paralelas y robustas con electrodos de aproximadamente 1-1000 micras de diámetro con una distancia de separación de 10 a 5000 micras y recubiertos con un hidrogel de 5-100 micras de espesor (agarosa, poliacrilamida) o capa(s) de membrana porosa(s), permiten tener menos problemas de calentamiento y electroquímica, dado que las líneas de campo eléctrico no están tan altamente concentradas como lo están en otros sistemas de DEP convencionales clásicos, y lo que es más importante, la región de acumulación de DEP de alto campo está ahora a una cierta distancia de la superficie real del electrodo. Una diferencia significativa con respecto a los diseños de electrodos anteriores es que no se utilizan electrodos de platino o de oro pulverizados, que se degradan y destruyen fácilmente con la electroquímica, particularmente a intensidades de campo más altas y alta conductancia de la solución. Los electrodos para los nuevos dispositivos se construirán a partir de materiales sólidos de platino u oro, incluidos cables o varillas. Una segunda diferencia es que la eficiencia de separación para aislar una entidad única de un millón de entidades relativamente similares (células, nanopartículas, biomarcadores) puede mejorarse cambiando el problema de una separación grande a la de muchas separaciones separadas que son mucho más controlables. Los dispositivos descritos en esta memoria logran esto mediante el uso de matrices de secciones multiplexadas y un proceso de clasificación paralelo controlado. Esto se logra mediante el uso de subconjuntos de matrices controlados individualmente de 10 a 100 o más electrodos en un dispositivo de matriz grande que permite que una muestra biológica compleja (sangre) sea distribuida a través del dispositivo de matriz, separando los componentes en secciones de separación más pequeñas (zonas) para la separación y el aislamiento adicional de los analitos o entidades deseados. Reducir el complejo problema de separación de muestras a partes más pequeñas es la mayor promesa para resolver el problema de la sensibilidad frente a la especificidad, es decir, el proceso permite un rendimiento global de la muestra rápido y más alto, así como tiempos de interrogación (separación) relativamente más largos para aislar e identificar células únicas u otras entidades en la muestra. Finalmente, el último problema se puede superar creando un dispositivo de clasificación jerárquico multidimensional. Esta solución se basa en el hecho de que la DEP negativa es una fuerza más débil que la DEP positiva y las células u otras entidades que experimentan la DEP negativa pueden moverse mediante un flujo de fluido controlado, mientras que los analitos o entidades que experimentan la DEP positiva permanecerán concentrados en las zonas de la DEP de campo alto.

Mediante el uso de flujo controlado de fluidos y electroforesis de CC pulsada en direcciones opuestas, el ADN/ARN y las nanopartículas cargadas pueden separarse de las células y proteínas en una muestra biológica compleja (esto es además de la capacidad intrínseca de la DEP para separar células y ADN).

5 Combinando el flujo de fluido controlado y la electroforesis de CC pulsada con el uso de múltiples frecuencias de CA, es decir, baja frecuencia para atrapar los CNPs y materiales en nanopartículas de ADN/ARN de hmw en el subconjunto de la matriz de electrodos inicial, y frecuencias de CA más altas en otros subconjuntos de la matriz de electrodos para atrapar células de partículas progresivamente más grandes (bacterias y virus) se puede obtener una separación completa de la mayoría de las células y entidades por tamaños. Si se desea, los electrodos se pueden conmutar a diferentes frecuencias para que se produzca localmente una separación más fina, mientras que globalmente se mantiene la separación del tamaño total.

10 Los autores de la invención describen un sistema de separación que implica un dispositivo con estructuras de matriz de electrodos de platino planas, robustas, y electrodos auxiliares, en los que se aplica directamente una muestra biológica compleja (sangre, plasma, suero), de manera que señales de CA controladas de uno o más generadores de funciones producen fuerzas dielectroforéticas, y una fuente de alimentación de CC controlada produce fuerzas electroforéticas. La entrada y las salidas del dispositivo también permiten el paso controlado de fluidos (agua, tampones, etc.) a través del sistema a un caudal controlado. El sistema también incluye un microscopio óptico/epifluorescente y una cámara digital para vigilar, detectar, cuantificar y registrar los procesos de separación que están ocurriendo en el dispositivo (visual y fluorescente). El dispositivo es, en definitiva, un sistema de clasificación jerárquica multiplexante paralela que se habilita mediante el control de efectos electrocinéticos, fuerzas dielectroforéticas, fuerzas electroforéticas, microelectroforesis y flujo de fluidos. Debe señalarse que estos nuevos procesos multiplex de muestra a respuesta son posibles por el hecho de que los nuevos dispositivos de DEP eliminan o reducen en gran medida los efectos adversos de burbujeo, calentamiento y electroquímica experimentados por los dispositivos convencionales.

25 La Figura 3 muestra solo una versión de un dispositivo de matriz de electrodos de platino planos 300 que comprende un alojamiento 302 a través del cual puede fluir una muestra de fluido. El patrón de flujo de fluido a través del dispositivo se indica mediante flechas grandes, que representan el flujo de una muestra idealizada, desde un extremo de entrada 304 en la parte superior del dibujo hasta un extremo de salida 306 en la parte inferior, y una salida de analito lateral 308. El dispositivo incluye múltiples electrodos de CA 310. Solo unos pocos de los electrodos 310 se identifican en la Figura 3, para simplificar la ilustración, pero debe entenderse que todos los pequeños círculos en blanco en la figura del dibujo representan electrodos de construcción similar. Una matriz 3x3 ampliada 312 de los electrodos se ilustra en el lado derecho de la figura del dibujo para mostrar una muestra de fluido en el dispositivo 300. La muestra consiste en una combinación de entidades de tamaño micrométrico o células 314 (los círculos rellenos más grandes que se muestran en la vista ampliada), nanopartículas 316 más grandes (círculos rellenos de tamaño intermedio) y nanopartículas o biomoléculas 318 más pequeñas (los círculos de tamaño más pequeño). Las nanopartículas 316 más grandes podrían representar ADN de alto peso molecular, nucleosomas o CNPs o residuos celulares dispersados en la muestra. Las nanopartículas 318 más pequeñas podrían representar proteínas, ADN, ARN y fragmentos celulares más pequeños. El dispositivo de matriz de electrodos planos 300 en la figura es una matriz de electrodos de 60x20 que puede dividirse en tres matrices de 20x20 que pueden controlarse por separado pero funcionar simultáneamente. Los electrodos de CC 320 auxiliares en la parte superior de la figura pueden conmutarse a carga positiva, mientras que los electrodos 322 de CC en la parte inferior de la figura están conmutados a carga negativa para fines electroforéticos. Cada uno de los sistemas de CA y CC controlados se puede utilizar de manera continua y/o pulsada (p. ej., cada uno puede activarse y desactivarse en intervalos de tiempo relativamente cortos). Las matrices de electrodos planos 324 a lo largo de los lados del flujo de la muestra, cuando están recubiertos con materiales nanoporosos, se pueden utilizar para generar fuerzas electroforéticas de CC, así como también de DEP de CA. Adicionalmente, los procesos de separación microelectroforéticos pueden llevarse a cabo dentro de las capas de nanoporos utilizando electrodos planos en la matriz y/o electrodos auxiliares en las dimensiones de x-y-z. En general, estos dispositivos y sistemas pueden hacerse funcionar en el intervalo de frecuencias de CA de 1000 Hz a 100 mHz, a tensiones que pueden variar desde aproximadamente 1 voltio a 2000 voltios pk-pk; a tensiones de CC de 1 voltio a 1000 voltios, a caudales de 10 microlitros por minuto a 10 mililitros por minuto y en intervalos de temperaturas de 1°C a 100°C. El controlador 108 (Figura 1) controla independientemente cada uno de los electrodos 310, 320, 322, 324. El controlador puede estar conectado externamente al dispositivo 100 tal como mediante una conexión de macho y hembra (no ilustrada), o se puede integrar con la carcasa del dispositivo. Las líneas eléctricas para los electrodos no se muestran en los dibujos, para simplificar la ilustración.

55 Se puede asumir que las células y partículas y otras entidades en la muestra están distribuidas uniformemente por toda la matriz de electrodos, aunque en la figura del dibujo solo se muestra la sección ampliada de electrodos 3x3 312. El caudal del fluido es tal que ejerce una fuerza más fuerte que la DEP negativa que experimentan las partículas más grandes, pero más débil que la DEP positiva que experimentan las partículas más grandes.

La Figura 4 muestra los electrodos de CC superiores 320 e inferiores 322 que se pulsán por intervalos (un segundo encendido seguido por un segundo apagado), proporcionando con ello un breve impulso electroforético que empuja el ADN, el ARN y las pequeñas nanopartículas hacia el electrodo positivo de CC 320, que se encuentra en la parte superior de la figura del dibujo. La matriz de electrodos de 60x20 se visualiza como dividida en tres secciones o sub-matrices distintas que se controlan de forma independiente. Las veinte filas superiores de la matriz de electrodos de CA 402 están sintonizadas en un campo de CA de frecuencia más baja para garantizar que las entidades más pequeñas, que generalmente se mueven hacia los electrodos, debido a los fenómenos electrocinéticos de DEP y CA positivas a frecuencias más bajas, quedarán atrapadas en esos electrodos, mientras que las células y entidades más grandes experimentan una DEP negativa a estas frecuencias y, por lo tanto, se mueven a la sección inferior del dispositivo por el flujo constante de fluido. Las veinte filas medias 404 de electrodos de CA sostendrán las grandes partículas sub-micrónicas (p. ej., el virus) y, a la vez, permitirán que fluyan las partículas y las células del tamaño de una micra. Finalmente, las últimas veinte filas 406 de electrodos de CA se pueden sintonizar, si se desea, a una alta frecuencia de CA, que luego se puede utilizar para capturar las células y las partículas de tamaño micrométrico deseadas.

La Figura 5 muestra el mecanismo de separación para aislar "una célula de un millón", es decir, la detección de células raras. Al utilizar la matriz completa de electrodos, es posible multiplexar y paralelizar el problema de separación para hacerlo más simple. Esto se puede lograr simplemente activando la mayor cantidad posible de la matriz de electrodos para lograr una mejor separación. Al dividir efectivamente la matriz en zonas de separación específicas que pueden analizarse mediante detección óptica (es decir, epifluorescencia), debería ser posible separar una célula específica que experimente DEP positiva de todas las células a su alrededor, una vez que todas las células estén distribuidas uniformemente. En la Figura 5, los círculos rellenos de tamaño intermedio 502 representan células de 10 µm de un tipo específico, tales como linfocitos, glóbulos rojos y similares, y el único círculo relleno 504 mostrado en el electrodo de CA 506 de la tercera sección 406 de los electrodos de CA representa el solitario "una célula en un millón" de un tipo diferente de los otros 502 en la muestra, que también es la única célula que experimenta electroforesis positiva y, por lo tanto, es fácilmente distinguible de las otras células. Utilizando sólo dielectroforesis, debería ser posible separar las células del solitario tipo "una célula en un millón" 504 de los indiferenciados 502. Esto se logra más fácilmente si hay un número suficiente de electrodos de CA para diseminar el problema de separación en trozos más pequeños, más fácilmente separables y analizables. Una vez que el problema de separación de tipo celular se extiende de esta manera, si solo se analizan determinadas secciones de la matriz de electrodos a la vez, tal como la matriz 3x3 que se muestra en la Figura 5, debería ser posible encontrar la partícula solitaria 504 de interés. Adicionalmente, el control de la temperatura puede ser eficaz para permitir una separación más selectiva y eficiente de las células (p. ej., la separación de células cancerosas y madre).

La Figura 6 muestra un esquema más detallado de un proceso de separación de muestras de sangre, antes de la aplicación de electroforesis combinada pulsada DEP de CA/CC/flujo fluido controlado. El diagrama de la Figura 6 muestra algunas de una amplia diversidad de entidades de diagnóstico y biomarcadores potenciales que se encontrarían en una muestra compleja tal como la sangre, entidades que pueden incluir: glóbulos rojos y blancos, bacterias, virus, nanovesículas, nanopartículas de ADN/ARN, un surtido de fragmentos de ADN y ARN y proteínas. El diagrama de la Figura 6 también muestra los electrodos planos 310 de la matriz de platino cubiertos con una capa de nanoporos 604 de densidad intermedia, una capa de nanoporos 606 de baja densidad y una capa de nanoporos 608 de alta densidad directamente sobre los electrodos de CA 310.

La Figura 7 muestra la muestra de sangre en las fases iniciales de la DEP de CA combinada pulsada/electroforesis de CC/flujo fluido controlado. En la Figura 7, todo el dispositivo 300 de matriz se utiliza para llevar a cabo un proceso de separación global que comienza a concentrar diferentes clases de entidades en cada una de las secciones 402, 404, 406 de la sub-matriz de electrodos (superior, media, inferior, respectivamente).

La Figura 8 muestra la muestra de sangre ahora en las fases finales de la DEP de CA combinada pulsada, electroforesis de CC y flujo fluido controlado. En la Figura 8, las diferentes entidades se han concentrado en sus secciones de matriz de electrodos 402, 404, 406 apropiadas. En este ejemplo, se muestran nanopartículas de ADN y fragmentos de ADN más pequeños en la sección superior 402 de la matriz; bacterias, virus y nanovesículas se muestran en la sección de matriz media 404; y células y proteínas se muestran en la sección 408 de la matriz inferior.

La Figura 9 muestra una vista ampliada de la matriz de electrodos de CA en la que se muestran la DEP de CA y electroforesis de CC combinada pulsada materiales en nanopartículas de ADN teñidas de manera fluorescente, ADN de muy alto peso molecular y selección y separación de ADN de menor peso molecular intermedio en la sección superior 402 de la matriz. Debido a que estas entidades se han concentrado y aislado ahora en la sección de la matriz superior, pueden teñirse selectivamente con reactivos de colorante fluorescentes de ADN apropiados, y se puede llevar ahora a cabo el proceso de separación secundario.

La Figura 10 muestra la vista ampliada de la matriz de electrodos de CA con DEP de CA inicial combinada pulsada y electroforesis de CC de materiales en nanopartículas de ADN teñidos de manera fluorescente, ADN de PM muy alto y selección y separación de ADN de PM intermedio-bajo en la sección 402 de la matriz superior. Este proceso inicial hará que los materiales en nanopartículas de ADN comiencen a concentrarse en la parte superior de la capa intermedia de nanoporos que tiene un tamaño de poro que excluye estas entidades de ADN muy grandes; mientras que los fragmentos de ADN de peso molecular más intermedio y más bajo son transportados a una capa de densidad de nanoporos más baja.

La Figura 11 muestra la vista ampliada de la matriz de electrodos de CA con DEP de CA inicial combinada pulsada y electroforesis de CC de materiales en nanopartículas de ADN teñidos de manera fluorescente, ADN de muy alto PM y selección de ADN de PM intermedio-bajo, y separación por microelectroforesis en la sección 402 de la matriz superior. En este punto en el funcionamiento del dispositivo 300 los materiales en nanopartículas de ADN y el ADN de muy alto peso molecular están totalmente concentrados y aislados en la parte superior de la capa de nanoporos 604 de densidad intermedia y los fragmentos de ADN de peso molecular intermedio y bajo se concentran dentro de la capa de nanoporos 606 de densidad baja.

