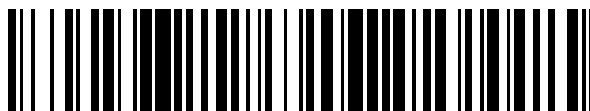


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 125**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/02** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2015 PCT/EP2015/054561**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132319**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015 E 15708494 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2019 EP 3113884**

54 Título: **Proceso para clasificación de células mediante componentes microfabricados usando una nucleasa**

30 Prioridad:

**05.03.2014 US 201461948493 P**

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

**26.12.2019**

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)  
Friedrich-Ebert-Strasse 68  
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**HÜBEL, TANNO;  
MILTENYI, STEFAN y  
NÖLLE, VOLKER**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 736 125 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**

Proceso para clasificación de células mediante componentes microfabricados usando una nucleasa

5 Esta invención se refiere a un proceso para clasificación de sistema de células usando un mecanismo de clasificación de células móvil, microfabricado con la asistencia de una nucleasa.

Antecedentes

10 Los sistemas microelectromecánicos (MEMS) son estructuras muy pequeñas, frecuentemente móviles que se construyen en un sustrato usando técnicas de procesamiento de superficie o de procesamiento litográfico masivo, tales como aquellas que se usan para fabricar dispositivos semiconductores. Los dispositivos MEMS pueden ser actuadores, sensores, válvulas, pistones o interruptores, por ejemplo, con dimensiones características de unos pocos micrones a

15 cientos de micrones. Un interruptor MEMS móvil, por ejemplo, puede usarse para conectar una o más terminales de entrada con una o más terminales de salida, todas microfabricadas en un sustrato. La actuación se refiere a que el interruptor móvil puede ser térmico, piezoeléctrico, electrostático, o magnético, por ejemplo. Los dispositivos MEMS pueden construirse además de manera que manipulan partículas que pasan por los dispositivos MEMS en una corriente de fluido.

20 Por ejemplo, un dispositivo MEMS puede ser una válvula móvil, que se usa como un mecanismo de clasificación para clasificar diversas partículas a partir de una corriente de fluido, tales como células a partir de la sangre. Las partículas pueden transportarse al dispositivo de clasificación en la corriente de fluido contenida en un microcanal, que fluye bajo presión. Una vez alcanzado el dispositivo de clasificación MEMS, el dispositivo de clasificación dirige las partículas de interés tal como una célula madre sanguínea, a un recipiente por separado, y dirige el resto de la corriente de fluido a un recipiente de desecho.

Previamente, los clasificadores de partículas existieron usando clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) y se conocen como citómetros de flujo. Los citómetros de flujo constituyen, de manera general, sistemas grandes y costosos que clasifican células sobre la base de una señal de fluorescencia a partir de una etiqueta que se fija a la célula de interés. Las células se diluyen y se suspenden en un fluido envolvente, y se separa luego en gotas individuales mediante descompresión rápida a través de una boquilla. Después de la eyección a partir de una boquilla, las gotas se separan en contenedores diferentes de manera electrostática, sobre la base de la señal de fluorescencia a partir de la etiqueta. Entre las cuestiones con estos sistemas se encuentran daño celular o pérdida de funcionalidad

30 debido a la descompresión, procedimientos de esterilización difíciles y costosos entre muestras, incapacidad para reclasificar subpoblaciones a lo largo de diferentes parámetros, y capacitación sustancial para apropiarse, operar y mantener estas piezas de equipo grandes y costosas. Debido a, al menos, estas razones, el uso de citómetros de flujo se ha restringido a hospitales y laboratorios grandes y la tecnología no se ha vuelto accesible para pequeñas entidades. Los sistemas de clasificación de células basados en MEMS pueden presentar ventajas sustanciales en cuanto a los citómetros de flujo en lo que se refiere a coste, velocidad y tamaño. Un número de patentes se han concedido las cuales se dirigen a tales dispositivos de clasificación de partículas basados en MEMS. Por ejemplo, patente U.S. No. 6,838,056 (la patente '056) se dirige a un dispositivo de clasificación de células basado en MEMS, la patente U.S. No. 7,264,972 b1 (la patente '972) se dirige a un actuador micromecánico para un dispositivo de clasificación de células basado en MEMS. La patente U.S. No. 7,220,594 (la patente '594) se dirige a estructuras ópticas que se fabrican con un aparato de clasificación de células MEMS y la patente U.S. nro. 7,229,838 (la patente '838) se dirige a un mecanismo de actuación para operar un sistema de clasificación de partículas basado en MEMS. De manera adicional, las solicitudes de patentes U.S. Nos. 13/374,899 (la solicitud '899) y 13/374,898 (la solicitud '898) proporcionan detalles adicionales de otros diseños MEMS. Entre los problemas que se detectan con el uso de dispositivos microfluidos en los sistemas de clasificación de células según se menciona anteriormente, se encuentran la obstrucción de los pases angostos, y la interfaz de estos pases angostos con el mundo macroscópico, y el control del movimiento de estos dispositivos móviles, muy pequeños. El documento US2012255373A1 divulga un proceso de clasificación de células diana y no diana a partir de una muestra celular mediante una válvula de clasificación de células microfabricada en una superficie de un sustrato de silicón. Tales sistemas tienden a obstruirse. Una solución posible con respecto a la obstrucción se sugiere en, por ejemplo, US2013079251A1 que se dirige a un método para procesar fluidos, en el que las células se lisan. Sin embargo, este método impediría un proceso de clasificación debido a que las células diana se destruirían también durante el procesamiento.

Sumario

60 Se describe un sistema de clasificación de células que hace uso de un chip MEMS de clasificación de células microfabricado. Los pases en el chip MEMS se forman de manera litográfica, y resultan, de este modo, muy pequeños. La obstrucción de estos pases angostos presenta un desafío importante en lo que se refiere a funcionamiento confiable, a largo plazo.

65 Objeto de la invención

El objeto de la invención consistió en impedir la obstrucción de pases en un chip MEMS durante un proceso de clasificación de células.

5 Se descubrió que la viscosidad de la muestra puede reducirse de manera significativa mediante la provisión por ejemplo de una DNasa independiente de cationes al regulador en el que las células para clasificar se suspenden. La adición de una nucleasa reduce o incluso elimina la obstrucción de los pequeños canales en el dispositivo.

10 En el proceso que se describe en la presente, se aplican diversos elementos de diseño para poder permitir un sistema de clasificación de células MEMS como tal. El mecanismo de clasificación puede ser una válvula de fluido MEMS que se forma en un sustrato de silicona, que se adhiere a un intercaldador y se instala en un cartucho desechable. El cartucho puede proporcionar la totalidad de los pases fluidos para el manejo del fluido de muestra, y puede incluir grandes recipientes (por ejemplo, recipientes de clasificación, muestra y desecho) para el almacenamiento de volúmenes de fluidos. Un intercaldador plástico se usa luego para proporcionar las interconexiones entre los pases microscópicos de la válvula de fluido MEMS y las características macroscópicas de los recipientes. La válvula de fluido MEMS, intercaldador y recipientes pueden ser contenidos en su totalidad en un cartucho desechable, de manera tal que la esterilización del sistema de clasificación de células resulta sencillo, el cartucho simplemente se desecha.

20 Un electroimán especialmente diseñado puede proporcionar los campos electromagnéticos localizados precisamente que originan que el chip MEMS muy pequeño se mueva en el sistema mucho más grande. Este electroimán minimiza el calor que se produce, y mejora de este modo la eficiencia. Finalmente, se usa una formulación especial de materiales fluidos para reducir o eliminar la obstrucción.

25 El cartucho desechable e intercaldador pueden incluir un número de características nuevas, tales como un mezclador, y regiones de forma de embudo que pueden asistir en el manejo de pequeños volúmenes de fluidos. El mezclador puede sumergirse en el recipiente de muestra, permitiendo así la mezcla de los contenidos. Las regiones de forma de embudo pueden proporcionarse en el recipiente de clasificación, el recipiente de muestra, y el recipiente de desecho, para la recolección de pequeños volúmenes de líquidos.

30 De acuerdo con esto, el objeto de la invención consiste en un proceso de clasificación de células diana y células no diana a partir de una muestra mediante una válvula de clasificación de células microfabricada en una superficie de un sustrato de silicona, con canales microfabricados que conducen a partir de la válvula de clasificación de células, en la que la válvula de clasificación de células separa las partículas diana a partir de material no diana; un cartucho desechable contiene un recipiente de muestra, un recipiente de clasificación y un recipiente de desecho; en la que la muestra se proporciona en un regulador que comprende nucleasa.

35 El proceso puede usar un sistema de clasificación de células que incluye además un electroimán con una punta cónica, bobinas y núcleo magnético, en el que la punta cónica sirve para concentrar las líneas de flujo que se producen mediante las bobinas y núcleo, y salir a partir del electroimán en las proximidades de la punta.

40 Breve descripción de los dibujos

Diversos detalles de ejemplo se describen con referencia a las siguientes figuras, en las que:

45 La Fig. 1 es una ilustración esquemática de un clasificador de chip MEMS en una primera posición; la Fig. 2 es una ilustración esquemática de un clasificador de chip MEMS en una segunda posición; la Fig. 3 es una ilustración esquemática de un sistema de clasificación de células MEMS de ejemplo que puede hacer uso del clasificador MEMS de las Figs. 1 y 2

50 La Fig. 4 es una vista del despiece de un cartucho desechable de ejemplo que puede usarse en el sistema de clasificación de células MEMS de la Fig. 3, que incluye un clasificador de chip MEMS y un intercaldador;

55 La Fig. 5a es una vista lateral del cartucho desechable de ejemplo que puede usarse en el sistema de clasificación de células MEMS de la Fig. 3, que incluye un clasificador de chip MEMS y un intercaldador; la Fig. 5b es una vista terminal del cartucho desechable de ejemplo;

La Fig. 6 es otra vista lateral del cartucho desechable de ejemplo que puede usarse en el sistema de clasificación de células MEMS de la Fig. 3, que incluye un clasificador de chip MEMS y un intercaldador

60 La Fig. 7 es una vista de planta de un intercaldador de ejemplo que puede usarse con el cartucho desechable de la Fig. 4; la Fig. 8a es una vista en perspectiva del intercaldador de ejemplo que puede usarse con el cartucho desechable de la Fig. 4, que muestra el lado opuesto al cartucho; la Fig. 8b es una vista en sección transversal de un canal; la Fig. 8c es una ilustración en sección transversal de otra realización de un canal;

65 La Fig. 9 es una vista en perspectiva del lado anverso del intercaldador de ejemplo;

La Fig. 10 es una vista en perspectiva del lado anverso del intercaldador de ejemplo;

La Fig. 11 es una vista en perspectiva del lado anverso del intercalador de ejemplo;

5 La Fig. 12a es una vista en planta del electroimán dirigido que puede generar el campo magnético que puede accionar el clasificador de chip MEMS de la primera posición (Fig. 1) a la segunda posición (Fig. 2), la Fig. 12b es una vista del cierre de la punta magnética; la Fig. 12c es una vista en perspectiva del electroimán dirigido;

10 La Fig. 13 muestra un método de ejemplo para la fabricación de la nucleasa para uso en el sistema de clasificación de células MEMS;

La Fig. 14 muestra un análisis de proteínas después del cultivo de células de *E. coli* recombinante y expresión de una nucleasa recombinante mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE);

15 La Fig. 15 muestra un análisis de nucleasa después de purificación mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE);

La Fig. 16 muestra la actividad de la nucleasa recombinante en comparación con las nucleasas dependientes de cationes que se disponen comercialmente;

20 La Fig. 17 muestra la actividad de la nucleasa recombinante en comparación con la nucleasa dependiente de cationes que se dispone comercialmente;

La Fig. 18 muestra la dependencia con respecto a la temperatura de la actividad de la nucleasa recombinante;

25 La Fig. 19 muestra la dependencia con respecto al pH de la actividad de la nucleasa recombinante;

Debería comprenderse que las figuras no se encuentran necesariamente a escala, y que números similares pueden referirse a características similares.

30 Descripción detallada

Se describe un método de clasificación de partículas diana a partir de materiales no diana en una corriente de fluido, usando una válvula móvil microfabricada (MEMS) o mecanismo de clasificación, que dirige la partícula diana de un pase de entrada de muestra a un pase de clasificación, mientras que permite que el material no diana fluya hacia un pase de desecho. Tanto el pase de clasificación como el de desecho conducen a un recipiente individual respectivo, el recipiente de clasificación y de desecho, y se almacenan hasta que se retiran. Los recipientes de clasificación, muestra y de desecho, junto con el clasificador de chip MEMS pueden contenerse en un cartucho desechable de plástico. Este cartucho puede descartarse después de que los fluidos se recolectan de los recipientes. Esto permite una carga que se reduce ampliamente para esterilización del sistema entre muestras. Los sistemas y métodos pueden tener además ventajas significativas en cuanto a costes, rendimiento, velocidad y complejidad. El sistema puede ser sustancialmente más suave en su manejo de células, de manera tal que la viabilidad de células en el vertido resulta ampliamente mejorada en comparación con los citómetros de flujo basados en gotas.

45 Debido a la naturaleza microfluida de este sistema de clasificación de células, las mediciones se toman para reducir o eliminar obstrucciones, y para manejar los pequeños volúmenes de fluidos, y para controlar la válvula móvil muy pequeña. Se usa un intercalador para proporcionar las interconexiones entre los pases microscópicos y las características macroscópicas. Finalmente, un electroimán que se diseña especialmente proporciona los campos electromagnéticos localizados precisamente que originan que el chip MEMS muy pequeño se mueva en el sistema mucho más grande. Este electroimán minimiza el calor que se produce, y mejora de este modo la eficiencia. Cada una de estas características se describe de manera adicional a continuación.

#### Nucleasa

55 Cuando se usa un dispositivo microfluido, la tendencia de las células a aglomerarse, coagularse u obstruirse en los canales puede poner en peligro la funcionalidad del dispositivo a largo plazo. Esto resulta especialmente cierto de materiales biológicos, tales como sangre o suspensiones celulares en los que las partículas de componentes tienen una fuerte tendencia a coagular. La tendencia del material a adherirse a las superficies de los canales pequeños puede causar un cambio en el dispositivo no conveniente, y posiblemente irreversible. Los cambios no deseados incluyen un aumento de la resistencia fluida posterior, contaminación de cualquier muestra posterior que se introduce en el dispositivo, y un cambio de los patrones de flujo en el dispositivo. Incluso pequeñas cantidades de ácidos nucleicos en la solución pueden aumentar la viscosidad o formar un arco de material de manera tal que los canales se obstruyen y las células en los canales no pueden transportarse a su destino. Según se divulga en la presente, este resultado puede reducirse o mejorarse mediante el uso de químicas particulares en la suspensión de fluido, según se describe a continuación.

65

Durante el cultivo celular, la lisis de células da como resultado la liberación de ácidos nucleicos tales como ADN en el medio de cultivo celular. Los ácidos nucleicos aumentan la viscosidad de soluciones acuosas y constituyen, por lo tanto, la principal razón de obstrucción de los canales angostos del chip MEMS y/o el intercalador.

5 La viscosidad de la muestra para procesar puede reducirse mediante la acción de enzimas que degradan ácido nucleico. En la siguiente descripción, tales enzimas se denominan como “nucleasas”. Las nucleasas con la capacidad de degradar ADN se denominan “DNAsa” y/o “RNAsa” cuando tienen la capacidad de degradar ARN. En la presente invención, el uso de DNAsa como nucleasa resulta preferido.

10 Con el fin de reducir la viscosidad tanto como sea posible, se prefiere que el ácido nucleico se degrade en fragmentos pequeños tanto como sea posible.

15 Para lograr esto, se prefiere el uso de una nucleasa no específica como DNasa I, Benzonase, y nucleasa S1. Las nucleasas no específicas no requieren una cierta estructura de ADN específica para cortar. En su lugar, son capaces de cortar ADN de cadena simple y/o doble independientemente de la estructura de ADN y secuencia.

20 Las nucleasas que se usan en la presente invención pueden ser dependientes de cationes, tales como DNasa I y Benzonase® (denominaciones comerciales de una nucleasa con propiedades de degradación de ADN y ARN), ambas disponibles comercialmente. Estas nucleasas requieren normalmente iones  $Mg^{2+}$  y/o  $Ca^{2+}$  para activarse (= degradación de ácidos nucleicos). En la ausencia de estos cationes o si estos cationes se complejizan con un agente quelante tal como EDTA, estas nucleasas no se activan, a saber, no resultan capaces de degradar ácidos nucleicos, dando como resultado la obstrucción del clasificador de células. De acuerdo con esto, cuando se usan nucleasas dependientes de cationes en el proceso de la invención, el regulador no deberá contener agentes quelantes, a saber, compuesto capaz de formar complejos con cationes.

25 En otra realización de la invención, se usan nucleasas independientes de cationes. En esta realización, el regulador puede contener uno o más agentes quelantes capaces de formar complejos con cationes.

30 El término “agente quelante” se refiere a todas las sustancias, químicos y moléculas que forman moléculas complejas, solubles con ciertos iones metálicos, inactivando así los iones de manera biológica de manera que no pueden interferir con otras moléculas como enzimas o células vivas o precipitar a partir del regulador. Los agentes quelantes según se usan en la presente solicitud incluyen, por ejemplo, EDTA (ácido etilendiaminetetraacético), EGTA (ácido tetraacético de etilenglicol), DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético) y fosfonatos.

35 Las células en cultivo celular requieren normalmente ciertas condiciones para sobrevivir y desarrollarse. Estas condiciones incluyen:

- 40 • valor de pH del regulador
- fuerza iónica del regulador
- 45 • temperatura
- EDTA (de otro modo, las células tienden a conglomerarse y pegarse entre ellas)

50 Por lo tanto, los requisitos para una nucleasa que resulta adecuada para la degradación de ácidos nucleicos durante la clasificación celular, y, por lo tanto, la reducción de viscosidad incluyen:

- 55 • activa a pH ~ 7,2 – 7,6
- activa a temperaturas entre 4 °C y 37 °C
- activa en la presencia de iones fosfato e iones de sales
- de manera opcional, activa en la presencia de EDTA y, por lo tanto, en la ausencia de cationes libres como  $Ca^{2+}$  o  $Mg^{2+}$
- 60 • activa en la presencia de sustancias que se liberan mediante células (distintas de ácidos nucleicos)

Para degradación eficiente de ácidos nucleicos en el proceso de la invención usando un dispositivo microfluído, la nucleasa debería también:

- 65 • degradar ácidos nucleicos de manera no específica, a saber, la degradación debería restringirse a una pequeña población de ácidos nucleicos

- degradar ácidos nucleicos “rápido” (tiempos de incubación de minutos y no horas)

5 Las nucleasas disponibles comercialmente que funcionan con pH bastante neutral no resultan compatibles con EDTA, a saber, son dependientes de cationes ya que estas requieren de cationes para la actividad:

- Benzonase® (y variantes copiadas de esta tales como Denarase®): Mg<sup>2+</sup>

10 • Cryonase™: Mg<sup>2+</sup>

- DNasa I, bovino: Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

15 • DNasa, humana (Dornase alfa): Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>

- DNasa, camarón: Mg<sup>2+</sup>

- Nucleasa, micrococo (S. aureus): Ca<sup>2+</sup>

20 • Nucleasa S1: Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>

- Nucleasa S7: Ca<sup>2+</sup>

25 Una nucleasa compatible con EDTA que resulta compatible con los requisitos anteriores (pH, por ejemplo) resultaría beneficiosa en cuanto a la reducción de viscosidad en las condiciones de clasificación de células y resultaría, por lo tanto, beneficiosa también para impedir obstrucción en medios microfluidos.