La Figura 12 muestra la vista ampliada de la matriz de electrodos de CA 402 después de la separación de las nanopartículas de ADN y el ADN de muy alto PM y la separación por tamaños electroforética de CC en la matriz de los fragmentos de ADN de PM intermedio y bajo. Los materiales en nanopartículas de ADN y el ADN de muy alto peso molecular pueden analizarse aún más en otra parte del dispositivo 300, mientras que los fragmentos de ADN de peso molecular más intermedio y más bajo pueden ser separados por tamaños por microelectroforesis dentro de las capas de nanoporos 604, 606, 608. La Figura 12 muestra que algunos de los electrodos de CA 310a están cargados positivamente y otros electrodos de CA 310b están cargados negativamente.

La Figura 13 muestra una vista ampliada de la matriz de electrodos de CA con la DEP de CA pulsada inicial aplicada a los glóbulos rojos y blancos en la sección 406 de la matriz inferior del dispositivo 300. En este proceso, las proteínas de la muestra se pueden separar y/o analizar en otro componente del dispositivo, mientras que las células y otras entidades de tamaño micrométrico se pueden separar y diferenciar adicionalmente mediante DEP de CA en la sección 406 de la matriz inferior.

La Figura 14 muestra la vista ampliada de la matriz de electrodos con la DEP de CA pulsada final aplicada a los glóbulos rojos y blancos en la sección 406 de la matriz inferior del dispositivo 300. En este punto del funcionamiento del dispositivo, los glóbulos rojos y blancos se han separado en las regiones de campo alto y bajo de la DEP, posteriormente se pueden separar los glóbulos rojos y diferenciar aún más los glóbulos blancos; es decir, comenzar el proceso de aislamiento de células cancerosas.

La Figura 15 muestra una vista ampliada de la matriz de electrodos de CA con la DEP de CA pulsada inicial para la separación de bacterias, virus y nanovesículas en la sección 404 de la matriz central del dispositivo 300. El dibujo de la Figura 15 es un ejemplo de cómo se pueden utilizar sub-secciones del dispositivo de matriz 300 que pueden ser controladas independientemente para llevar a cabo procesos de separación importantes adicionales.

La Figura 16 muestra la vista ampliada de la matriz de electrodos con la DEP de CA pulsada final para la separación de bacterias, virus y nanovesículas en la sección 404 de la matriz central del dispositivo 300. Nuevamente, debe tenerse en cuenta que este proceso de separación en la sección de la matriz central se puede ejecutar de manera concurrente con, e independientemente de otros procesos de separación que están ocurriendo en las otras sub-secciones de la matriz, p. ej., las separaciones de fragmentos de ADN pueden tener lugar en la sección superior de la matriz y las separaciones de células pueden tener lugar simultáneamente en las otras secciones (inferiores) de la matriz.

Por último, la matriz de electrodos multiplexados en paralelo se puede utilizar en unión con la clasificación de células jerárquica para crear zonas definidas dentro de las filas de electrodos en donde pueden atraparse partículas específicas que tienen un tamaño similar, pero que tienen propiedades dieléctricas diferentes. Una diversidad de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas que pueden utilizar fuerzas y efectos electrocinéticos, dielectroforéticos, electroforéticos y fluidos, todos en conjunción entre sí para aumentar la sensibilidad y la eficiencia de la separación en un dispositivo. Lo más importante es que estos procesos de separación de alto rendimiento y clínicamente útiles se logran solo cuando las fuerzas y los efectos electrocinéticos, electroforéticos y fluidos se combinan de forma única en un dispositivo de matriz de electrodos controlado y aumentado a escala apropiadamente. Además de este tipo de separación, la dielectroforesis, que es un método de separación paralelo sin pérdidas, potencialmente sin marca, se puede utilizar junto con métodos de separación más tradicionales que han implicado mucha más preparación de la muestra, así como una mayor pérdida de la muestra, tal como fraccionamiento de flujo de campo, clasificación celular asistida por fluorescencia (FACS) o clasificación celular asistida magnética, para lograr niveles incluso mayores de separación de células y nanopartículas para uso en aplicaciones.

Con respecto a otros aspectos en las realizaciones ilustradas, debe señalarse que cuando se añade a las células, nanopartículas y biomarcadores a separar el marcaje (fluorescente óptico, luminiscente, electroquímico, magnético, etc.), la multiplexación descrita en esta memoria probablemente sería incluso más efectiva debido a que las etiquetas ayudan a afectar el tamaño, la conductividad y la detectabilidad de las entidades.

5 En la actualidad, los mecanismos de separación de DEP arriba descritos están en una fase de datos experimentales temprana. Se ha construido un sistema prototipo que utiliza una estructura de matriz de electrodos como la arriba descrita que recibe materiales biológicos para la separación, que incluyen células, nanopartículas y ADN hmw. La activación selectiva de subconjuntos de electrodos en la estructura de matriz se ha logrado ahora con un generador de funciones que opera bajo el control de una programación de software adecuada, que puede ejecutarse en
10 ordenadores convencionales tales como ordenadores de escritorio o de estaciones de trabajo. Los electrodos individuales se pueden controlar utilizando este aparato. El sistema prototipo tiene un microscopio epifluorescente asociado para vigilar y registrar los experimentos de separación (véase la Sección Experimental más adelante para obtener una descripción adicional).

15 Una diversidad de aplicaciones de separación y aislamiento que incluyen detección de células raras para el aislamiento de células madre adultas de la sangre, otros fluidos corporales o cualesquiera tampones, p. ej., progenitores hematopoyéticos; separación bruta entre células, proteínas y fragmentos de ADN/ARN en la sangre, otros fluidos corporales u otros tampones para la detección del cáncer y otros diagnósticos; aislamiento de células cancerosas de la sangre, otros fluidos corporales u otros tampones para fines de investigación, diagnóstico y terapéuticos. También se contemplan los usos para la vigilancia ambiental y para la detección rápida de patógenos y
20 agentes de bioterror. Finalmente, también se contemplan sistemas, dispositivos y técnicas descritos en esta memoria descriptiva que se pueden utilizar para separar, aislar y purificar una diversidad de entidades no biológicas que incluyen, además de las nanopartículas y nanovesículas de fármacos; puntos cuánticos, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono (CNTs), nanocables e incluso dispositivos y componentes CMOS micrométricos y submicrométricos; básicamente, cualquier macromolécula o nanocomponente que pueda suspenderse o
25 solubilizarse en un sistema de disolvente acuoso o mixto puede procesarse en las realizaciones ilustradas y utilizando las técnicas descritas en esta memoria. Los autores de la invención prevén también que estos nuevos dispositivos permitirán ahora llevar a cabo el autoensamblaje dirigido de ADN y otras nanopartículas bioderivatizadas, nanocomponentes y objetos de mesoescala. Esto puede conducir a nuevas aplicaciones de genotipado y secuenciación de ADN (genoma de \$ 1000) y aplicaciones nano/microbio/quimiosensor, incluyendo
30 dispositivos "Fantastic Voyage" de tamaño celular altamente integrados (inspirados en la película del mismo nombre) que podrían colocarse en el torrente sanguíneo para llevar a cabo diagnósticos, microcirugía in vitro de administración terapéutica, es decir, eliminar coágulos y placas, reparar arterias ateroscleróticas, etc.; así como componentes nanoelectrónicos, nanofotónicos, fotovoltaicos, celdas de combustible, baterías, nanomateriales y numerosas otras aplicaciones de integración heterogénea.

35 Al utilizar los dispositivos y las técnicas descritos en esta memoria, se puede proporcionar un resultado de "muestra a respuesta", en el que la operación de separación da como resultado la retención de al menos un tipo de material biológico en una de las sub-secciones del electrodo, mientras que el resto del fluido de muestra se separa por lavado del dispositivo, de modo que un reactivo en el dispositivo de procesamiento de muestras, seguido de la
40 reacción del reactivo introducido con el tipo de material biológico retenido en el dispositivo de procesamiento de muestras. Tal como se indicó anteriormente, el reactivo puede comprender un colorante fluorescente, anticuerpos o similares. El proceso de muestra a respuesta se puede utilizar para realizar una diversidad de tareas tal como se describe arriba, incluidas las operaciones de PCR y similares.

45 La invención se ha descrito arriba en términos de realizaciones actualmente preferidas, de modo que se puede transmitir una comprensión de la presente invención. Sin embargo, hay muchas configuraciones y permutaciones de los dispositivos, sistemas y mecanismos de separación que no se describen específicamente en esta memoria, pero a los que es aplicable la presente invención. Por lo tanto, la presente invención no debe verse limitada a las realizaciones particulares descritas en esta memoria, sino que debe entenderse que la presente invención tiene una amplia aplicabilidad con respecto a los sistemas de separación biológica en general. Todas las modificaciones,
50 variaciones o disposiciones e implementaciones equivalentes que estén dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas deben, por lo tanto, considerarse dentro del alcance de la invención.

Sección Experimental

Tampones y Mediciones de Conductividad

La solución tampón EDTA de Tris Borato (TBE) 5x concentrada se obtuvo de USB Corporation (USB, Cleveland, Ohio, EE.UU.) y se diluyó utilizando agua Milli-Q Ultrapure desionizada (55 nS/cm) a las siguientes concentraciones:
55 0,01x TBE, 0,1x TBE y 1x TBE. Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (1x PBS) se obtuvo de Invitrogen (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se diluyó utilizando agua Milli-Q a 0,1x PBS. Las mediciones de

conductividad se realizaron con un medidor de conductividad AR-50 de Accumet Research (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, EE.UU.) utilizando un electrodo de 2 celdas (intervalo: 10-2000 μS) y un electrodo de 4 celdas (intervalo: 1-200 mS) y se ajustó con los patrones de conductividad adecuados. Se midieron las siguientes conductividades del tampón: 0,01x TBE – 18,1 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 0,1x TBE - 125 $\mu\text{S}/\text{cm}$; 1x TBE – 1,09 mS/cm; 0,1x PBS – 1,77 mS/cm; y 1x PBS – 16,8 mS/cm.

Partículas, Nanopartículas y Derivatización del ADN

Nanopartículas de poliestireno fluorescentes (FluoSpheres) con superficies recubiertas de NeutrAvidin se adquirieron de Invitrogen (Invitrogen, San Diego, CA, EE.UU.). Los diámetros de las nanopartículas fueron 0,04 μm (40 nm) y 0,2 μm (200 nm). Las nanopartículas de poliestireno de 40 nm eran fluorescentes rojas (ex.: 585/em: 605) y las nanopartículas de poliestireno de 200 nm eran fluorescentes de color amarillo verdoso (ex.: 505/em: 515). Las partículas más grandes de poliestireno carboxilado de 10,14 μm se obtuvieron de Bangs Labs (Bangs Labs, Fishers, IN, EE.UU.). Las secuencias de oligonucleótidos de ADN biotinilado se obtuvieron de Trilink Bio Technologies (Trilink, San Diego, CA, EE.UU.). El oligonucleótido de ADN 51mero de cadena sencilla utilizado para derivatizar las nanopartículas de 40 nm tenía la secuencia: [5']⁻-Biotina-TCA GGG CCT CAC CAC CTA CTT CAT CCA CGT TCA CTC AGG GCC TCA CCA CCT [3']⁺. Un segundo oligonucleótido de ADN 23mero de cadena sencilla utilizado tenía la secuencia - [5']⁻- Biotina-GTA CGG CTG TCA TCA CTT AGA CC [3']⁺. La derivatización de las nanopartículas de NeutrAvidin de 40 nm con los oligonucleótidos de ADN biotinilados se llevó a cabo suspendiendo primero las nanopartículas en diferentes concentraciones de Tris Borato EDTA (0,01x, 0,1 x, 1x TBE) o tampones de solución salina tamponada con fosfato (0,1x, 1x PBS). El oligonucleótido de ADN-ss se añadió a las mezclas en las cantidades de relación de 400:1 (ADN: nanopartículas de 40 nm) para la secuencia de ADN-ss 51mera y una relación de 6500:1 (ADN: nanopartículas de 40 nm) para la secuencia de ADN-ss 23mera. Una vez que se añadió el ADN, la solución se agitó en vórtice a alta velocidad durante 20 segundos y luego se dejó que reaccionara durante aproximadamente 20 minutos. Para los experimentos de nanopartículas derivatizadas con ADN de 40 nm, la mezcla de nanopartículas de ADN se realizó mediante la adición de 0,5 μL de la solución madre en 299 μL del tampón apropiado. Para los experimentos de nanopartículas de 200 nm, se añadieron 0,5 μL de la solución madre a 299 μL del tampón apropiado. Finalmente, se añadió a las muestras 1 μL de la solución madre de las partículas de poliestireno de 10,14 μm y después las muestras se mezclaron lentamente durante aproximadamente 10 segundos. Las muestras estaban ahora listas para ser aplicadas al dispositivo de cartucho de micromatriz.

Dispositivo de Matriz de Microelectrodos de DEP

Los dispositivos de matriz de microelectrodos utilizados para estos estudios se obtuvieron de Nanogen (San Diego, CA, EE.UU., Cartuchos NanoChip® 100). Los microelectrodos circulares en la matriz tienen un diámetro de 80 μm y están hechos de platino. La micromatriz está recubierta con una capa de hidrogel de poliacrilamida porosa de 10 μm de espesor. Las micromatrices están encerradas en un cartucho de microfluidos que forma una cámara de muestras de 20 μL sobre la matriz que está cubierta con una ventana de vidrio. Las conexiones eléctricas a cada uno de los microelectrodos individuales se fijan a la parte inferior del cartucho. Solo se utilizó un subconjunto de 3x3 de nueve microelectrodos para llevar a cabo la DEP. Se aplicaron campos eléctricos de corriente alterna (CA) a los nueve microelectrodos en un patrón de direccionamiento de tablero de ajedrez. En este patrón de direccionamiento de tablero de ajedrez, cada uno de los microelectrodos tiene el sesgo opuesto de su vecino más cercano. El modelo informático correspondiente para la distribución asimétrica del campo eléctrico creado por este patrón se ha discutido anteriormente [27]. Este modelo indica que los campos de DEP máximos positivos (regiones de campo alto) existen en (sobre) los microelectrodos y los mínimos de campo DEP negativos (regiones de campo bajo) existen en las zonas entre los electrodos. En general, para la DEP en soluciones de baja conductancia, se espera que las nanopartículas de ADN de 60 nm y de 200 nm se concentren en las regiones de campo positivo o alto sobre los microelectrodos [28] y las partículas de 10 micras se concentren en las regiones de campo bajo o negativo DEP [29] entre los microelectrodos. Los cálculos del modelo anterior se realizaron para un conjunto de microelectrodos de 5x5 [27]. Antes de cada uno de los experimentos, el cartucho de micromatrices se lava 10 veces con 200 μL del búfer apropiado, a lo largo de un espacio de tiempo de 5 minutos. El cartucho se deja reposar durante 5 minutos y luego se lava dos veces más con 200 μL de tampón. Luego se inyecta lentamente en el cartucho un total de 150 μL de la solución de muestra que contiene la mezcla de nanopartículas, quedando en el cartucho un volumen final de muestra de aproximadamente 20 μL .