30 Una DNasa compatible con EDTA, por ejemplo, según se describe en el ejemplo, resulta beneficiosa para la clasificación de células en un medio microfluido según se divulgan en la presente invención. La lisis de células y la liberación de ADN a partir de las células resulta especialmente un problema en canales que tienen una escala microfluida, debido a que incluso pequeñas cantidades de ADN pueden aumentar la viscosidad de la solución, dando como resultado la obstrucción de los canales.

35 La nucleasa y, de manera opcional, el agente quelante pueden agregarse a la muestra ya provista en un regulador. Pueden agregarse al regulador en el que la muestra se suspende para clasificación. En cualquier caso, la muestra final que comprende células y regulador se proporciona preferiblemente con 1 a 100 U/mL de nucleasa y, de manera opcional, 0,1 a 5 mmol/l de agente quelante.

40 Clasificador de células/chip MEMS

45 La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un mecanismo de clasificación de células microfabricado, clasificador 10 de chip MEMS, que puede usarse en el proceso de clasificación de partículas que se describe en la presente. Los detalles del mecanismo de clasificación de células pueden encontrarse en la solicitud de patente US nro. de serie 13/998,095. Entre las características únicas del mecanismo 10 de clasificación de células microfabricado se incluye que el movimiento de la válvula 10 de clasificación de células se encuentra en paralelo con respecto al plano de fabricación de la válvula. De manera adicional, el canal 140 de desecho es sustancialmente ortogonal con respecto al canal 120 de entrada de muestra y el canal 122 de salida de clasificación. Estas características permiten distintas ventajas en cuanto a velocidad y precisión, rendimiento de válvula y facilidad de la clasificación microfluida.

50 Debería comprenderse que el término 10 “clasificador de chip” es un término abreviado para una válvula 10 de clasificación de células microfabricada, ya que un “chip” es un dispositivo microfabricado en un sustrato. Ambos términos se dirigen a designar una válvula móvil microfabricada que se forma en una superficie de un sustrato, usando técnicas de fabricación MEMS, la que, mediante su movimiento, resulta capaz de separar partículas diana a partir de material no diana.

55 En la ilustración de vista en planta de la Fig. 1, el clasificador de chip MEMS nuevo o válvula 10 de clasificación de células se encuentra en la posición de reposo (no accionada). El clasificador 10 de chip puede incluir una válvula fluida microfabricada o miembro 110 móvil (área incubada) y un número de canales 120, 122 y 140 fluidos microfabricados. El canal 140 fluido microfabricado (que se muestra como área 140 discontinua en Fig. 1 y Fig. 2) sirve como canal de salida y puede localizarse directamente por debajo de al menos una porción del miembro 110 microfabricado y no se encuentra en paralelo con respecto al plano de los canales 120, 122 fluidos microfabricados o el miembro 110 microfabricado. El miembro 110 microfabricado se fabrica y se mueve en una ruta en paralelo o en este plano. Preferiblemente, el canal 140 fluido microfabricado es ortogonal con respecto al plano de los canales 120, 122 fluidos microfabricados y la ruta de movimiento del miembro 110 microfabricado. La apertura del canal 140 fluido microfabricado puede cubrir, preferiblemente se superpone, con respecto a al menos una porción de la ruta de movimiento del miembro 110 microfabricado, a saber, el área discontinua se superpone con el miembro 110

microfabricado en al menos una porción de su movimiento, según se muestra en la Fig. 1 y Fig. 2. Esta superposición puede permitir que exista una ruta de fluido entre el canal 120 de entrada y el canal 140 de salida cuando el miembro microfabricado se encuentra en la posición de "desecho" o no accionada (Fig. 1), y esta ruta se cierra y las partículas se redirigen en la posición de "clasificación" o de actuación (Fig. 2). Según se describe anteriormente, esta arquitectura puede reducir la resistencia de fluido, aumentando así la velocidad del miembro 110 microfabricado.

El miembro 110 móvil y los canales 120, 122 y 140 fluidos microfabricados pueden formarse en la superficie de un sustrato adecuado, tal como un sustrato de silicón, usando técnicas litográficas de fabricación MEMS según se describe en mayor detalle en la solicitud '095. El sustrato de fabricación puede tener un plano de fabricación en el que el dispositivo se forma y en el que el miembro 110 móvil se mueve.

Una corriente de muestra puede introducirse en el miembro 110 móvil microfabricado mediante un canal 120 de entrada de muestra. El fluido de muestra puede almacenarse en un recipiente 20 de muestra antes de la clasificación mediante un miembro 110 móvil. La corriente de muestra puede contener una mezcla de partículas, incluyendo al menos una partícula diana conveniente y un número de otras partículas no diana, no convenientes. Las partículas pueden suspenderse en un fluido. Por ejemplo, la partícula diana puede ser un material biológico tal como una célula madre, una célula cancerígena, un cigoto, una proteína, una célula T, una bacteria, un componente sanguíneo, un fragmento de ADN, por ejemplo, que se suspende en un fluido regulador tal como solución salina, o la química nueva que se describe a continuación. El canal 120 de entrada puede formarse en el mismo plano de fabricación que el miembro 110 móvil, de manera tal que el flujo del fluido se encuentra sustancialmente en ese plano. El movimiento de la válvula 10 de clasificación de células se encuentra también en este plano de fabricación. La decisión en cuanto a clasificar/salvar o retirar/desechar una partícula dada puede basarse en cualquier número de señales distintivas. En una realización de ejemplo, la decisión se basa en una señal fluorescente que se emite mediante la partícula, sobre la base de una etiqueta de fluorescencia que se fija a la partícula y se excita mediante un láser de iluminación. La región 200 de interrogación de láser consiste en la porción del pase microfluído en el que un láser de iluminación o interrogación se dirige a la partícula diana, con el fin de distinguirla con respecto a los otros constituyentes de la muestra de fluido. Los detalles con respecto a este mecanismo de detección se conocen bien en la bibliografía y se analizan a continuación de manera adicional con respecto a la Fig. 3. Sin embargo, se pueden anticipar otras clases de señales distintivas, que incluyen luz dispersa o luz dispersa lateral que puede basarse en la morfología de una partícula, o cualquier número de efectos mecánicos, químicos, eléctricos o magnéticos que pueden identificar una partícula en cuanto a ya sea si se trata de una partícula diana, y clasificarla o salvarla, de este modo, o una partícula no diana, y rechazarla o de otra manera, desecharla de este modo.

Con el miembro 110 móvil en la posición que se muestra, la corriente de entrada pasa libre a una canal 140 de salida de desecho que se encuentra fuera del plano del canal 120 de entrada, y, de este modo, por fuera del plano de fabricación del clasificador 10 de chip MEMS. Esto es, el flujo existe a partir del canal 120 de entrada al orificio 140 de salida, a partir del cual fluye sustancialmente de manera vertical, y, de este modo, de manera ortogonal con respecto al canal 120 de entrada. Este orificio 140 de salida conduce a un canal fuera de plano que puede ser perpendicular con respecto al plano del papel que se muestra en la Fig. 1. De manera más general, el canal 140 de salida de desecho no es paralelo con respecto a al menos uno del plano del canal 120 de entrada o canal 122 de clasificación, o el plano de fabricación del miembro 110 móvil. En una realización, los canales de clasificación y muestra pueden ser antiparalelos, esto es, el flujo en el canal de clasificación se encuentra en dirección opuesta con respecto al flujo en el canal de muestra de ingreso.

De acuerdo con esto, el sistema de clasificación de células puede incluir una válvula 10 de clasificación de células, que dirige las partículas diana de un canal 120 de muestra a un canal 122 de clasificación que se forma en el sustrato de silicón y el material no diana del canal 120 de muestra a un canal 140 de salida de desecho que se forma también en el sustrato de silicón. La válvula 10 de clasificación de células puede moverse también en un plano paralelo con respecto a la superficie, y dirigir las partículas diana del canal 120 de muestra al canal 140 de desecho cuando la válvula 10 de clasificación de células microfabricada se encuentra en una primera posición, y que dirige las otras partículas al canal 122 de clasificación cuando se encuentra en una segunda posición, en el que el canal 122 de clasificación y el canal 140 de desecho son sustancialmente antiparalelos, y el canal 120 de muestra y canal 140 de desecho son sustancialmente ortogonales. El canal 140 de salida de desecho puede tener un orificio, que puede ser un orificio que se forma en el sustrato de fabricación, o en un sustrato de cubierta que se une al sustrato de fabricación. Además, el miembro 110 móvil puede tener una superficie 112 de desvío curva que puede redirigir el flujo de la corriente de entrada a una corriente de salida de clasificación. El contorno de la superficie 112 puede ser de manera tal que redirige la corriente de muestra del canal 120 de entrada al canal 122 de clasificación en una posición, mientras que permite que fluya al canal 140 de salida de desecho en otra posición. De acuerdo con esto, al superponerse la superficie 112 con el canal 120 de entrada, existe una vía para que la corriente de entrada fluya directamente al canal 140 de salida de desecho cuando el miembro 110 móvil se encuentra en la posición de desecho no accionada, según se muestra en la Fig. 1. El canal 140 de salida de desecho puede conducir a un recipiente 40 de desecho, que puede recolectar el material no diana. El material 116 magnéticamente permeable incrustado en el miembro 110 móvil puede originar su movimiento, y se describirá a continuación en la descripción de la Fig. 2.

La Fig. 2 es una vista en planta del clasificador 10 de chip MEMS en la posición de actuación. En esta posición, el miembro 110 móvil o válvula 10 se desvía hacia arriba en la posición que se muestra en la Fig. 2. La superficie 112

de desvío curvada es un contorno de clasificación que redirige el flujo del canal 120 de entrada al canal 122 de salida de clasificación. El canal 122 de salida puede yacer en sustancialmente el mismo plano con respecto al canal 120 de entrada, de manera tal que el flujo entre el canal 122 de clasificación se encuentra también en sustancialmente el mismo plano con respecto al flujo en el canal 120 de entrada. Puede existir un ángulo  $\alpha$  entre el canal 120 de entrada y el canal 122 de clasificación. Este ángulo puede ser de cualquier valor hasta aproximadamente 90 grados. La actuación del miembro 110 móvil puede surgir de una potencia a partir de un aparato 400 generador de potencia, que se muestra de manera general en la Fig. 2. En algunas realizaciones, el aparato 400 generador de potencia puede ser un electroimán, según se describe anteriormente. Sin embargo, debería comprenderse que el aparato generador de potencia puede ser electrostático, piezoeléctrico, o algún otro medio para generar una potencia en el miembro 110 móvil, haciendo que se mueva de una primera posición (Fig. 1) a una segunda posición (Fig. 2). El canal 122 de clasificación puede conducir a un recipiente 22 de clasificación que recolecta las partículas diana, clasificadas como vertido a partir de la válvula móvil en la posición que se muestra en la Fig. 2. El canal 120 de entrada puede conducir el fluido de muestra de un recipiente 20 de muestra al canal 140 de desecho y recipiente 40 de desecho según se mostró en la Fig. 1, o al canal 122 de clasificación y recipiente 22 de clasificación, según se muestra en la Fig. 2.

En algunas realizaciones, el aparato 400 generador de potencia puede incluir bobinas que generan un campo magnético, que interactúa luego con el miembro 110 móvil. Con el fin de hacer que el miembro 110 móvil responda a una potencia electromagnética como tal, puede tener un material magnéticamente permeable incrustado en la válvula 110 móvil. La magnitud de este material 116 magnético incrustado puede ser justo del interior del borde del contorno del miembro 110 móvil según se muestra mediante las líneas discontinuas en las Figs. 1 y 2.

Debería comprenderse que un material magnéticamente permeable hace referencia a cualquier material que resulta capaz de soportar la formación de un campo magnético en sí mismo. En otras palabras, la permeabilidad de un material consiste en el grado de magnetización que el material obtiene como respuesta a un campo magnético aplicado.

Los términos "material permeable" o "material con alta permeabilidad magnética" según se usan en la presente deberían comprenderse como un material con una permeabilidad que es alta en comparación con la permeabilidad del aire o vacío. Esto es, un material permeable o material con alta permeabilidad magnética es un material con una permeabilidad relativa (en comparación con aire o vacío) de al menos aproximadamente 100, esto es, 100 veces la permeabilidad del aire o vacío, que es de aproximadamente  $1,26 \times 10^{-6} \text{ H} \cdot \text{m}^{-1}$ . Existen muchos ejemplos de materiales permeables, incluyendo aleaciones de cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni) y hierro (Fe). Un material permeable popular se conoce como Permalloy, que tiene una composición de entre aproximadamente el 60% y aproximadamente el 90% de Ni y el 40% y 10% de hierro. La composición más común es 80% de Ni y 20% de Fe, que tiene una permeabilidad relativa de aproximadamente 8.000. De acuerdo con esto, el miembro 110 móvil puede tener material 116 de permalloy incrustado en el miembro 110 móvil y planarizado posteriormente de manera tal que el perfil de la válvula móvil permanece plano. Detalles adicionales con respecto a la fabricación de tales características permeables pueden encontrarse en la solicitud de patente '095.

Se conoce bien a partir de los magnetoestáticos que los materiales permeables se atraen en áreas en las que las líneas de flujo magnético se concentran, con el fin de reducir la resistencia de la ruta provista por el material permeable al flujo. De acuerdo con esto, un gradiente en el campo magnético impulsa el movimiento del miembro 110 móvil debido a la presencia de material 116 permeable incrustado, hacia áreas que tienen una concentración alta de flujo magnético. Esto es, el miembro 110 móvil con material 116 permeable incrustado será atraído en la dirección de gradiente positivo en el flujo magnético. Un diseño de núcleo nuevo se describe a continuación con respecto a las Figs. 10a-10c, que concentra las líneas de flujo en un área muy específica, para optimizar el control sobre el miembro 110 móvil.

Debería comprenderse que la realización magnetoestática que se describe anteriormente resulta sin embargo una de un número de mecanismos de actuación que pueden usarse para mover la válvula de clasificación de células o clasificador 10 de chip. De manera más general, el sistema de clasificación de células puede construirse con una válvula 10 de clasificación de células, en la que cuando la válvula 10 de clasificación de células se encuentra en una primera posición, se forma un pase entre el canal 120 de muestra y el canal 140 de desecho. Cuando la válvula 10 de clasificación de células se encuentra en la segunda posición, se forma un pase entre el canal 120 de muestra y el canal 122 de clasificación. La válvula 10 de clasificación de células puede moverse a partir de la primera posición a la segunda posición como respuesta a la aplicación de una potencia, y esa potencia puede ser al menos una de mecánica, electrostática, magnetostática, piezoeléctrica y electromagnética. En la realización electromagnética, un material magnético permeable se incrusta en el miembro 110 móvil de la válvula 10 de clasificación de células microfabricada, y se proporciona una fuente 400 de flujo magnético. El flujo magnético interactúa con el material 116 magnético permeable incrustado para mover la válvula 10 de clasificación de células microfabricada, según lo cual la válvula de clasificación de células microfabricada se mueve de la primera posición a la segunda posición cuando la fuente 400 de flujo magnético se activa.

Detección celular

La Fig. 3 es una ilustración esquemática del sistema 1 de clasificación de células que puede usar pases microfluidos, un clasificador 10 de chip MEMS que se aloja en un cartucho 1000 desechable, y un aparato 400 generador de flujo.



Lo que sigue a continuación es una descripción de algunos otros componentes del sistema y la forma en que interactúan con el clasificador 10 de chip MEMS. En particular, la Fig. 3 establece la ruta óptica del láser de interrogación para la región 200 de interrogación, y el control de flujo de fluido en los canales 120-140 y control del clasificador 10 de chip MEMS. Después de la descripción del nivel del sistema, el análisis girará hacia las características únicas del sistema 1 que permiten que el sistema 1 microfluidado trabaje de una manera precisa, confiable y predecible.

Según se muestra en la Fig. 3, el clasificador 10 de chip MEMS puede alojarse en un cartucho 1000 desechable, que puede cargarse en una etapa móvil y orientarse con respecto a ópticas 2100 de detección y láseres 2400 de interrogación en el sistema 1 de clasificación de células. El fluido fluye luego a través del clasificador 10 de chip MEMS de los recipientes de fluido que se alojan también en el cartucho 1000 desechable a través de una serie de pases según se describirá a continuación con respecto a las Figs. 4-9.

En el funcionamiento normal del sistema 1, la partícula diana puede ser una célula en particular, tal como una célula madre, o una célula cancerígena, la cual se ha etiquetado con un marcador fluorescente. Este marcador emite fotones que tienen una energía particular cuando se irradian con un láser 2400 que opera a una longitud de onda predeterminada. De acuerdo con esto, en este sistema de clasificación de células, una fuente 2400 de láser puede dirigirse mediante un espejo 2250 de inflexión a través de ópticas 2100 de detección/recolección a la región 200 de interrogación de láser que se mostró en las Figs. 1 y 2. El eje óptico de las ópticas 2100 de detección/recolección y la fuente 2400 de láser pueden ser colineales, al menos en una porción de la ruta óptica. De este modo, la orientación de la aplicación de láser y detección óptica a lo largo de este eje óptico puede ser perpendicular u ortogonal con respecto al plano de fabricación del sustrato, ortogonal con respecto al plano de movimiento de la válvula 110 móvil y ortogonal con respecto al flujo del fluido de muestra a través de la región de detección.

La fluorescencia que se emite a partir de las partículas irradiadas puede moldearse mediante ópticas 2100 de detección/recolección y separarse mediante espejos 2200 dicróicos y dirigirse a un banco 2300 de fotodetectores. Una pluralidad de fotodetectores puede alojar múltiples longitudes de onda de luz emitida, para detección multiparamétrica. El rendimiento de señal mediante los fotodetectores 2300 indica la presencia o ausencia de la partícula diana en la región 200 de interrogación de láser. La señal puede entregarse a un controlador 2900 que administra la sincronización relativa de los componentes en el sistema 1 de clasificación de partículas, y recolecta los datos. El controlador 2900 puede ser un ordenador de propósito general o un circuito especializado o ASIC. Una vez que se detecta la partícula diana, se genera una señal mediante el controlador 2900 que energiza el aparato 400 generador de potencia o generador de flujo. El controlador 2900 puede proporcionar además el control fluido del clasificador 10 de chip MEMS, mediante uno o más mecanismos basados en potencia neumática, hidráulica, basados en pistón o mecánica que se ilustran de manera general mediante el medio 2500 de control de fluido. La velocidad a la que las partículas se detectan puede monitorearse mediante el controlador 2900 que puede mantener el medio 2500 de control de fluido.