Configuración Experimental, Mediciones, Fluorescencia y Análisis de SEM

Los dispositivos de micromatrices se controlaron utilizando un sistema de conmutación hecho a medida (diseñado y construido en el laboratorio de los autores de la invención) que permite el control individual de la tensión que se aplica a cada uno de los 100 microelectrodos. Los microelectrodos se ajustaron a la frecuencia de CA adecuada y las tensiones utilizando un generador de funciones arbitrarias Agilent 33120A (Agilent, Santa Clara, CA, EE.UU.). Las frecuencias de CA variaron de 1000 Hz a 10.000 Hz, a 10 voltios pico a pico (pk-pk). La forma de onda utilizada para todos los experimentos fue sinusoidal. Los experimentos se visualizaron utilizando un objetivo 10x PL Fluotar

en un microscopio epifluorescente JenaLumar (Zeiss, Jena, Alemania) empleando los filtros de excitación y emisión apropiados (fluorescencia verde Ex 505 nm, Em 515 nm; fluorescencia roja Ex 585 nm, Em 605 nm). Las imágenes con luz de fondo y las imágenes fluorescentes se capturaron utilizando una cámara CCD RGB de 24 bits de Optronics (Optronics, Goleta, CA, EE. UU.). Los datos de la imagen se procesaron utilizando una tarjeta de captura de video Canopus ADVC-55 (Canopus, San Jose, CA, EE.UU.) conectada a un ordenador portátil utilizando Adobe Premiere Pro (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EE.UU.) o Windows Movie Maker. Los datos de fluorescencia finales se analizaron introduciendo fotogramas de imágenes fluorescentes individuales del video en MATLAB (Mathworks, Natick, MA, EE.UU.) a los 0 minutos, 30 segundos, 1 minuto, 2 minutos, 4 minutos, 8 minutos, 16 minutos y 20 minutos. Los gráficos se crearon utilizando Excel a partir de los datos recopilados a través del análisis MATLAB de las lecturas de intensidad de fluorescencia en el microelectrodo. fue creado utilizando MATLAB. Se utilizaron los siguientes datos para crear el gráfico: σ_p (para 200 nm) = 18 mS, σ_p (para 40 nm + ADN) = 50 mS $K_s = 0,9$ nS, $\epsilon_p = 2,55 \epsilon_0$. $r = 30$ nm y $r = 100$ nm. $f = 3$ kHz. Después de la conclusión de los experimentos de la DEP, las micromatrices FCOS tenían retirado todo el líquido de su superficie y se visualizaron utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM) Phillips XL30. El SEM se utilizó para obtener imágenes de las capas finales de nanopartículas en la superficie de la micromatriz.

Las referencias citadas en esta descripción comprenden lo siguiente:

1. Tong, Y-K.; Lo, Y. M. D. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. *Clinica Chimica Acta*. 363:187-96; 2006
2. Becker, F.F.; Wang, X-B.; Huang, Y.; Pethig, R.; Vykoukal, Y.; Gascoyne, P.R.C. The removal of human leukemia cells from blood using interdigitated microelectrodes. *J Phys. D: Appl. Phys.* 27:2659-2662; 1994.
3. Becker, F.F.; Wang, X-B.; Huang, Y.; Pethig, R.; Vykoukal, Y.; Gascoyne, P.R.C. Separation of Human Breast Cancer Cells From Blood by Differential Dielectric Affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92:860-864; 1995.
4. Stephens M, Talary MS, Pethig R, Burett AK, Mills KI. The dielectrophoresis enrichment of CD34+ cells from peripheral blood stem cell harvests. *Bone Marrow Transplant.* 18:777-82. 1996
5. Washizu, M.; Kurosawa, O. Electrostatic manipulation of DNA in microfabricated structures. *Industry Applications, IEEE Transactions on.* 26:1165-1172; 1990.
6. Washizu, M.; Kurosawa, O.; Arai, I.; Suzuki, S.; Shimamoto, N Applications of electrostatic stretch-and-positioning of DNA. *Industry Applications, IEEE Transactions on.* 31:447-456; 1995.
7. Asbury, C.L.; Van Den Engh, G. Trapping of DNA in Nonuniform Oscillating Electric Fields. *Biophys J.* 74:1024-1030; 1998.
8. Asbury, C.L.; Diercks, A.H.; Van Den Engh, G. Trapping of DNA by dielectrophoresis. *Electrophoresis.* 23:2658 - 2666; 2002.
9. Holzel, R.; Calander, N.; Chiragwandi, Z.; Wil ander, M.; Bier, F.F. Trapping Single Molecules by Dielectrophoresis. *Phys. Rev. Lett.* 95:128102 (2005)
10. Ramos, A.; Morgan, H.; Green, N. G.; Castellanos, A. Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *J Phys. D: Appl. Phys.* 31:2338-2353; 1998.
11. Goodard W.A., Brenner, D.W.; Lyshevski, S.B.; lafrate, G.J.; *Handbook of Nanoscience*, 2ª edición, cap. 16, p5-8
12. HiguGhi Yo, GhrQIDQsomalDNA fragmentation inapoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 66:1527-35. 2003
13. Ziegler A, Zangemeister-Wittke D, Stahel RA. Circulating DNA: a new diagnostic gold mine? *Cancer Treat Rev.* 5:255-71. 2002
14. Wu TL, Zhang D, Chia JH, Tsao KH, Sun CF, Wu JT. Cell-free DNA: measurement in varous carcinomas and establishment of normal reference range. *Clin ChimActa.* 21:77-87. 2002
15. Higuchi Y.; Matsukawa S. Appearance of 1-2 Mbp giant DNA fragments as an early common response leading to cell death induced by various substances that cause oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, 23:90-99, 1997 23
16. Gautschi O, Bigosch C, Huegeli B, Jerman M, MarA, Chasse E, Ratschiler D, Weder W, Joerger M, Betticher DC, Stahel RA, Ziegler A. Circulating deoxyribonucleic Acid as prognostic marker in non-small-cell lung cancer patients undergoing chemotherapy. *J Clin Oncol.* 22:4157- 64. 2004
17. Stroun M, Aner P, Lyautey J, et al. Isolation and characterization of DNA from the plasma of cancer patients. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23:707-712. 1987.
18. Morgan, H.; Hughes, M.P.; Green, N.G. "Separation of Sub micron Bioparticles by Dielectrophoresis" *Biophysical Journal.* 77:516-525. 1999
19. Green, N. G.; Ramos, A.; Morgan, H. Ac electrokinetics: a survey of sub-micrometre paricle dynamics. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 33:632-641; 2000.
20. Tuukanen, S.; Toppar, J. J.; Kuzyk, A.; Hirviniemi, L.; Hytonen, V. P.; Ilalainen T.; Torma, P. Carbon nanotubes as electrodes for dielectrophoresis of DNA. *Nano Letters.* 6:1339-1343; 2006.
21. Ching 1. et al., "Isolation of Cultured Cervical Carcinoma Cells Mixed with Peripheral Blood Cells on a Bioelectronic Chip", *Analytical Chemistry*, Vol. 70, nº11, págs. 2321-2326, 1998.

22. Cheng, J. et al., "Preparation and Hybridization Analysis of DNA/A from E. coli on 15 Microfabricated Bioelectronic Chips", Nature Biotechnology, Vol. 16, págs. 541-546, 1998.
23. Huang Y, Ewalt KL, Tirado M, Haigis R, Forster A, Ackley D, Heller MJ, O'Connell JP y Krhak M, "Electric Manipulation of Bioparticles and Macromolecules on Microfabricated Electrodes", Analytical Chemistry 2001, (73):1549-59.
- 5 24. Huang Y, Joo S, Duhon M, Heller MJ, Wallace B y Xu, "Dielectrophoretic Cell Separation and Gene Expression Profiling on Microelectronic Chip Arrays", Analytical Chem. 2002, 74, 3362-71.
25. Patente de EE.UU. N° 5.632.957, 27 de mayo de 1997, Heller et al., Molecular Biological System Including Electrodes.
- 10 26. Patente de EE.UU. N° US6280590 B1, 28 de agosto de 2001, Cheng et al., Channel-Less Separation of Bioparticles on a Bioelectronic Chip by Dielectrophoresis.
27. Patente de EE.UU. N° 6.403.367 B1, 11 de junio de 2002, Cheng et al., Integrated Portable Biological System. 24.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para separar analitos a nanoescala de entidades mayores en una muestra biológica de elevada conductancia, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) aplicar una muestra biológica de elevada conductancia a un dispositivo con estructuras de matrices de electrodos de platino planos (310) y electrodos auxiliares (320, 324) recubiertos por una estructura porosa, y entradas (304) y salidas (306) para el flujo de fluido controlado de la muestra biológica de elevada conductancia a través del dispositivo;
- 10 (b) con una corriente alterna, activar selectivamente los electrodos (310) en dichas estructuras de matrices y establecer fuerzas de alto campo dielectroforéticas (DEP) positivas y fuerzas de bajo campo dielectroforéticas (DEP) negativas, con lo que efectos electroforéticos de CA separan analitos a nanoescala de entidades mayores, en el que la muestra biológica de elevada conductancia tiene una conductancia de > 100 mS/m.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que (1) la corriente alterna tiene una frecuencia menor que 20 kHz; o (2) la corriente alterna tiene una frecuencia de 10-50 kHz.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los analitos a nanoescala (1) son partículas que tienen un tamaño de entre 5 nm y 500 nm; (2) comprenden (i) un ADN de alto peso molecular, (ii) ARN, (iii) proteínas y/o (iv) membrana celular; o (3) ambos.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que las entidades mayores comprenden células y partículas de tamaño micrónico.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra de elevada conductancia es sangre entera, suero o plasma.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende, además, activar selectivamente los electrodos auxiliares (320, 324) para establecer campos electroforéticos de CC, en donde los campos electroforéticos de CC proporcionan la separación de los analitos a nanoescala utilizando electroforesis de CC.
- 25 7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el flujo de fluido de la muestra biológica de elevada conductancia se controla mediante el bombeo externo y/o electrocinética de CC/CA.