El aparato 400 generador de potencia es un dispositivo que origina una potencia que surge en el propio miembro 110 móvil, originando el movimiento del miembro móvil. Este aparato 400 generador de potencia puede no acoplarse directamente de manera mecánica al dispositivo 10 de manipulación de partículas MEMS, según se indica mediante la línea discontinua en la Fig. 3. Por ejemplo, el aparato 400 generador de potencia puede ser una fuente de flujo magnético que origina una potencia magnetostática que surge en un material 116 permeable incrustado en el miembro 110 MEMS móvil de la válvula 10 de clasificación de células según se describe anteriormente. De acuerdo con esto, el aparato 400 generador de flujo puede ser un electroimán con un núcleo magnético y bobinados. Esta potencia puede atraer el miembro 110 móvil hacia el aparato 400 generador de potencia, abrir el canal 122 de clasificación y cerrar el canal 140 de desecho, según se muestra en las Figs. 1 y 2. De manera importante, el aparato 400 generador de potencia puede residir en el sistema 1 de clasificación de partículas, antes que en el clasificador 10 de chip MEMS. Según se menciona anteriormente, esto puede reducir el coste y la complejidad del clasificador 10 de chip MEMS, que puede alojarse en la porción 1000 desechable del sistema 1. En el sistema compacto que se muestra en la Fig. 3, resulta importante que el aparato 400 generador de potencia no genere calor excesivo. Según se menciona anteriormente, debido al tamaño muy pequeño del clasificador 10 de chip MEMS, el aparato 400 generador de potencia puede necesitar también generar líneas de flujo que se concentran en un área pequeña. Los detalles en cuanto al diseño de un aparato 400 generador de flujo nuevo que puede resultar adecuado en esta solicitud se analizan a continuación con respecto a las Figs. 10a-10c.

Otro láser 2410 opcional puede incluirse además para proporcionar un segundo canal óptico en el sistema 1 de clasificación de células.

Según se menciona, la región 200 de interrogación de láser consiste en la porción del pase microfluidado en la que el láser 2400 se dirige a la partícula diana, con el fin de distinguirla a partir de los otros constituyentes de la muestra de fluido.

Una vez que atraviesa la región 200 de detección, se genera una señal mediante el detector 2300 que indica que una partícula diana se presenta en la región 200 de interrogación. Después de una demora conocida, se genera una señal mediante el controlador 2900 que indica que la puerta de clasificación, a saber el miembro 110 móvil de la válvula 10 de clasificación de células se abrirá, con el fin de separar la partícula diana que se detectó a partir de los otros

componentes en la corriente de fluido. El miembro 110 móvil, de la válvula 10 MEMS puede comprender materiales 116 magnéticos permeables según se menciona anteriormente, de manera tal que la potencia magnética puede surgir en este en la presencia de un campo magnético. Cuando la señal se genera mediante el controlador 2900, surge una fuerza en el material 116 permeable magnéticamente integrado que atrae la válvula 110 móvil hacia el aparato 400 generador de potencia. Este movimiento puede cerrar el canal 140 de desecho y redirigir la partícula diana en un canal 122 de clasificación. La muestra clasificada se recolecta posteriormente a partir del recipiente de clasificación al final del canal 122 de clasificación, que conserva la muestra clasificada. Según se menciona anteriormente, el controlador 2900 puede controlar también las velocidades de flujo sobre la base de la velocidad con la cual los eventos de clasificación se registran.

#### Circuito de retroalimentación

Un medio 2500 de control de fluido puede controlar la dirección y velocidad del fluido que fluye a través de los canales de la válvula 10 de clasificación de células del chip MEMS. El medio 2500 de control de fluido puede controlarse sobre la base de un número de criterios según se describe anteriormente. El medio 2500 de control de fluido puede incluir válvulas neumáticas, hidráulicas y/o unidireccionales, y/o puede incluir un pistón o una bomba y pases fluidos asociados. Durante el funcionamiento normal, el flujo puede controlarse mediante el medio 2500 de control de fluido en un circuito de retroalimentación con controlador 2900 para mantener la velocidad celular, presión de fluido., o constante de velocidad de evento, por ejemplo.

En una realización adicional, el sistema 1 de clasificación de células que se usa en el proceso de la invención puede comprender un circuito de retroalimentación para impedir la obstrucción de los canales mediante células u otro material sólido que se suspende en el fluido. Las células biológicas tienden especialmente a adherirse a las superficies del canal, bordes u ángulos, reduciendo así el flujo de líquido a través del sistema y/o el rendimiento general de clasificación de células. El circuito de retroalimentación puede consistir de al menos el medio 2500 de control de fluido tal como una bomba y el controlador 2900.

El controlador 2900 puede detectar obstrucción inminente mediante el monitoreo de la presión de fluido y/o la velocidad celular en el sistema. Si la presión de fluido y/o la velocidad celular caen por debajo de un umbral predefinido, esto puede indicar obstrucción inminente. El controlador 2900 puede aumentar la velocidad de la bomba hasta que la presión de fluido y/o la velocidad celular alcanzan el umbral de nuevo. La presión de fluido puede monitorearse mediante un detector adecuado, y la velocidad celular puede deducirse mediante el monitoreo de la velocidad del evento en el canal óptico. Preferiblemente, la velocidad celular puede ser de entre 0,2 y 10 m/s, y puede ser constante en +/- 0,2 m/s. De acuerdo con esto, el umbral que activa el circuito de retroalimentación puede ser una reducción de velocidad celular de alrededor de 0,2 m/s o el equivalente en pérdida de presión. Debería comprenderse que los detalles que se presentan en la presente son de ejemplo solamente, y que la selección de tales parámetros operativos dependerá de las especificaciones de la solicitud.

Al final de una operación de clasificación cuando el volumen de muestra para clasificar casi se acaba, el controlador 2900 de manera conjunta con el medio 2500 de control de fluido pueden revertir el flujo de fluido en los microcanales, manteniendo, de este modo, los pases húmedos, según se describe en la solicitud de Patente US nro. de serie 14/167,566, presentada el 29 de enero, 2014. El sistema 1 puede tener además el medio para evaluar la eficacia del proceso de clasificación mediante la reversión del flujo a través de la región 200 de interrogación de láser, según se describe en detalle en la solicitud de Patente US nro. de serie 13/104,084, presentada el 12 de diciembre, 2013.

De acuerdo con esto, el sistema 1 de clasificación de células que se usa en la invención puede incluir un medio 200 de interrogación que comprende un láser en un sistema de fluorescencia inducida, basado en láser, en el que una etiqueta fluorescente se fija a una partícula diana, y emite una señal de fluorescencia cuando se irradia con el láser. El sistema puede incluir un cartucho 1000 desechable que se configura para ser aceptado en el sistema 1 de clasificación de células en una etapa de posicionamiento, en la que puede posicionarse con respecto a al menos una fuente 2400 de láser y al menos un detector 2300 óptico. El sistema 1 de clasificación de células puede incluir además un ordenador 2900 que se encuentra en comunicación con la menos una fuente 2400 de láser, al menos una fuente 2100 óptica y la válvula 10 de clasificación de células, para separar las partículas diana a partir de material no diana.

Lo que sigue a continuación es una descripción de los aspectos de activación del sistema 1 de clasificación de células MEMS que se usa en el proceso de la invención, en particular, que aspectos permiten que el fluido fluya hacia y desde el clasificador 10 de chip MEMS de manera repetida y confiable, a partir de recipientes macroscópicos al clasificador 10 de chip MEMS, y controlar el clasificador 10 de chip MEMS muy pequeño.

#### Cartucho desechable como recipiente de muestra

La Fig. 4 es una vista en perspectiva del despiece de un cartucho 1000 desechable de ejemplo que puede usarse en el sistema de clasificación de partículas que se muestra en la Fig. 3. El cartucho 1000 desechable puede incluir varias piezas que pueden montarse, tales como la parte 1135 superior y la base 1130.

El cartucho 1000 desechable puede alojar el clasificador 10 de chip MEMS y proporcionar almacenamiento en recipientes de fluido. De acuerdo con esto, la base 1130 del cartucho 1000 desechable puede tener una pluralidad de espacios o compartimentos que se forman en esta, incluyendo el recipiente 20 de muestra, recipiente 22 de clasificación y recipiente 40 de desecho. Según se describe a continuación de manera adicional, la muestra para clasificarse puede almacenarse en el recipiente 20 de muestra, el vertido de clasificación en el recipiente 22 de clasificación y el vertido de desecho en el recipiente 40 de desecho. Todos los pases fluidos entre estos espacios pueden disponerse en el intercalador 1400 y/o en el clasificador 10 de chip MEMS. De acuerdo con esto, el intercalador 1400 puede proporcionar una ruta de fluido de clasificación entre un recipiente 22 de clasificación en el cartucho desechable y el canal 122 de clasificación en el sustrato de silicón, una ruta de fluido de desecho entre un recipiente 40 de desecho en el cartucho desechable y el canal 140 de desecho, y una ruta de fluido de muestra entre el canal 120 de muestra y un recipiente 20 de muestra.

Debería comprenderse que el término fluido “de clasificación”, muestra “de clasificación” o recipiente “de clasificación” pueden referirse a una recolección de partículas diana. El fluido “de desecho”, muestra “de desecho” o recipiente “de desecho” pueden referirse a una recolección de materiales no diana en la corriente de fluido. Otro lenguaje equivalente es “fracción positiva” para referirse a la muestra de clasificación y “fracción negativa” para referirse al material no diana. De acuerdo con esto, en el texto a continuación, la porción “de clasificación” puede resultar equivalente a la “fracción positiva” y referirse a una recolección de partículas diana, y “desecho” puede referirse a la fracción negativa y a una recolección de materiales no diana.

Entre la parte 1135 superior y la base 1130 pueden disponerse un número de filtros 1180 para proteger la muestra de contaminación o residuos. Estos filtros 1180 pueden ser Sterifilters de 0,20 micrones, por ejemplo. Los filtros 1180 pueden ubicarse directamente por encima de diversos recipientes 20, 22 y 40 de fluido. Pueden existir además filtros en línea en los canales de fluido, que se constituyen para captar los residuos en el fluido y pueden ser de tamaño de poro de aproximadamente 20 micrones.

El recipiente 20 de muestra, recipiente 22 de clasificación y el recipiente 40 de desecho pueden incluir características de forma de embudo que permiten el manejo de pequeños volúmenes de fluidos. El recipiente 22 de clasificación puede contener una estructura de tipo sifón que se describe a continuación con respecto a la Fig. 7, donde se ilustra con mayor detalle. Sin embargo, el recipiente 20 de muestra y recipiente 40 de desecho pueden contener además características que asisten el manejo de volumen pequeño. Esta característica puede ser una superficie contorneada. Una característica de forma de embudo debería comprenderse como referida a una estructura generalmente cónica que se forma para recolectar volúmenes pequeños de fluido que corren por la pared del recipiente. Tanto el recipiente 20 de muestra como el recipiente 40 de desecho pueden incluir tales características 21, 41 de forma de embudo, respectivamente. De este modo, el sistema 1 de clasificación celular que se describe en la presente puede incluir un recipiente 20 de muestra y recipiente 40 de desecho, en el que el recipiente 20 de muestra comprende además una estructura 21 de forma de embudo que se forma en la pared del recipiente 20 de muestra, que recolecta volúmenes de fluido de muestra más pequeños, en el que el volumen de fluido de muestra más pequeño resulta menor que aproximadamente el 10% de un volumen total de fluido del recipiente 20 de muestra. De manera similar, el recipiente 40 de desecho puede comprender además una estructura 41 de forma de embudo que se forma en la pared del recipiente 40 de desecho, que recolecta volúmenes de fluido de desecho más pequeños, en el que el volumen de fluido de desecho más pequeño resulta menor que aproximadamente el 10% de un volumen total de fluido del recipiente 40 de desecho.

#### Propulsor magnetizado

En el recipiente 20 de muestra y contenido entre la parte 1135 superior y la base 1130 puede encontrarse un propulsor 1150 magnetizado, y una aguja 1160 que puede actuar como un eje para el propulsor 1150 magnetizado. Al exponerse a un campo magnético de circulación, el propulsor 1150 magnetizado puede girar en el eje 1160, originando que los contenidos del recipiente 20 de muestra se mezclen o se homogenicen. Finalmente, un filtro 1170 de 0,20 micrones puede colocarse en el recipiente 22 de clasificación para proteger los contenidos clasificados de la contaminación a partir del entorno ambiental. De manera alternativa, el propulsor 1150 puede accionarse directamente mediante un acoplamiento mecánico a un pequeño motor, que puede originar la rotación del propulsor 1150 y, de este modo, la mezcla de los contenidos del recipiente 20 de muestra. Los detalles de la construcción de los elementos de mezcla pueden mostrarse con más detalle en la Fig. 6, y analizarse a continuación con respecto a esa figura.

El fluido de muestra puede introducirse al recipiente 20 de muestra con una pipeta, o con una jeringa y émbolo (no se muestra) a través de los puertos 1111 de acceso que se muestran, tras lo cual el cartucho 1000 puede sellarse con elementos 1110 de sellado de bloqueo luer macho. Técnicas alternativas de sellado pueden usarse también, tales como tornillos de ajuste manual. De manera alternativa, el cartucho 1000 puede entregarse con el fluido de muestra ya cargado en este.

LA Fig. 5 es una vista lateral del cartucho 1000 desechable montado, que muestra el recipiente 20 de muestra, recipiente 22 de clasificación y recipiente 40 de muestra. Mostradas en la vista montada se encuentran las posiciones relativas del clasificador 10 de chip MEMS e intercalador 1400 con respecto a la base 1130 del cartucho. Debería tenerse en cuenta que la Fig. 5 se encuentra invertida en comparación con la Fig. 4, de manera tal que el recipiente

20 de muestra, que se muestra en el lateral de mano izquierda del cartucho en la Fig. 4, se encuentra posicionado ahora en el lateral de mano derecha de la Fig. 5, como se encuentran los canales asociados, agitador, etc.

5 Intercalador

Los pases angostos del chip MEMS deben acoplarse a características macroscópicas, mucho más grandes y manejar volúmenes pequeños de fluido, en particular cuando se clasifican células anormales.

10 Para proporcionar una región de transición entre las características microfabricadas, muy finas del clasificador 10 de chip MEMS y los volúmenes de fluido mucho más grandes de los recipientes 20, 22 y 40, se proporciona un intercaldador 1400. El intercaldador 1400 puede formarse a partir de plástico mediante, por ejemplo, moldeo por inyección y puede tener tolerancias intermedias del orden de +/- 10 mm. Una característica del intercaldador 1400 consiste en la provisión de una transición entre las estructuras muy pequeñas del dispositivo 10 MEMS y las estructuras macroscópicas  
 15 enormes del cartucho 1000 y recipientes 20, 22 y 40. De acuerdo con esto, el sistema 1 de clasificación de células que se describe en la presente puede incluir una válvula 10 de clasificación de células microfabricada en una superficie de un sustrato de silicona, con canales microfabricados que conducen a partir de la válvula 10 de clasificación de células, en el que la válvula 10 de clasificación de células separa las partículas diana de material no diana, un cartucho 1000 desechable que contiene un recipiente 20 de muestra, un recipiente 22 de clasificación y un recipiente 40 de  
 20 desecho; y un intercaldador 1400 que proporciona comunicación fluida entre los canales microfabricados en sustrato de silicona y los recipientes en el cartucho desechable.

Debido a que el intercaldador 1400 puede constituirse con tolerancias razonablemente finas (+/- 10 mm), resulta posible  
 25 alinear los pases en el intercaldador 1400 con pases en el chip MEMS cuando las aberturas a los canales son del orden de aproximadamente 300 micrones. Mientras que los anchos de los canales que conducen hacia y desde la válvula 110 móvil pueden ser sustancialmente más pequeños en el orden de los 150 micrones, las aberturas que introducen el fluido a los canales pueden constituirse próximas a esta escala. Las aberturas se muestran en la Fig. 6.

Según se muestra en la inserción de la Fig. 6, los agujeros pasantes tales como 1420 en intercaldador 1400 pueden  
 30 tener una forma cónica, con un diámetro del orden de 300 micrones en la parte superior. Esta abertura puede estrecharse a un diámetro de aproximadamente 150 micrones en la base donde se encuentra con la abertura correspondiente del canal 20 de clasificación del clasificador 10 de chip MEMS.

La Fig. 6 ilustra además los detalles del mecanismo de mezcla, que puede incluir un propulsor 1150 que se monta en  
 35 un eje 1160 de rotación. El eje puede extenderse de la superficie superior del cartucho 1135 a través de una estructura de soporte que permite que el eje gire libremente. Si el propulsor 1150 contiene componentes magnéticos, la acción de mezcla puede cumplirse mediante un campo magnético de rotación externo con respecto al cartucho 1000. El campo aplicado puede accionar el movimiento del propulsor, originando que este gire en el eje 1160. De manera alternativa, un acoplamiento mecánico puede unirse a un motor que gira luego el eje 1160. De acuerdo con esto, el sistema 1 de clasificación de células que se usa en la invención puede incluir un cartucho 1000 desechable que puede  
 40 incluir además un propulsor en un eje, en el que el propulsor 1150 se dispone en el recipiente 20 de muestra. El propulsor 1150 puede comprender material magnético y que interactúa con un campo magnético variable que gira el propulsor 1150 en su eje 1160, mezclando así los contenidos del recipiente 20 de muestra. De manera alternativa, el sistema 1 de clasificación de células puede incluir un propulsor 1150 que se gira mediante un acoplamiento mecánico  
 45 que gira el eje 1160 y es accionado mediante el motor.

El intercaldador 1400 puede tener pases 1120, 1122 y 1140 que se forman en este, según se muestra en la Fig. 7, que  
 50 pueden corresponder a canales 120, 122 y 140 que se muestran en las Figs. 1 y 2. Esto es, el pase 1120 puede acoplarse con el pase 120 en el clasificador 10 de chip MEMS, para proporcionar un pase fluido a partir del recipiente 20 de muestra al clasificador 10 de chip MEMS. Hacia abajo del clasificador 10 de chip MEMS, el intercaldador 1400 puede proporcionar un pase fluido de la válvula 110 móvil al recipiente 22 de clasificación (en cartucho) mediante el canal 122 de clasificación (en el chip) y 1122 (en el intercaldador). De manera similar, el intercaldador 1400 puede proporcionar un pase fluido de la válvula 110 móvil al recipiente 40 de desecho (en cartucho) mediante el canal 140 de desecho (en el chip) y 1140 (en el intercaldador). En otras palabras, el intercaldador 1400 puede proporcionar un pase  
 55 fluido de clasificación entre un recipiente 22 de clasificación en el cartucho 1000 desechable y el canal 122 de clasificación en el sustrato de silicona, un fluido de desecho entre el recipiente 40 de desecho en el cartucho 1000 desechable y el canal 140 de desecho, y un pase de fluido de muestra entre el canal 120 de muestra y un recipiente 20 de muestra.

Otro propósito del intercaldador 1400 consiste en proporcionar una región de recolección para posiblemente volúmenes  
 60 pequeños de material clasificado. Por ejemplo, debido a que las células diana pueden ser anormales, tales como células madre, el volumen de fluido que se recolecta en el recipiente 22 de clasificación puede ser más bien pequeño, y en proporción con respecto a la frecuencia de células diana en la muestra. De acuerdo con esto, pueden esperarse volúmenes tan bajos como unos pocos microlitros. El intercaldador 1400 puede proporcionar una región en el que el vertido clasificado se desvía mediante sifón, para fácil recolección con una pipeta pequeña. Esta región 1450 de sifón  
 65 se muestra en la Fig. 7.

En particular, debería tenerse en cuenta que el piso de la región 1450 de sifón, se encuentra en una elevación más baja que el fondo del canal 1122 de clasificación. De acuerdo con esto, el fluido puede fluir según se asiste mediante la acción de desvío de sifón y fuerzas de meniscos del clasificador 10 de chip MEMS al recipiente 22 de clasificación, a partir del cual puede recuperarse mediante aguja hipodérmica o micropipeta. Este desvío de sifón puede asistir a la compensación de las fuerzas capilares que pueden ocurrir a partir de flujo de volumen pequeño en los canales muy pequeños. De acuerdo con esto, el recipiente 22 de clasificación puede comprender además una estructura de sifón que recolecta un volumen de fluido de clasificación más pequeño en el recipiente 22 de clasificación, en el que el volumen de fluido de clasificación más pequeño es menor que aproximadamente el 10% del volumen total de fluido del recipiente 22 de clasificación.