Dispositivo DEP de Elevada Conductancia de Múltiples Cámaras

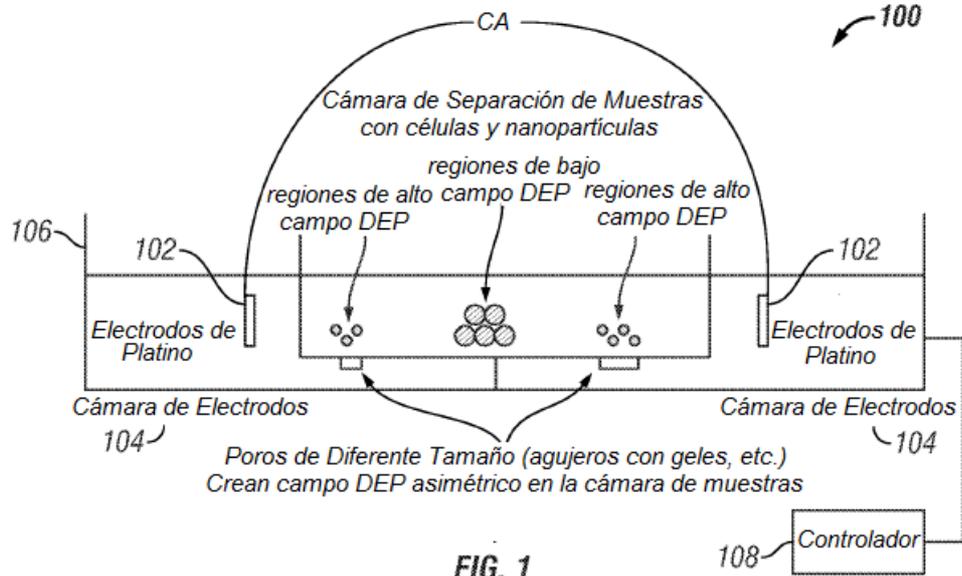


FIG. 1

Vista en Planta de Dispositivo DEP de Elevada Conductancia de Múltiples Cámaras

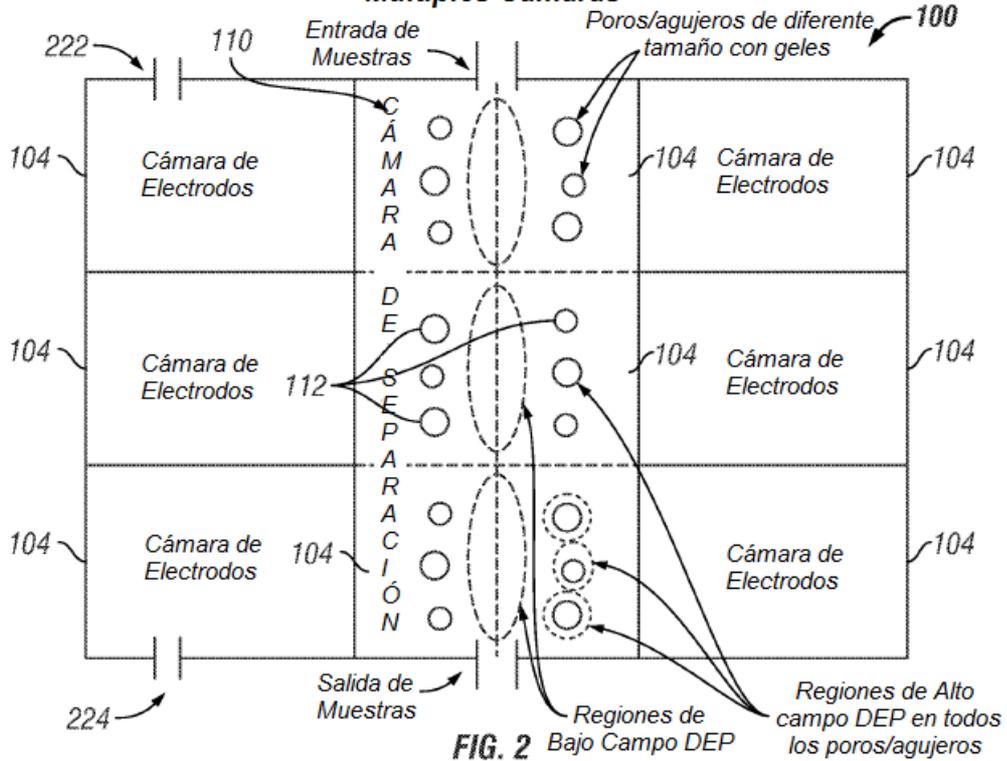


FIG. 2

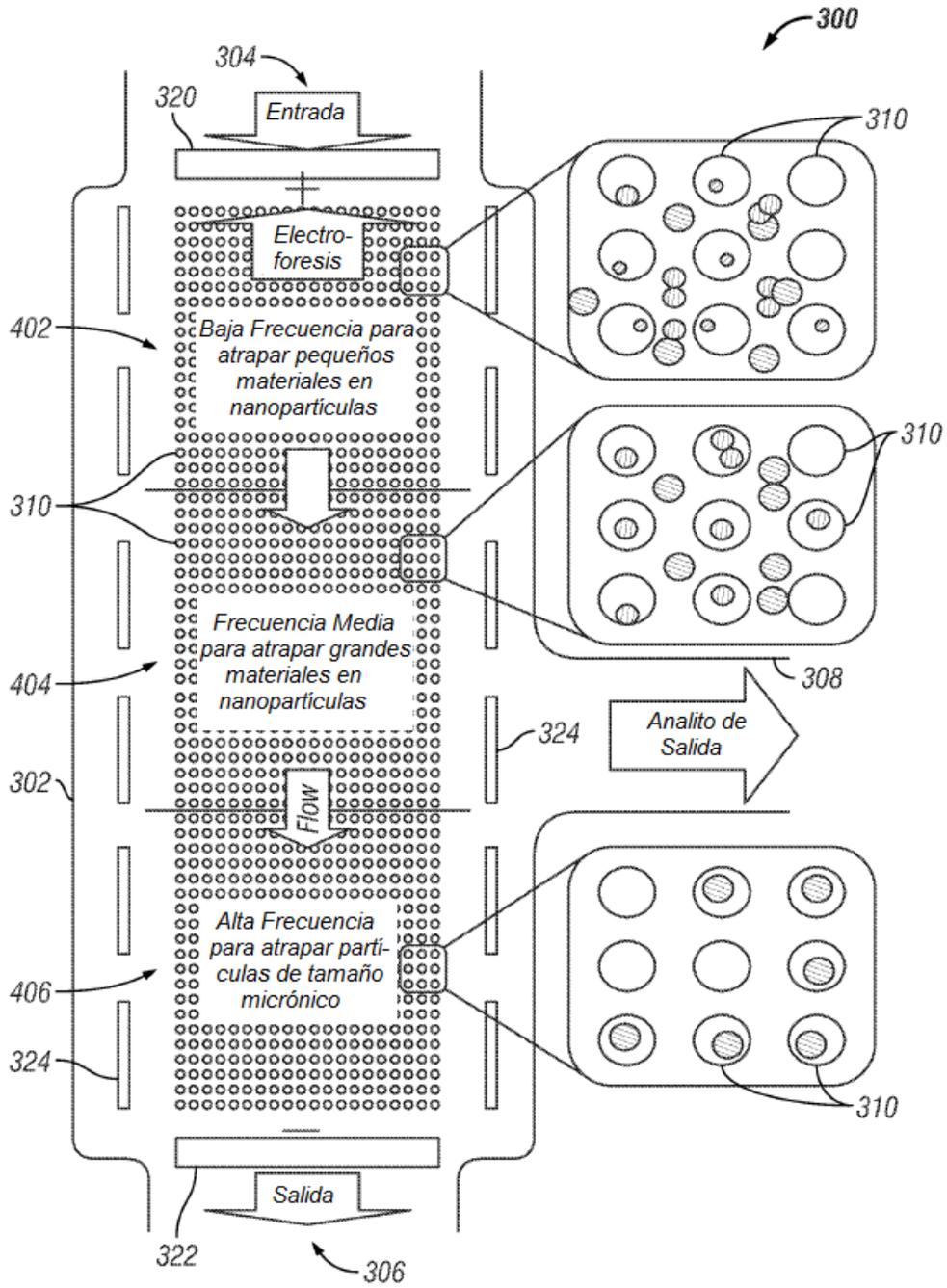


FIG. 4

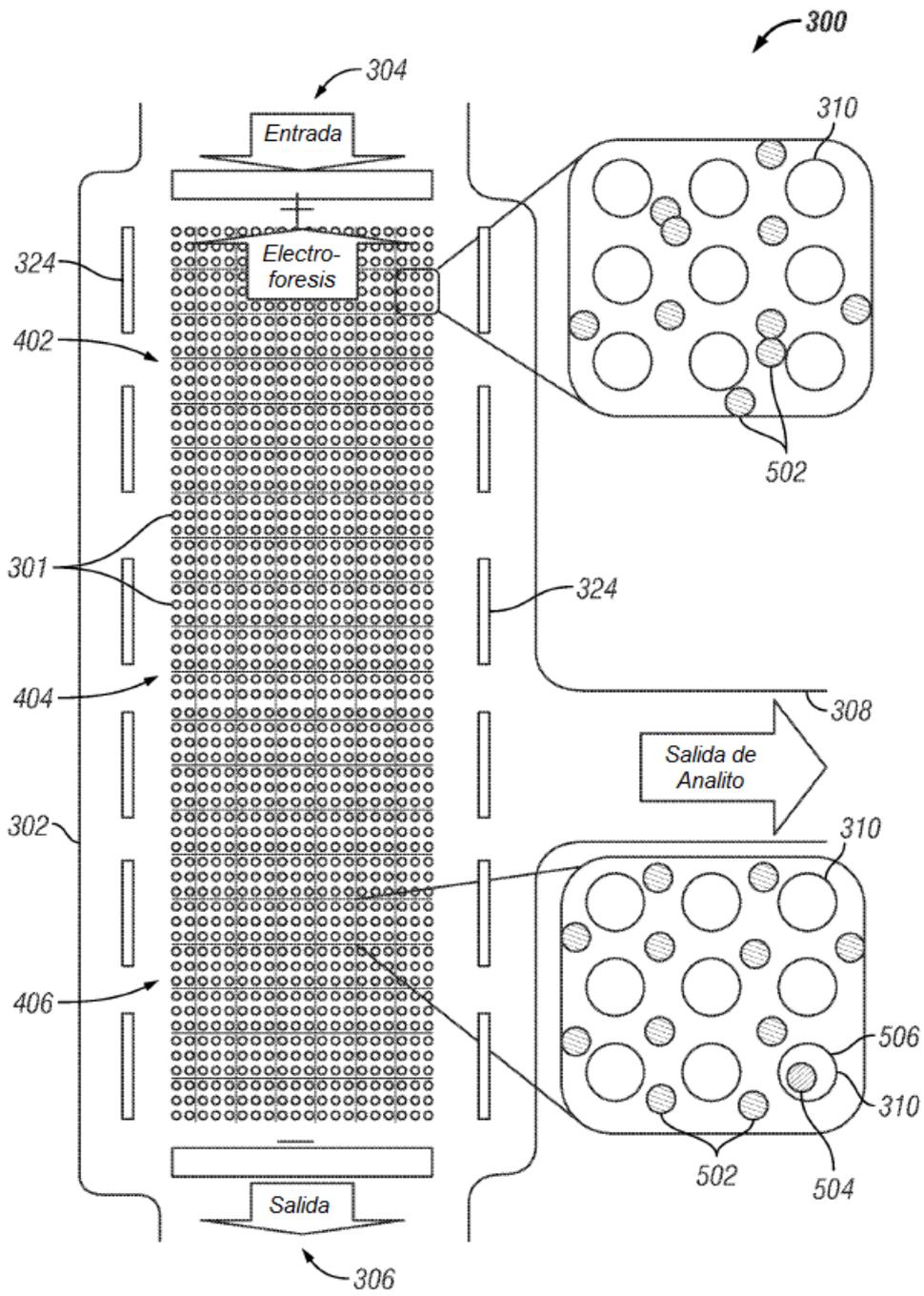


FIG. 5

**Muestra de Sangre Aplicada DEP CA Pulsada/Electroforesis CC/
Dispositivo de Flujo Flujo Controlado**

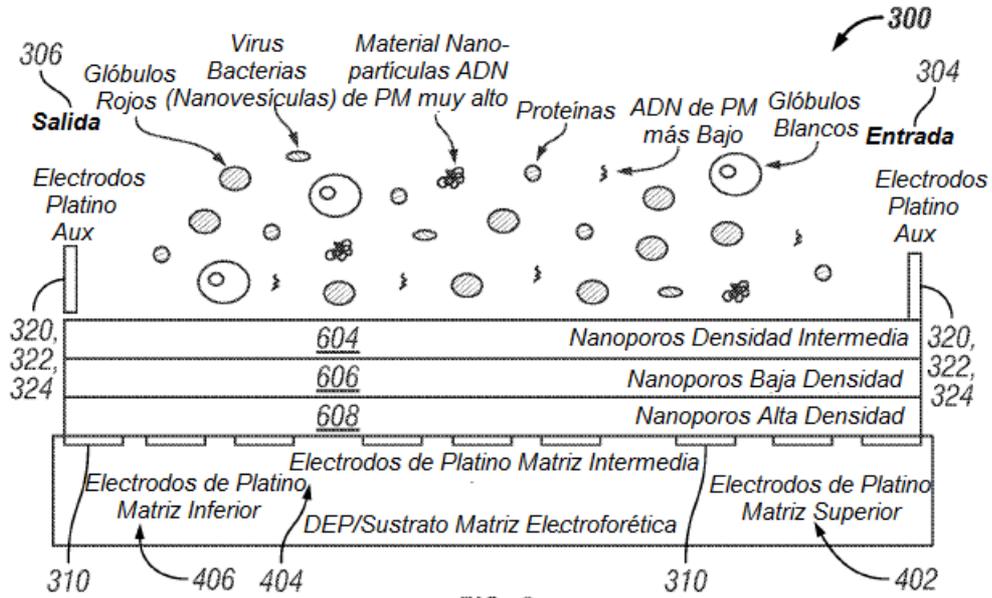


FIG. 6

**Muestra de Sangre de DEP CA Pulsada Combinada Fase Inicial/
Electroforesis CC/Dispositivo de Flujo Flujo Controlado**

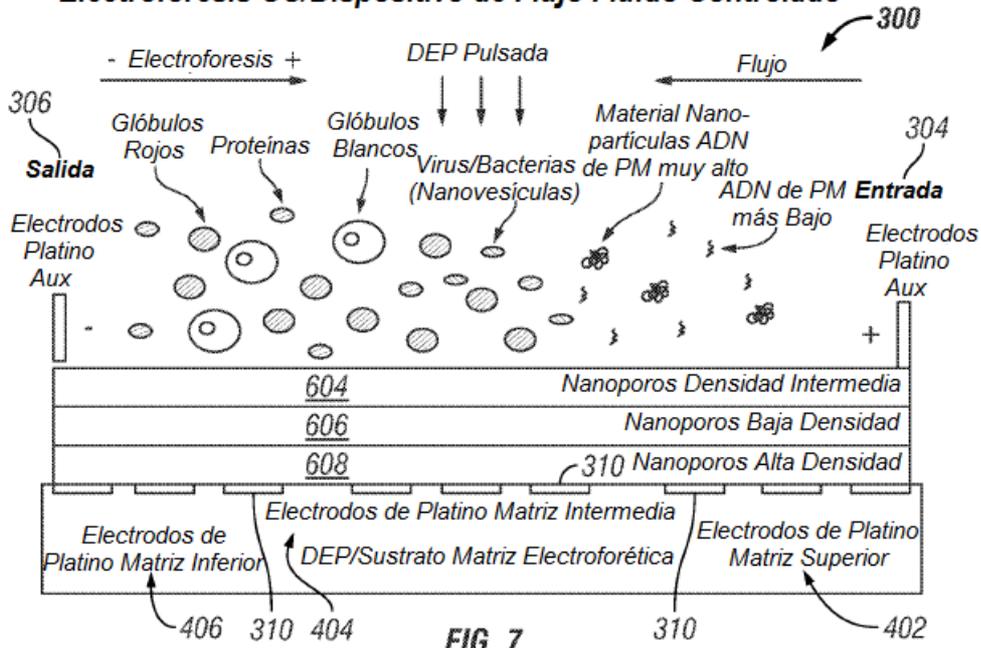


FIG. 7

**Muestra de Sangre de DEP CA Pulsada Combinada Fase Final/
CC Electroforesis/Dispositivo de Flujo Fluido Controlado**

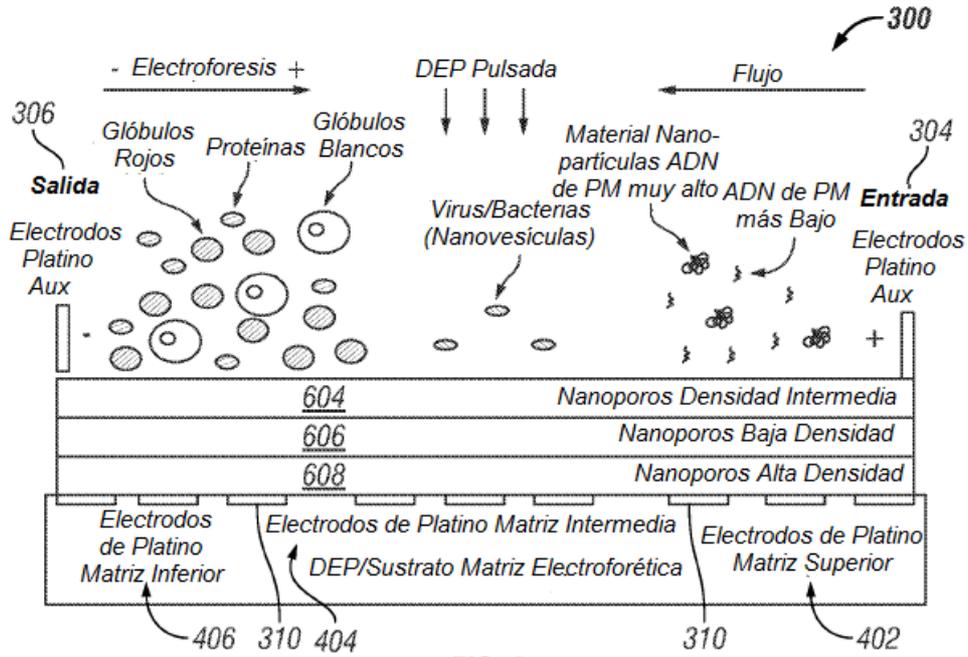


FIG. 8

**DEP CA Pulsada Combinada y Electroforesis CC de Materiales
Nanopartículas ADN Teñidos Fluorescentes, ADN de Peso
Molecular muy Alto y Selección y Separación de ADN de Peso
Molecular Intermedio-Bajo en Sección de Matriz Superior**