De manera importante, el canal 1122 de clasificación puede construirse relativamente corto en comparación con el canal 1120 de muestra y canal 1140 de desecho, de manera tal que la cantidad de material que se pierde mediante adhesión a las paredes de canal, por ejemplo, se minimiza.

Se muestra además en el detalle de la Fig. 7 un limitador 1460 de pegamento que se describirá a continuación con respecto al montaje del cartucho.

Según puede observarse en la Fig. 7, el canal 1122 de muestra puede atraer material a partir del fondo del recipiente 20 de muestra. Esto puede resultar importante para maximizar el rendimiento, o porcentaje de material recuperado, a partir de un volumen de muestra dado. En contraste, el canal 1140 de desecho puede entregar el material no diana a un punto en la inclinación de la pared del espacio de desecho o recipiente 40.

El intercalador 1400 puede construirse a partir de polimetilmetacrilato (PMMA), o polímero de olefina cíclico (COP), mediante moldeo por inyección, estampado, ingeniería láser o impresión 3D. Las tolerancias de los pases 1420 en la Fig. 6 en el intercalador 1400 pueden ser de aproximadamente +/- 10 micrones en un diámetro total de aproximadamente 100 a 400 micrones. Los pases 20 correspondientes en el clasificador 10 de chip MEMS pueden ser de aproximadamente 50 a 150 micrones. Estos pases 20 y 1420 pueden alinearse según se muestra en la inserción de la Fig. 6 en aproximadamente 10 micrones. El intercalador 1400 se fija al sustrato de silicón mediante cualquier adhesivo conveniente, tales como pegamento, epoxi y cemento. El clasificador 10 de chip MEMS puede pegarse en primer lugar al intercalador al asentarlo en la cavidad 1470 de chip que se muestra en la Fig. 9. La cavidad 1470 puede formarse de manera suficientemente precisa de manera que los pases en el clasificador 10 de chip MEMS se superponen aproximadamente con los pases en el intercalador 1400. El desajuste que se permite puede ser de hasta 20 micrones, fácilmente alcanzable. Una máquina de retiro y colocación, que se conoce bien en la fabricación de placa de circuito impreso, puede resultar adecuado para esta tarea. El clasificador 10 de chip MEMS puede pegarse en el lugar en la cavidad 1470. Por supuesto, los materiales y métodos que se describen en la presente son de ejemplo solamente. Otros materiales, tales como otros plásticos, y otros métodos correspondientes pueden usarse.

El intercalador 1400 puede instalarse luego en la base 1130 del cartucho con pegamento o cemento, mediante posicionamiento de los orificios 1410 de posicionamiento de intercalador 1400 contra los postes correspondientes en el cuerpo del cartucho 1000. Debido a que se requerirá que este pegamento o cemento sea hermético, aún sin interferir con los pases 1120, 1122 o 1140, algunas características pueden formarse como limitadores 1460 de pegamento alrededor de estos canales, según se muestra en las Figs. 7 y 8. Estos limitadores 1460 de pegamento pueden servir para impedir que el pegamento no curado, líquido ingrese a los canales 1120, 1122 y 1140 pequeños. Las características 1460 pueden alzarse como crestas de material plástico que impiden que el líquido ingrese a los canales u otras depresiones. En particular, el pegamento puede inyectarse en un puerto que da acceso a la interfaz entre el intercalador 1400 y el resto del cuerpo del cartucho 1000. El pegamento se absorberá alrededor de esta área pero puede mantenerse por fuera de los pases 1120, 1140 y 1122 microfluidos mediante limitadores 1460 de pegamento que rodean estos pases según se muestra en la Fig. 7 y en el dibujo correspondiente de la Fig. 8a. Los limitadores de pegamento reducen el espesor de la interfaz entre el intercalador 1400 y el resto del cuerpo del cartucho 1000 de aproximadamente 5 a 50  $\mu\text{m}$  a 0,2 a 2  $\mu\text{m}$ , creando así un efecto capilar que impide que el pegamento fluya más allá del limitador a los pases microfluidos. Debería comprenderse que estas dimensiones son de ejemplo solamente, y que tales detalles dependerán de las especificaciones de la solicitud. Dependiendo del tipo de pegamento que se usa, el pegamento líquido puede curarse mediante calor, presión o exposición a radiación UV, por ejemplo.

La Fig. 9 es una vista en perspectiva simplificada del lado anverso del intercalador 1400. Este lado incluye el área 1470 de asentamiento para el clasificador 10 de chip MEMS. El clasificador 10 de chip MEMS puede pegarse o de otra manera unirse con respecto a las características del área 1470 de asentamiento.

Las dimensiones de ejemplo para el intercalador son 16 mm de largo, 6 mm de ancho, 1 mm de alto. Los recipientes de muestra y desecho pueden ser de 2 mm de diámetro. El canal 1120 de muestra, canal 1122 de clasificación y canal 1140 de desecho pueden ser cada uno de 300 micrones de ancho. La altura de los limitadores de pegamento puede ser de aproximadamente 20 micrones.

De acuerdo con esto, un proceso de fabricación para el cartucho 1000 puede incluir las siguientes etapas:

1) Pegar el clasificador 10 de chip MEMS al intercalador 1400

2) Colocar el intercalador 1400 contra los pasadores de posicionamiento del cartucho 1000

5 3) Presionar el intercalador 1400

4) Introducir pegamento a espacios entre el intercalador 1400 y cartucho 1000

10 5) Curar pegamento mediante UV

6) Fijar la base 1130 de cartucho a la parte 1135 superior del cartucho mediante pegamento, cemento, o soldadura ultrasónica, por ejemplo.

15 Debería quedar claro que las etapas 1-6 no necesitan realizarse en el orden que se muestra. Por ejemplo, la base 1130 del cartucho puede fijarse a la parte 1135 superior del cartucho antes de fijar el chip 10 MEMS o intercalador 1400.

20 En otra realización del proceso de clasificación de células, el cartucho desechable y/o el intercalador comprenden además al menos una región de calibración para calibrar el medio de interrogación.

25 La Fig. 10 es un diagrama simplificado del intercalador 1400 que comprende regiones de calibración. El intercalador 1400 puede tener áreas 1480 que se usan con fines de calibración. Estas áreas 1480 pueden tener propiedades ópticas o fluorescentes particulares predefinidas que se usan para la calibración o compensación de un sistema óptico. Por lo tanto, las áreas 1480 pueden constituirse de uno o más materiales fluorescentes o uno o más materiales fluorescentes (impresos) se agregan a estas superficies. De manera alternativa, estructuras microfluidas pueden usarse para guiar y almacenar uno o más líquidos fluorescentes con respecto a estas áreas de calibración. La aplicación de estos líquidos fluorescentes puede ocurrir, por lo tanto, en una posición diferente del intercalador. La Fig.11 es una vista en sección transversal de tal variante del intercalador 1400 con áreas 1480 de calibración. El intercalador puede tener un canal 1120 de muestra según se describe anteriormente, que lleva el fluido de muestra al clasificador 10 de chip MEMS. El fluido puede pasar luego a las áreas 1480 de calibración.

35 La calibración se dirige a asegurar que la materia suspendida que tiene coloración fluorescente equivalente se detecte de manera consistente a través de instrumentos y en el tiempo. Esto se logra mediante la medición de la intensidad de un material con fluorescencia conocida. En lugar de usar partículas de calibración en una corrida diferente, esto se logra mediante iluminación y detección de fluorescencia a partir del área de calibración sobre o en el intercalador en el cartucho. La calibración puede llevarse a cabo en cualquier momento, por ejemplo, después de insertar el cartucho en el sistema antes de iniciar el proceso de clasificación, o durante un proceso de clasificación con el fin de controlar o mantener el rendimiento del sistema.

40 Mediante calibración contra un material de fluorescencia conocido, una intensidad diana predefinida puede ajustarse mediante el sistema de la invención. La calibración puede llevarse a cabo varias veces en un proceso repetitivo y puede utilizarse además para caracterizar y validar el rendimiento del sistema.

45 El material de fluorescencia que se usa para el área de calibración se selecciona de manera tal que puede detectarse en el menos uno, a lo sumo en la totalidad de los canales de detección de fluorescencia que se usan en el sistema y que su intensidad de fluorescencia (brillo absoluto) se encuentra al menos en el mismo orden de magnitud que la intensidad de fluorescencia (brillo absoluto) del material que se va a procesar. Especialmente adecuado como material de fluorescencia para el área de calibración resultan Cumarina-6, rojo del Nilo y/o Bodipy-650.

50 En otra realización de la invención, la geometría del canal de fluido del intercalador se diseña para evitar el atrapamiento de burbujas y aglomeración de material celular. Por lo tanto, las geometrías de canales pueden optimizarse con respecto a propiedades fluidas. Esto puede comprender volúmenes muertos minimizados, y evitar cortes y esquinas redondeadas. Además, las geometrías del canal en las interfaces con respecto al chip y/o el cuerpo principal del cartucho pueden diseñarse de manera tal que los diámetros del canal se encuentran siempre en aumento en dirección de flujo. Estos elementos de diseño pueden impedir además la aglomeración de material celular en los canales fluidos.

55 Evitar el atrapamiento de burbujas puede lograrse además mediante la provisión de los canales en el intercalador con un pequeño canal en el fondo del canal principal ("canal en canal"). El pequeño canal puede tener del 5 al 20% de la profundidad y ancho del canal en el que se posiciona. La Fig. 8b muestra a modo de ejemplo el canal pequeño 1490 en el fondo de un canal del intercalador, como canales 1122 y 1140. Una burbuja de gas que bloquea el canal principal no puede ingresar en el pequeño canal debido a la tensión superficial y deja el pequeño canal abierto para flujo de líquido. Otra variante para evitar burbujas atrapadas se muestra en la Fig. 8c, donde el canal 1122 que conduce al sifón se forma como una rampa que conduce al sifón, evitando así bordes agudos.