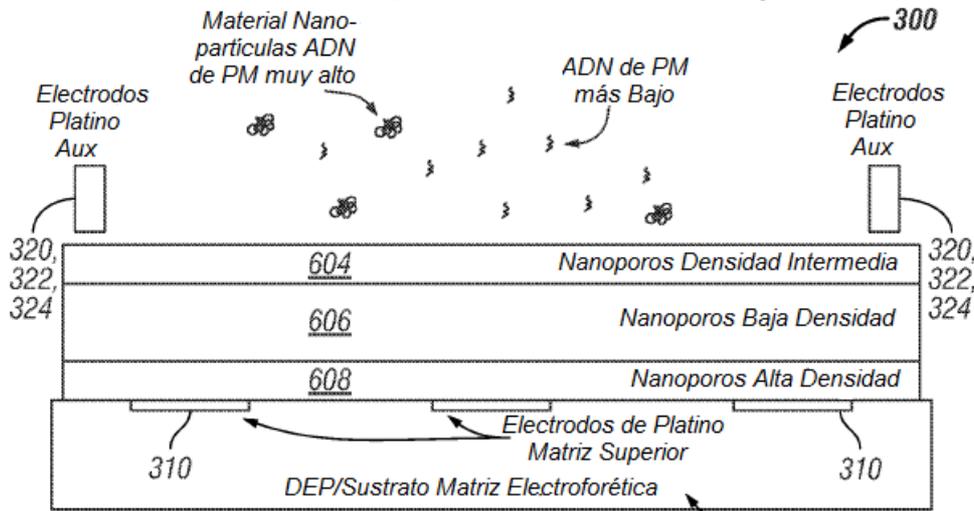


FIG. 9

DEP CA Pulsada Combinada Inicial y Electroforesis CC de Materiales Nanopartículas ADN Teñidos Fluorescentes, ADN de Peso Molecular muy Alto y Selección y Separación de ADN de Peso Molecular Intermedio-Bajo en Sección de Matriz Superior

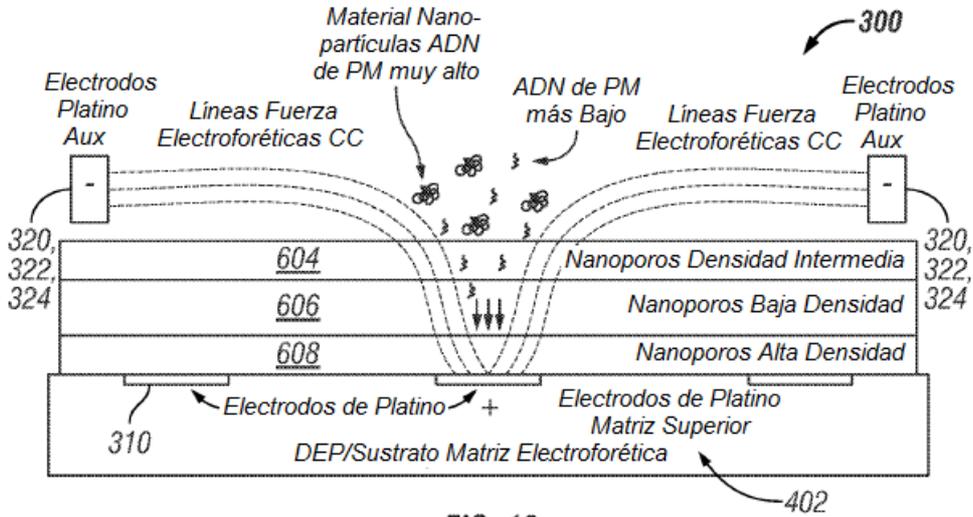


FIG. 10

DEP CA Pulsada Combinada Final y Electroforesis CC de Materiales Nanopartículas ADN Teñidos Fluorescentes, ADN de Peso Molecular muy Alto y Selección y Separación de ADN de Peso Molecular Intermedio-Bajo en Sección de Matriz Superior

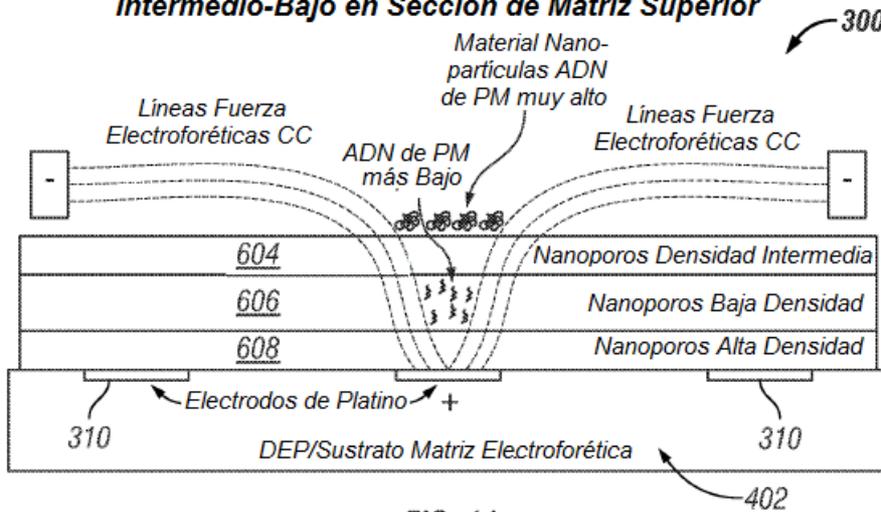


FIG. 11

Separación de Materiales Nanopartículas de ADN y ADN de Peso Molecular muy Alto y Separación por Tamaños Electroforética CC En Matriz de ADN de Peso Molecular Intermedio y Bajo

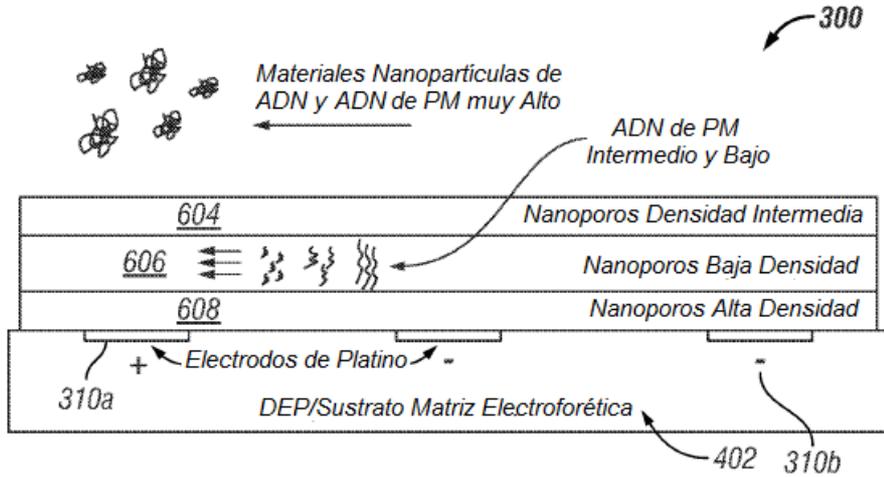


FIG. 12

DEP CA Pulsada Inicial Aplicada a Glóbulos Rojos y Blancos en Sección de Matriz Inferior del Dispositivo

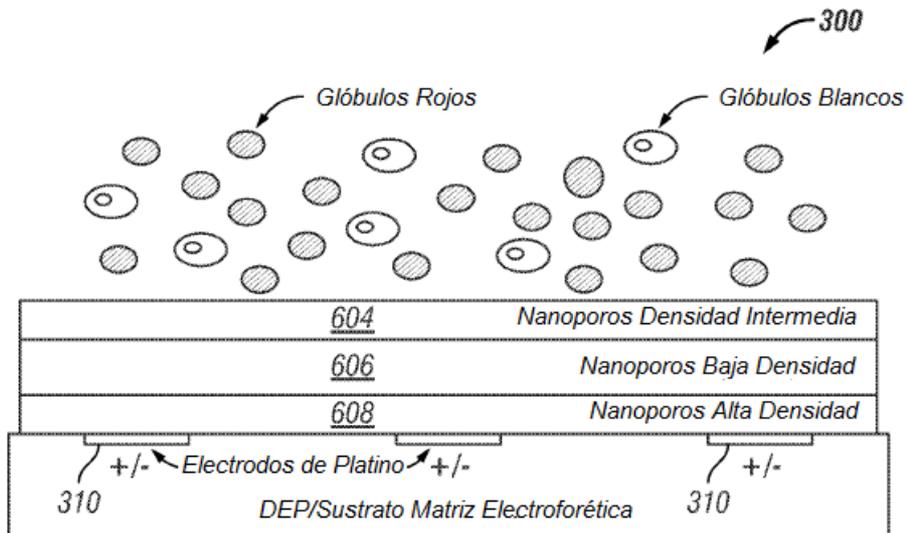


FIG. 13

DEP CA Pulsada Final Aplicada a Glóbulos Rojos y Blancos en Sección de Matriz Inferior del Dispositivo

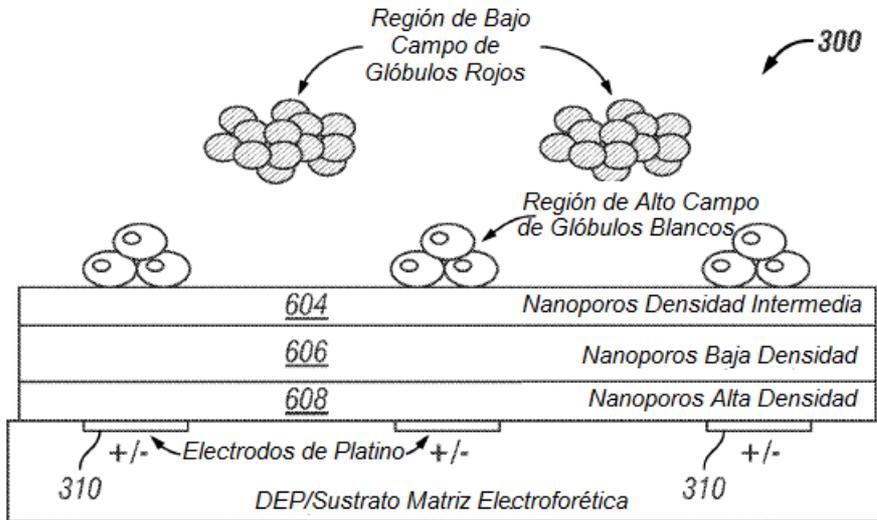


FIG. 14

DEP CA Pulsada Inicial Aplicada Para Separación de Bacterias, Virus y Nanovesículas en Sección de Matriz del Dispositivo

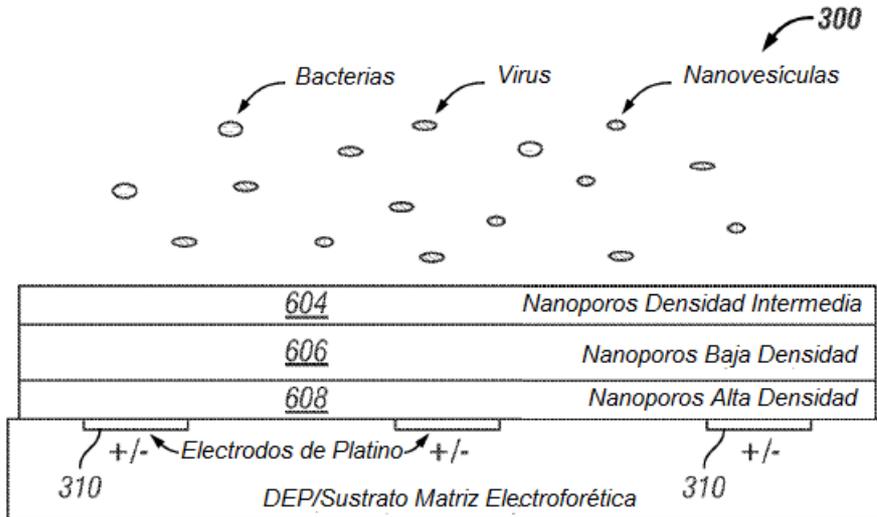


FIG. 15

DEP CA Pulsada Final Aplicada a Glóbulos Rojos y Blancos en Sección de Matriz Inferior del Dispositivo

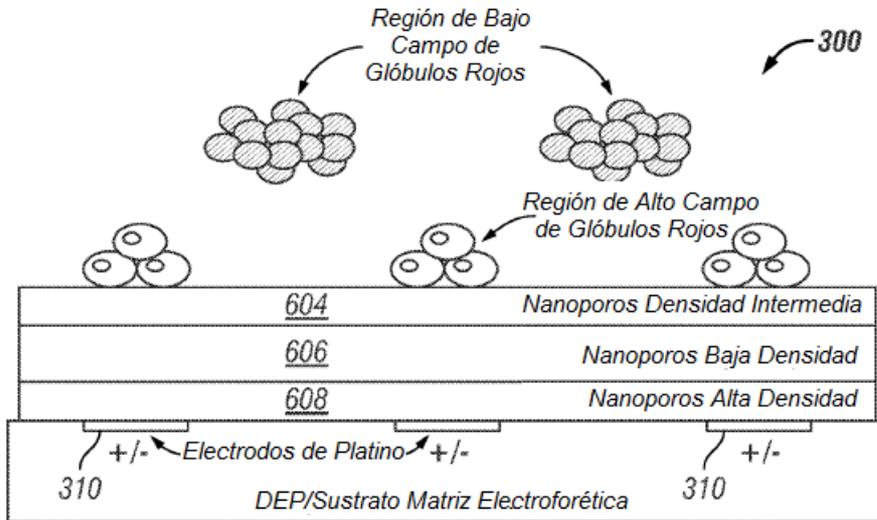


FIG. 14

DEP CA Pulsada Inicial Aplicada Para Separación de Bacterias, Virus y Nanovesículas en Sección de Matriz del Dispositivo

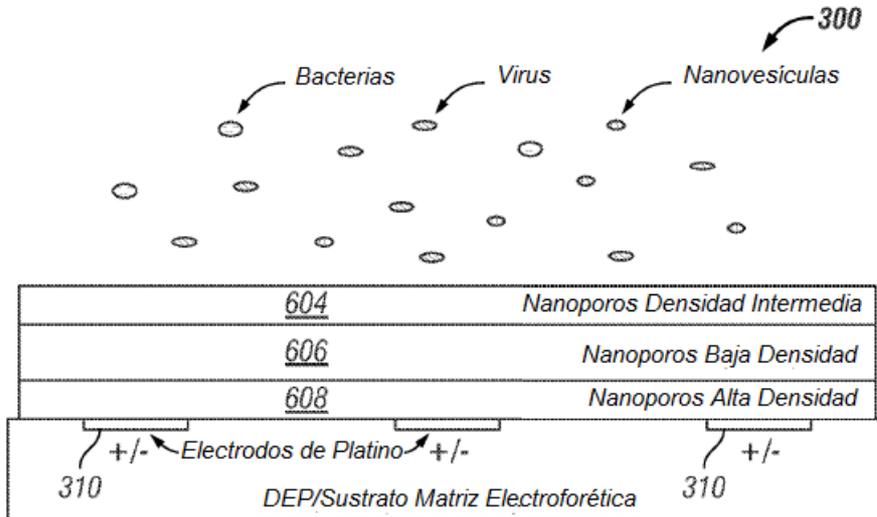


FIG. 15

DEP CA Pulsada Final para Separación de Bacterias, Virus y Nanovesículas en Sección de Matriz Media del Dispositivo

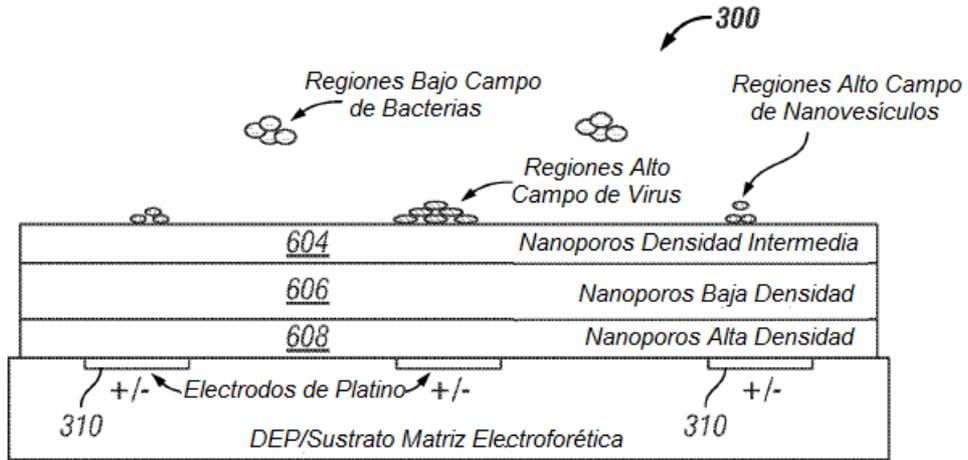


FIG. 16

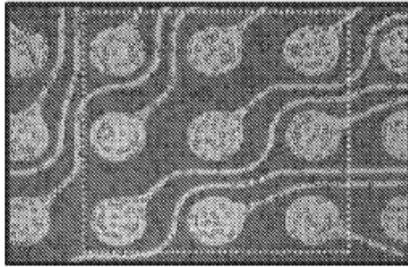


FIG. 17A

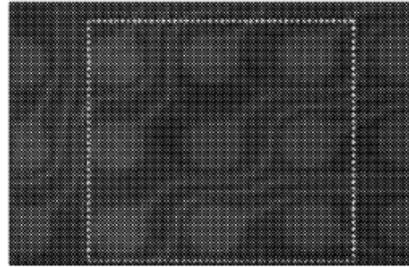


FIG. 17B

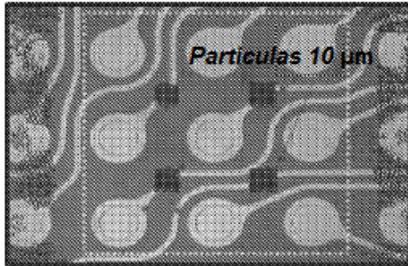


FIG. 17C

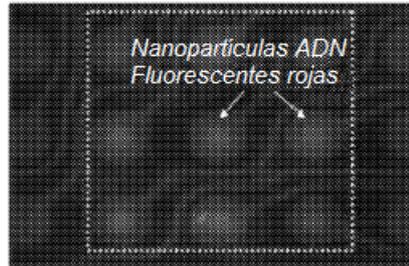


FIG. 17D

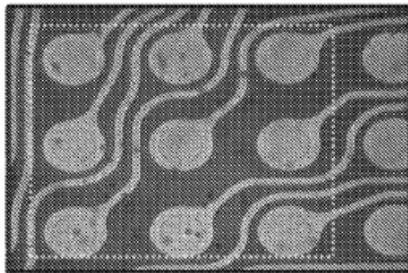


FIG. 17E

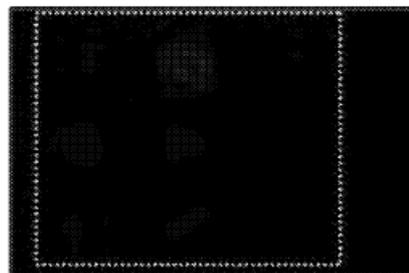


FIG. 17F

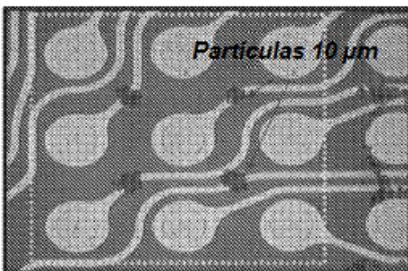


FIG. 17G

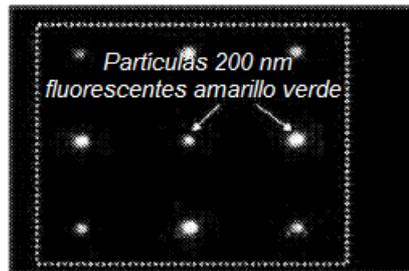


FIG. 17H

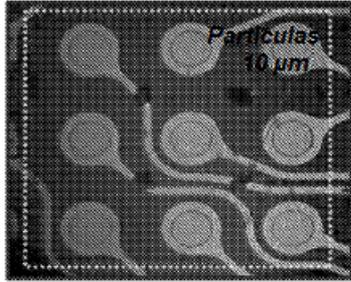


FIG. 18A

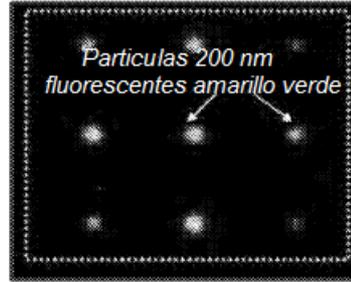


FIG. 18B

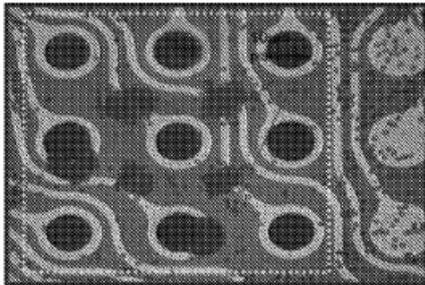


FIG. 18C

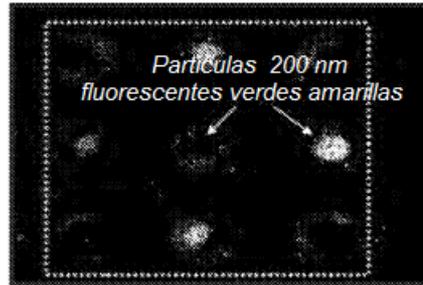


FIG. 18D

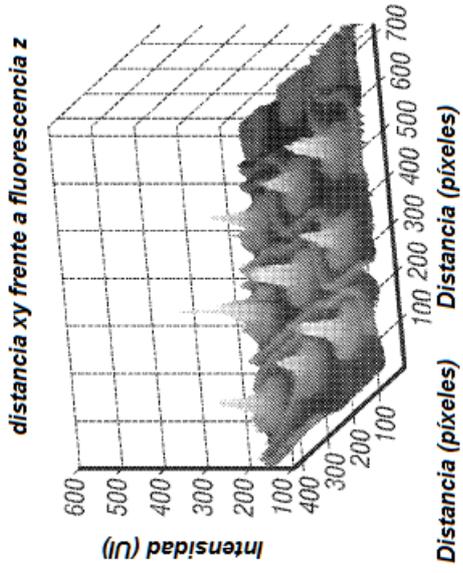


FIG. 19B

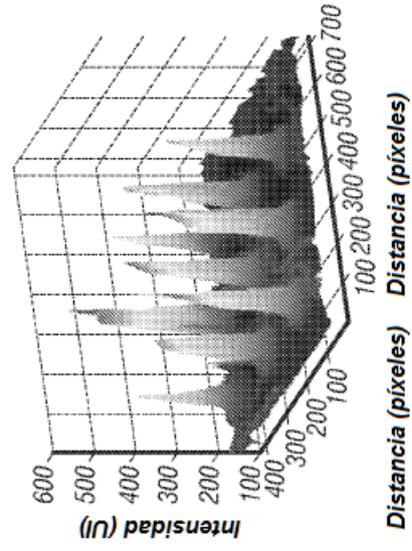


FIG. 19D

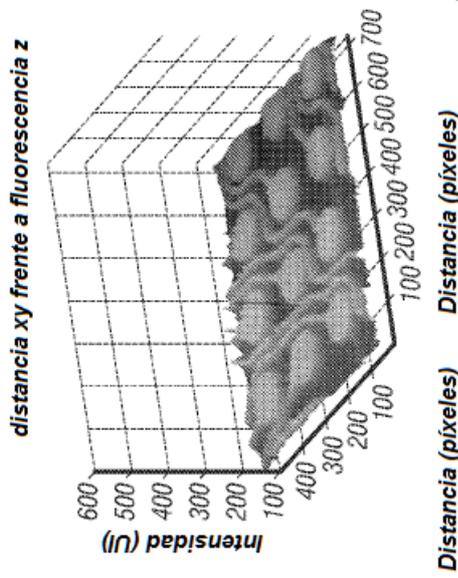


FIG. 19A

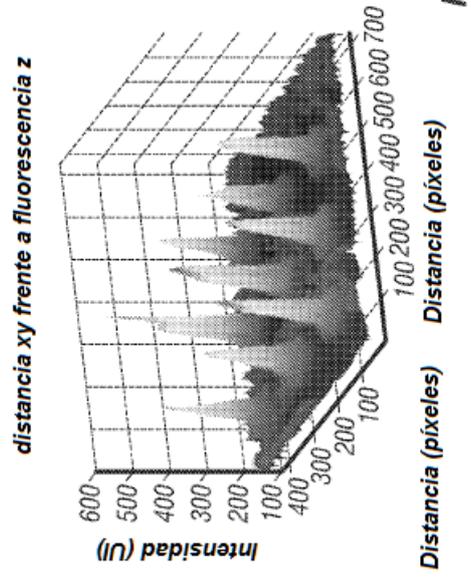


FIG. 19C

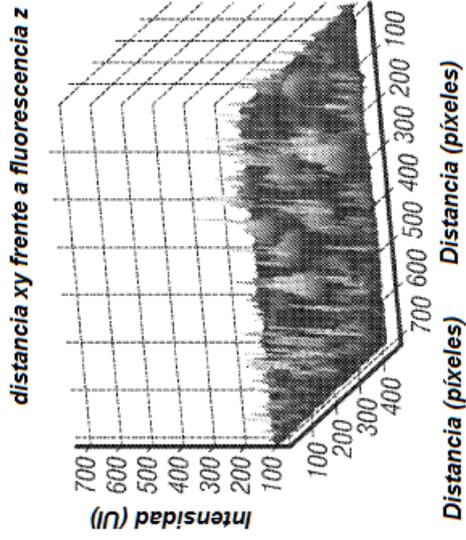


FIG. 19E

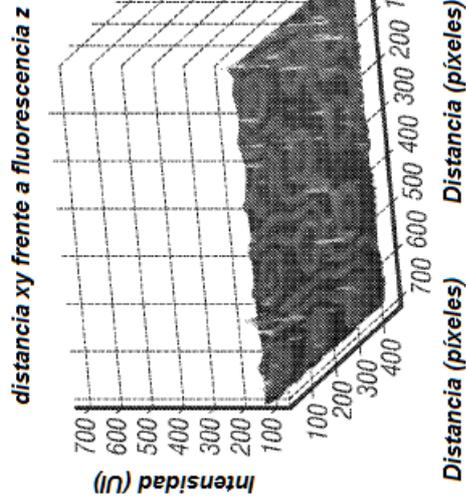


FIG. 19F

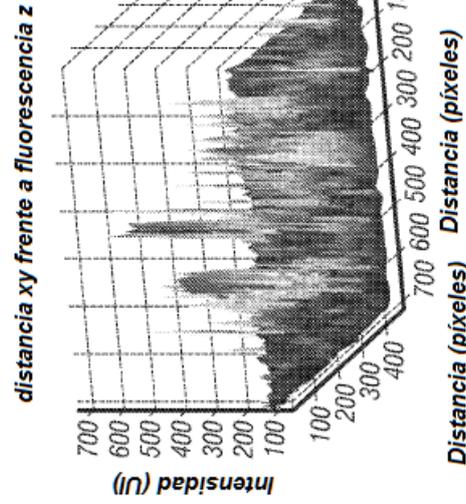


FIG. 19G

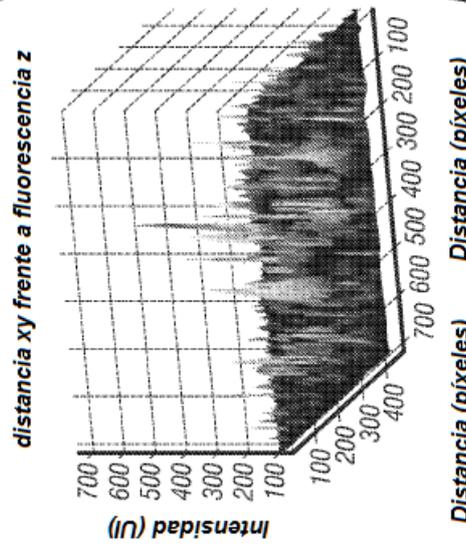


FIG. 19H

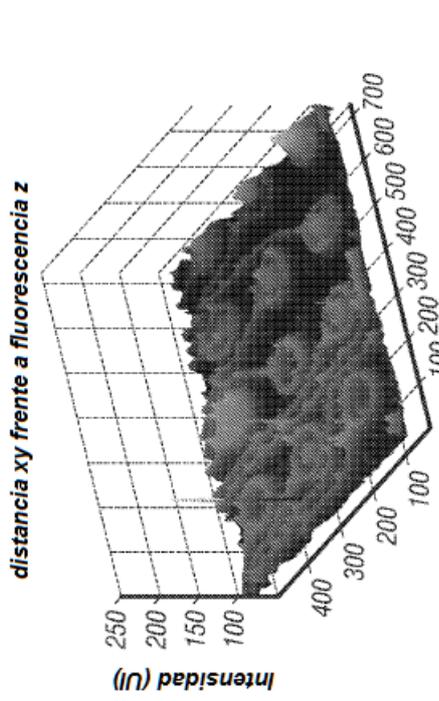


FIG. 20A

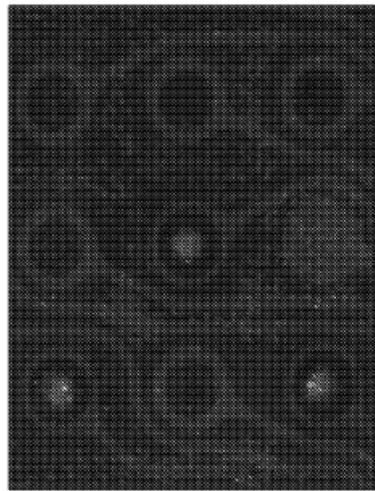


FIG. 20B

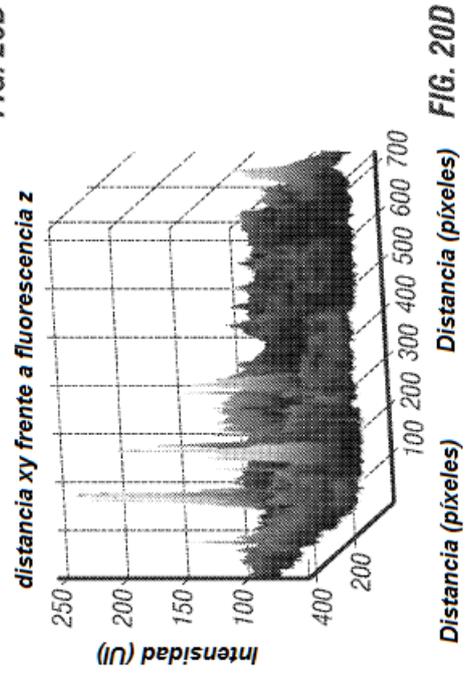


FIG. 20C

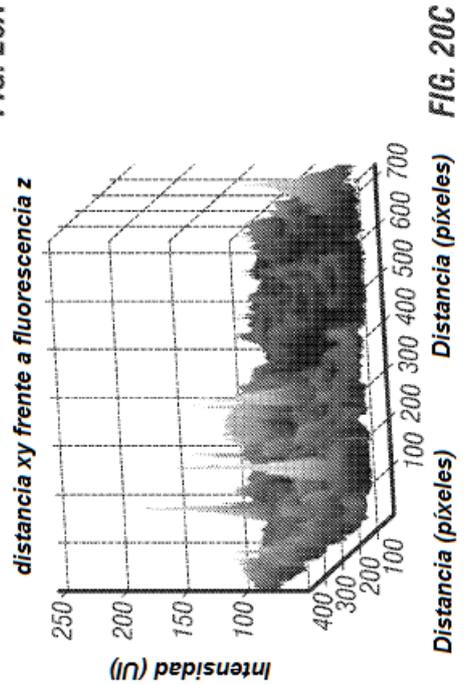


FIG. 20D

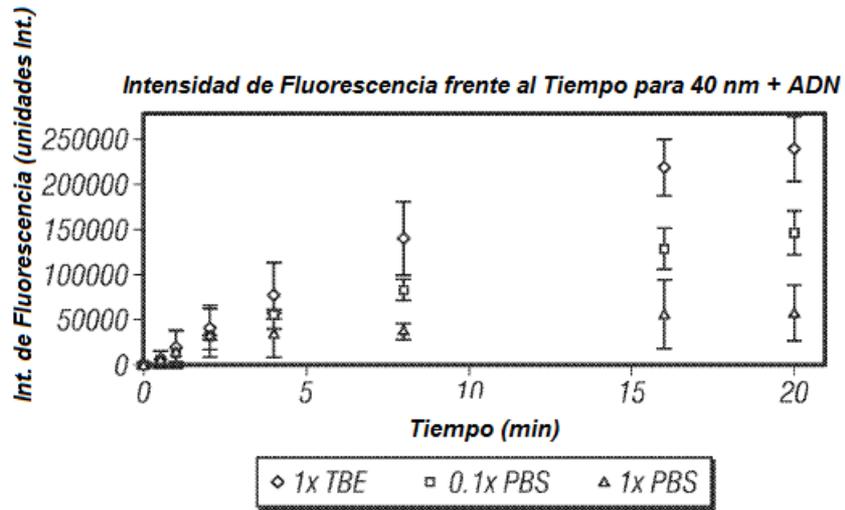


FIG. 21A

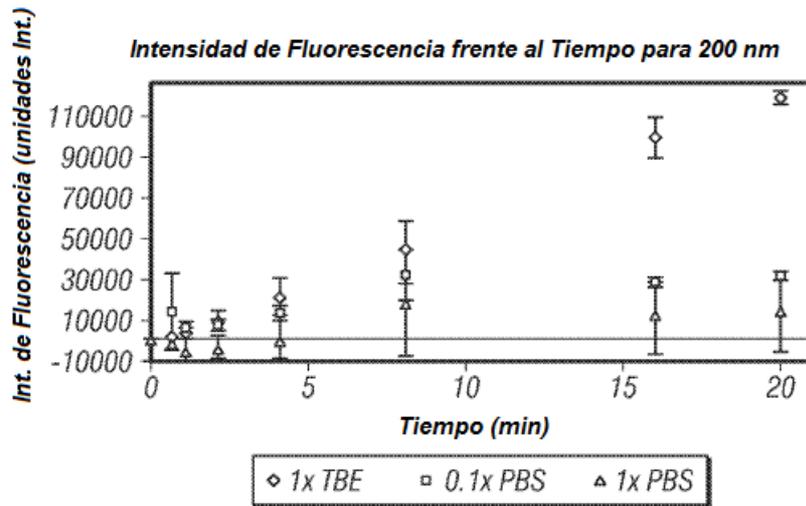


FIG. 21B

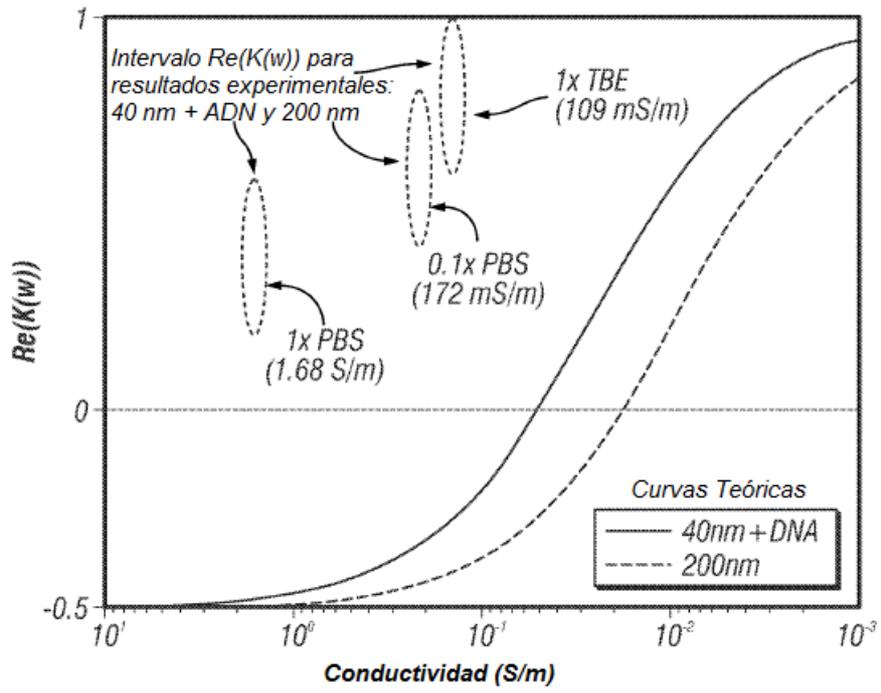


FIG. 22

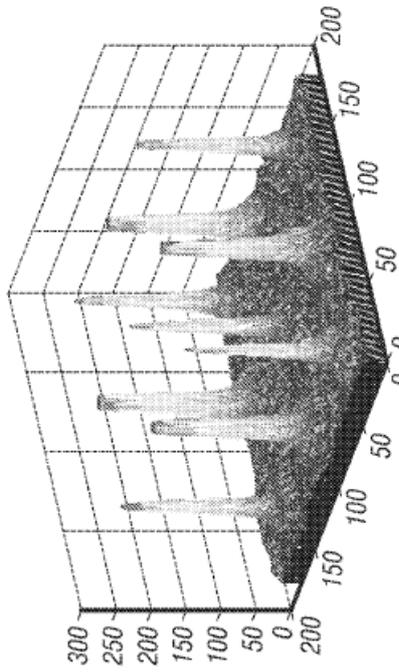


FIG. 23B

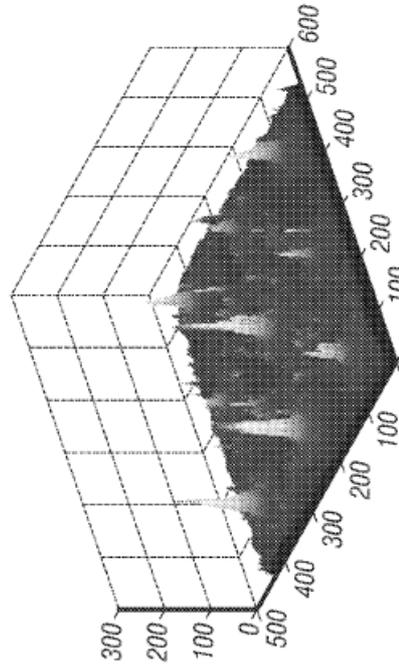


FIG. 23D

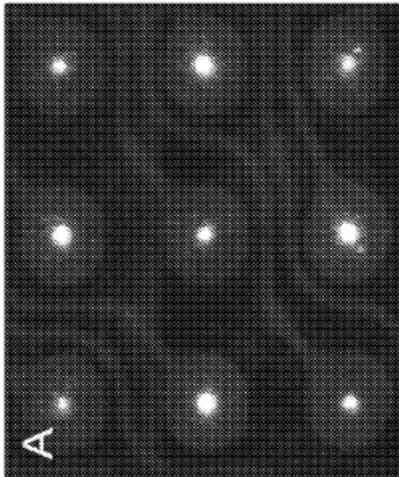


FIG. 23A

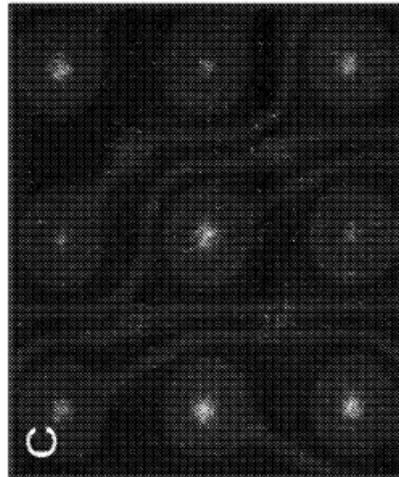


FIG. 23C

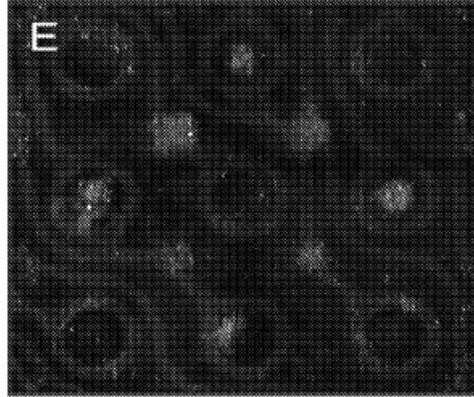


FIG. 23E

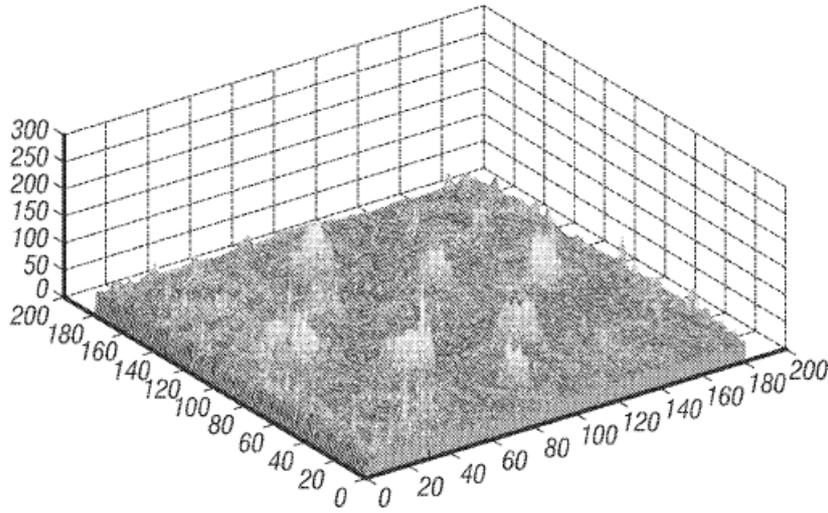


FIG. 23F

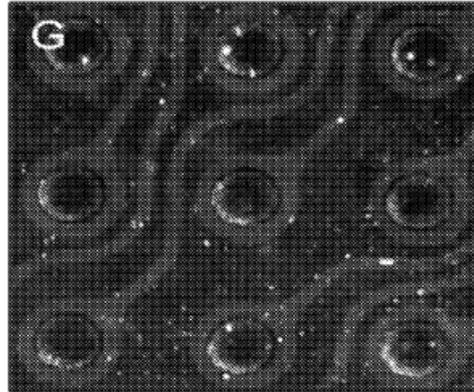


FIG. 23G

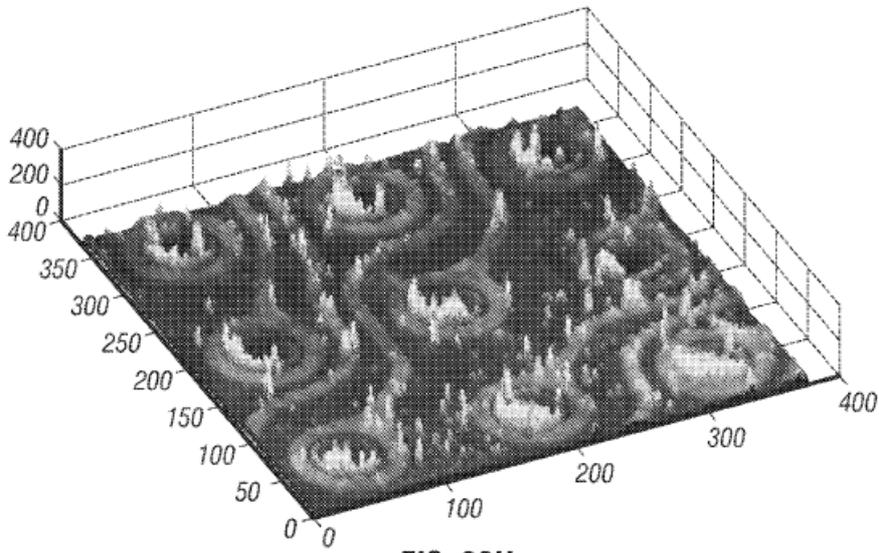


FIG. 23H

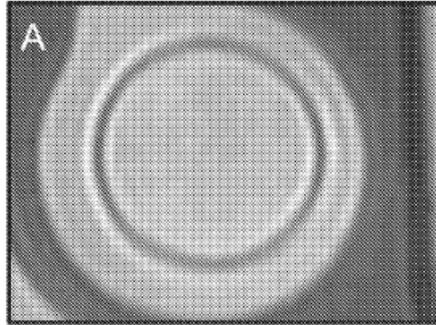


FIG. 24A

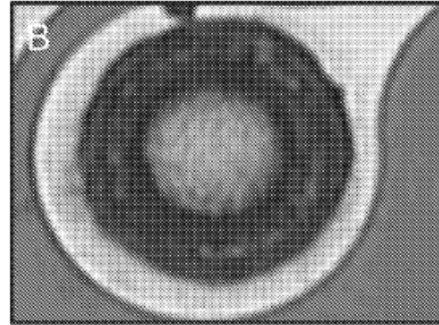


FIG. 24B

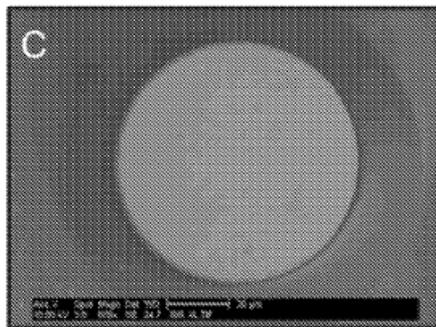


FIG. 24C

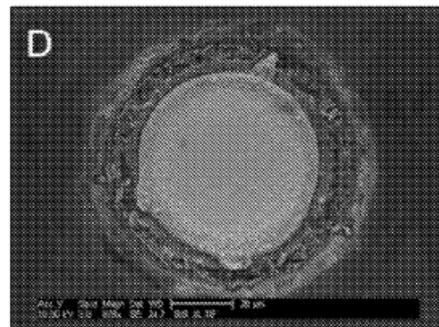


FIG. 24D

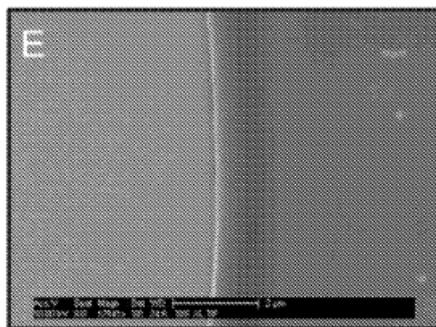


FIG. 24E

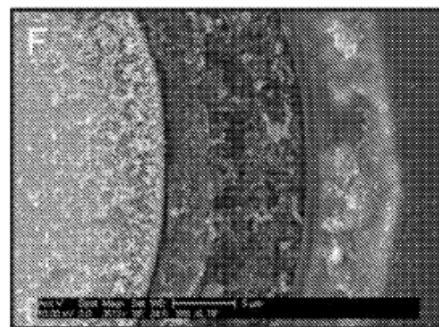


FIG. 24F

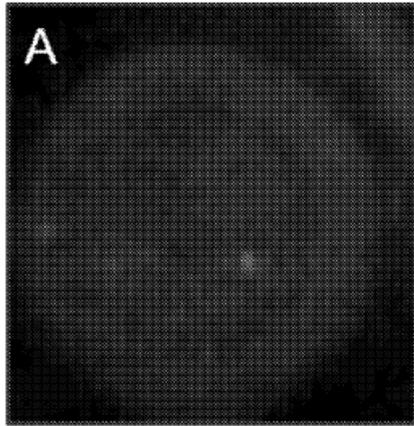


FIG. 26A

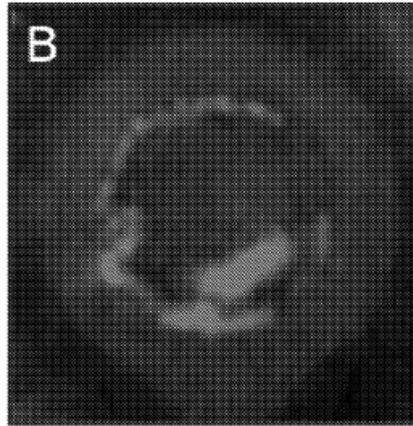


FIG. 26B

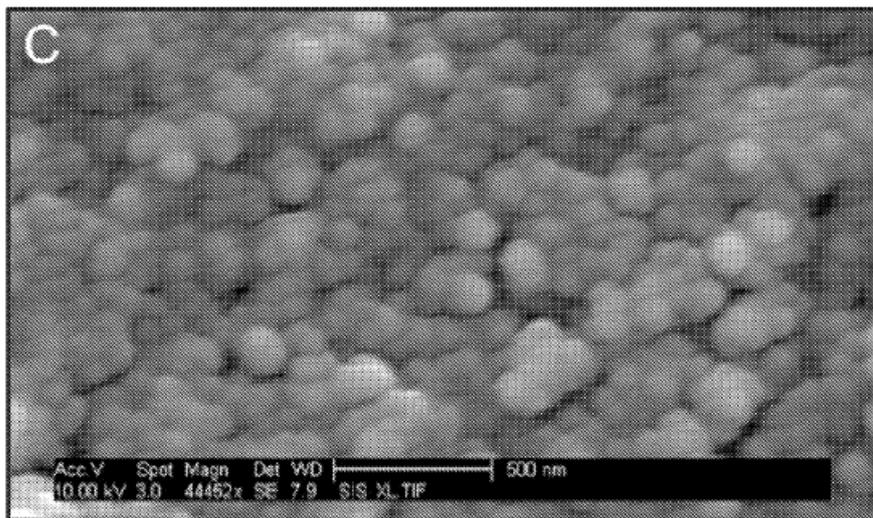


FIG. 26C

Muestra a Respuesta Ininterrumpida para Análisis Directo de Sangre, Plasma, Suero y Otras Muestras Biológicas

Etapa 1 - Muestra de sangre aplicada al dispositivo DEP

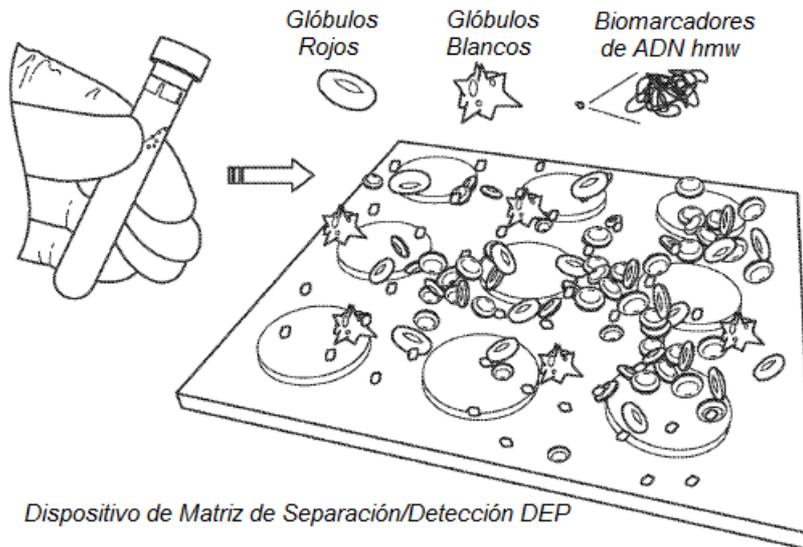


FIG. 27

**Etapa 2 - Se aplica el campo DEP (5 minutos)
Células se mueven a regiones de bajo campo y biomarcadores de ADN hmw a regiones de alto campo**

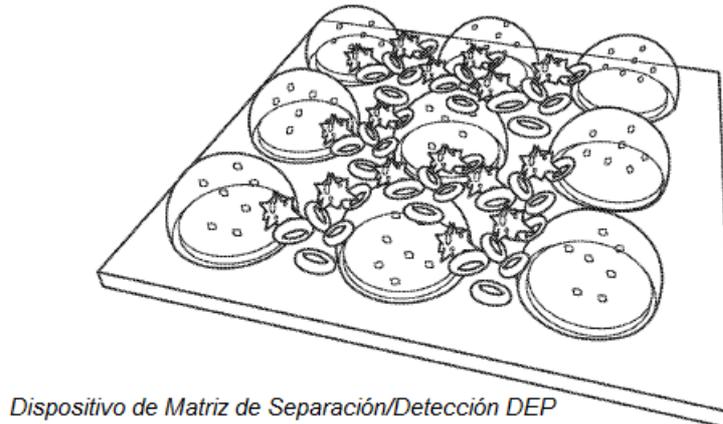
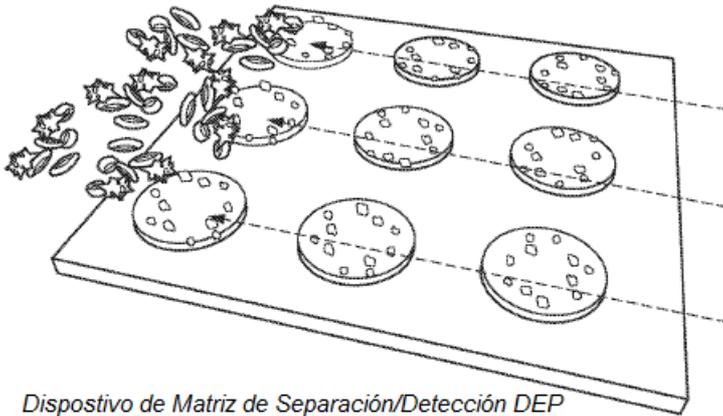


FIG. 28

Etapa 3 - Lavado fluido (1 minuto)
Las células de la sangre se separan mientras que los biomarcadores permanecen concentrados en regiones de otro campo



Dispositivo de Matriz de Separación/Detección DEP

FIG. 29

Etapa 4 - Añadir ADN Fluorescente/Teñir y Lavar ARN

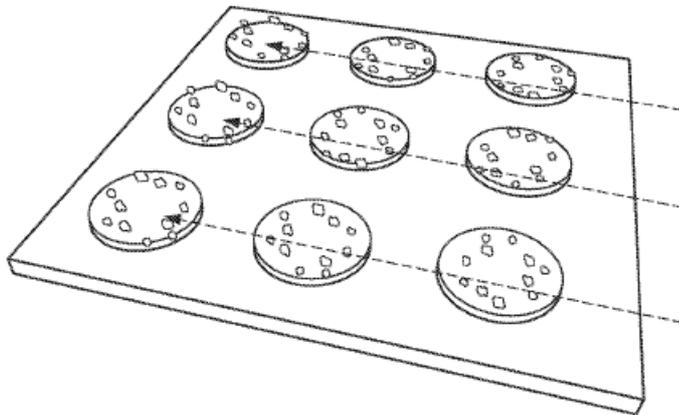


FIG. 30

Etapa 5 - Detectar y Cuantificar ADN/ARN Fluorescente

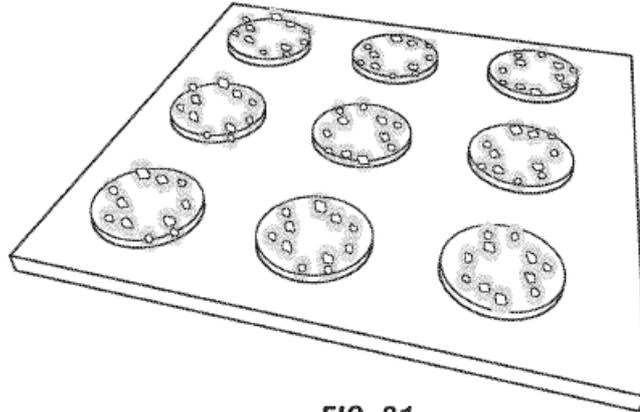


FIG. 31

Otros Biomarcadores y Analitos

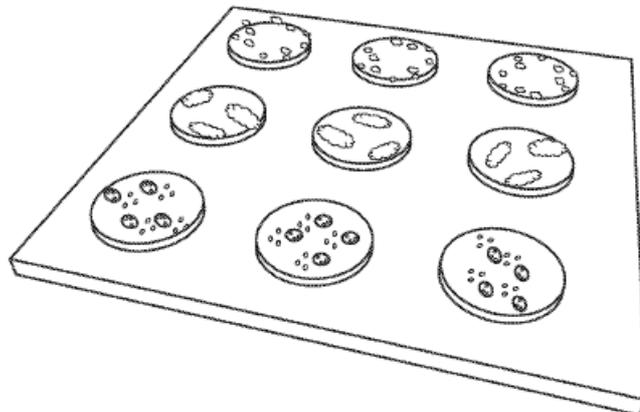
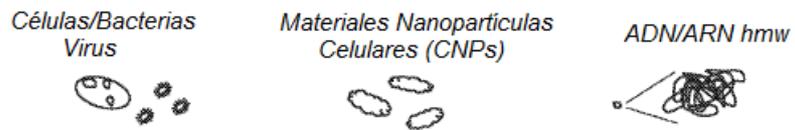


FIG. 32

PCR En Sitio o Análisis de Anticuerpos (15 minutos)

Procedimientos para detectar diversidad de biomarcadores y analitos incluyendo bacterias/virus, biomarcadores, ADN/ARN hmw y complejos de anticuerpos

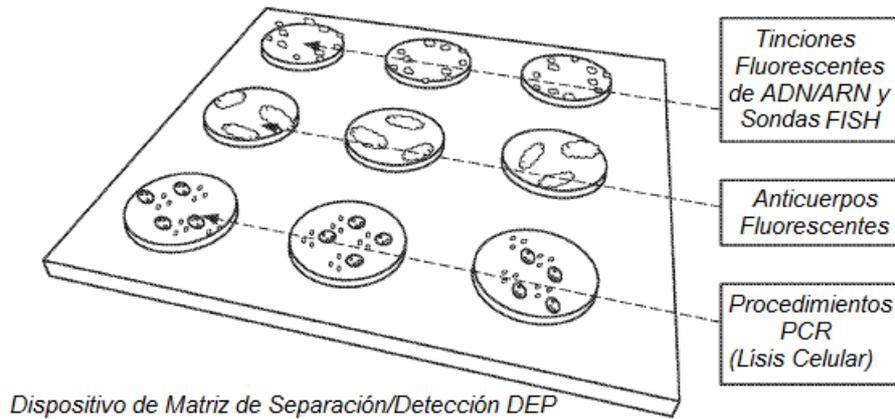


FIG. 33

Post-Tinción Fluorescente In-Situ, Inmunoensayo Fluorescente, Procedimientos FISCH y PCR para Diversidad de Biomarcadores y Analitos, Incluyendo Células, Bacterias/Virus, Materiales Nanopartículas Celulares (CNP), ADN/ARN hmw y Complejos de Anticuerpos

"Diagnósticos Ininterrumpidos a Muestras a Respuesta"

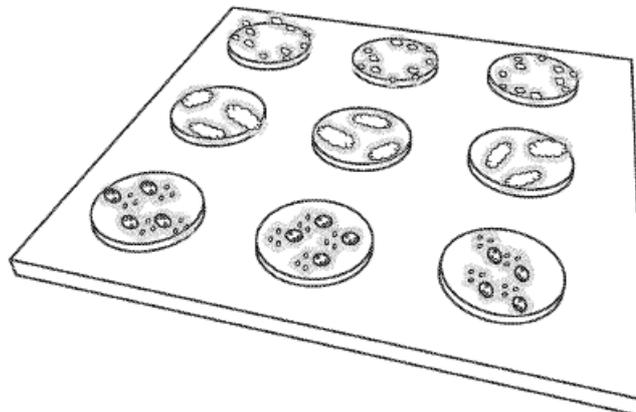


FIG. 34