65

De acuerdo con esto, el intercalador puede incluir al menos un canal que tiene un canal pequeño adicional que se dispone en el fondo del al menos un canal, en el que dicho pequeño canal tiene aproximadamente del 5 a aproximadamente el 20% de una profundidad y un ancho del al menos un canal.

5 Actuador magnético

Otro aspecto del sistema que se describe anteriormente con respecto a las Figs. 1, 2 y 3 consiste en la necesidad de un campo magnético que se localiza de manera precisa que accionará el clasificador 10 de chip MEMS pequeño.

10 Según se describe anteriormente, el mecanismo de actuación en el sistema que se muestra en la Fig. 3 puede ser electromagnético. Debido a que la válvula 110 móvil es muy pequeña, resulta importante que la estructura generadora de flujo sea precisa, de potencia baja y eficiente. Una estructura como tal se muestra en las Figs. 10a, 10b y 10c.

15 La fuente externa de líneas de campo magnético (flujo magnético) puede proporcionarse por fuera del clasificador 10 de chip MEMS, según se muestra en las Figs. 2 y 3. Esta fuente puede ser un electroimán 400. El electroimán 400 puede incluir un núcleo 470 permeable alrededor del cual se enrollan bobinas 460. Las bobinas 460 y núcleo 470 generan un campo magnético que abandona el polo del imán en la punta 450, diverge y regresa al polo opuesto, como bien se conoce del electromagnetismo elemental. De manera general, puede existir un intercambio entre pocas capas de bobinas 460 para disipación de calor más efectiva, o más capas para mayor flujo (Amp\*giro) y, de este modo, mayor potencia y mayor velocidad. En una realización, las bobinas 460 tienen una capa, pero el cuerpo del imán tendrá frecuentemente al menos tres capas de bobinas 460. Cuando el electroimán 400 se lleva a las proximidades de la válvula 110 móvil, y la bobina 460 se energiza, la bobina 460 y el núcleo 470 generan líneas de flujo que divergen rápidamente a partir de la punta 450. De acuerdo con esto, el miembro 110 móvil se atrae de manera general hacia la punta 450 del electroimán 400 según se muestra en la Fig. 12a, debido a que el material permeable se atrae en áreas de densidad de flujo en aumento.

25 Según se muestra en la Fig. 12a, el imán 470 puede tener una forma cónica, que puede tender a concentrar además el flujo magnético en la región alrededor de la punta 450. El ángulo del cono puede ser de, por ejemplo, entre aproximadamente 0 y aproximadamente 30 grados a partir de la verticalidad. La proporción de aspecto (longitud de cono/ancho promedio de cono) puede ser de alrededor de 2/1 por ejemplo, pero puede diseñarse en un amplio rango de formas. Con el fin de hacer foco en el flujo en la punta 450, sin embargo, puede resultar ventajoso que el diámetro de la punta sea menor que el diámetro en la base de la forma cónica. La Fig. 12b es una vista alargada de la punta del electroimán 400, que muestra la forma cónica de la punta, de cara. La Fig. 12c es una vista en perspectiva de la forma 450 cónica, bobinas 460 y cuerpo 470 del imán.

30 El modelo magnético sugiere que una punta de electroimán del ancho aproximado de los elementos 116 permeables en el clasificador 10 de chip MEMS resulta óptima, con una altura de aproximadamente el mismo orden de magnitud. El tamaño de base se determina luego mediante el ángulo del cono. En una realización, la base de la forma cónica puede tener una longitud de 2 a 5 mm y un ancho de 0,5 a 2 mm. La punta de la forma cónica puede ser más pequeña que la base y tener dimensiones rectangulares de aproximadamente 1,0 mm x 0,7 mm, o al menos aproximadamente 0,4 mm x 0,2 mm. Debería comprenderse que estas dimensiones son a modo de ejemplo solamente, y que tales detalles dependerán de las especificaciones de la solicitud.

35 Ejemplos

Proceso para fabricación de nucleasa independiente de cationes

40 Un proceso de fabricación adecuado para una nucleasa independiente de cationes se muestra en la Fig. 13. El proceso comienza en la etapa S100. En la etapa S200, la secuencia de codificación para una proteína degradadora de ADN (nucleasa) se clonó en un vector plasmídico bajo el control de un promotor inducible. En la etapa S300, el vector recombinante se transformó en células de Escherichia coli. En la etapa 400, los clones que expresan la nucleasa se seleccionaron y de estos se generaron bancos de células. Cuando células de E. coli recombinante se cultivan en un medio líquido complejo y la expresión del gen recombinante se induce (etapa S500), las células expresan una nucleasa en el citosol de la célula en la etapa S600. En condiciones estándares, la nucleasa se expresa en una conformación no activa, insoluble como los así denominados cuerpos de inclusión. Mediante el ajuste de parámetros de cultivo particulares tales como temperatura, momento de tiempo de inducción y duración de expresión, hasta el 50% de la nucleasa puede expresarse en una forma soluble en etapa. En un momento dedicado, el cultivo se detiene y las células se separan a partir del medio líquido mediante sedimentación (etapa S700). Las células separadas se interrumpen mediante alta presión (etapa S800), y fragmentos celulares y proteínas insolubles se separan a partir de la fracción soluble mediante sedimentación en la etapa S900. La fracción soluble (sobrenadante) se recolecta y se purifica además mediante etapas de cromatografía preparatorias en la etapa S1000. La formulación continúa en la etapa S1100 y el proceso finaliza en la etapa S1200. Debería comprenderse que no todas las etapas S100-S1200 pueden resultar necesarias, y que las etapas no necesitan realizarse necesariamente en el orden que se muestra.

65 Las enzimas candidatas que pueden resultar adecuadas incluyen, por ejemplo:

- Nuc (de Salmonella, varios homólogos de Nuc existen en otras bacterias tales como E. coli, Citrobacter, Nautilia, Proteus)

5 • GBSV1-NSN (de bacteriófago termofílico GBSV1)

- Bfi I, especialmente el subdominio catalítico N-terminal (enzima de restricción de Bacillus)

10 • Proteína PC1 (de virus aviar)

- WSSV-NSN (de virus de síndrome de manchas blancas de camarón)

Estas enzimas pueden cumplir los requisitos que se describen anteriormente. Para evaluación posterior de las enzimas, pueden clonarse, expresarse de manera recombinante, purificarse y analizarse.

15 1) Expresión recombinante de la nucleasa en E. coli

La Fig. 12 muestra un análisis de proteínas después de cultivo de células de E. coli recombinante y expresión de una nucleasa recombinante mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). La proteína diana se marca con flechas. La forma activa es un homodímero de aprox. 40 kDa, el monómero es de aprox. 20 kDa de tamaño. Alrededor del 50% de la proteína dimérica se encuentra en la fracción soluble.

- Carril 1: proteínas de marcador con tamaños definidos.

25 • Carril 2: fracción soluble.

- Carril 3: fracción insoluble.

30 2) Purificación de la nucleasa recombinante

La Fig. 15 muestra un análisis de nucleasa después de purificación mediante electroforesis en gel (SDS-PAGE). La forma activa es un homodímero de aprox. 40 kDa, el monómero es de aprox. 20 kDa de tamaño.

- Carril 1: proteínas de marcador con tamaños definidos.

35 • Carril 2: nucleasa purificada.

3) Caracterización de la nucleasa recombinante

40 La nucleasa recombinante se caracterizó en un ensayo de nucleasa bajo varias condiciones. La actividad de nucleasa puede determinarse mediante absorbancia de luz a 260 nm. Cuando se degrada el ADN a fragmentos más pequeños, la absorbancia a 260 nm aumenta (Kunitz 1950). Por lo tanto, el aumento de valores de OD<sub>260</sub> se correlaciona con la actividad de nucleasa.

45 La nucleasa fabricada demostró ser independiente de Mg<sup>2+</sup> y otros cationes divalentes debido a que su actividad no se redujo en la presencia de EDTA. La actividad más alta se observó en condiciones ácidas a pH <6,6 y a temperaturas >21 °C.

50 La Fig. 16 muestra la actividad de la nucleasa recombinante en comparación con las nucleasas Benzonase and DNasa I dependientes de cationes que se disponen comercialmente en regulador de acetato que contiene MgSO<sub>4</sub> a pH 5,5.

La Fig. 17 muestra la actividad de la nucleasa recombinante en comparación con la nucleasa Benzonase dependiente de cationes que se dispone comercialmente en regulador de acetato sin Mg<sup>2+</sup> y con EDTA a pH 5,5.

55 La Fig. 18 muestra la dependencia con respecto a la temperatura de la actividad de nucleasa recombinante.

La Fig. 19 muestra la dependencia con respecto al pH de la actividad de nucleasa recombinante.

60 4) Resultados

Los ensayos con sangre lisada que se bombea a través de la válvula de clasificación microfabricada mostraron que concentraciones de menos de 10U/mL de benzonas en presencia de MgCl<sub>2</sub> resultan suficientes para impedir obstrucción del chip MEMS durante el proceso de clasificación. Concentraciones mayores que 100U/mL de benzonase no mostraron ninguna ventaja adicional. El mismo ensayo que se realizó en ausencia de benzonase dio como resultado la obstrucción del dispositivo.

65



El mismo ensayo con la nucleasa recombinante según se fabricó anteriormente en lugar de benzonase en presencia de 1 mmol/l de EDTA dio el mismo resultado, a saber, la nucleasa dependiente de cationes impidió exitosamente la obstrucción de la válvula de clasificación microfabricada.

5 De acuerdo con esto, las nucleasas como DNasa dependiente de cationes y DNasa compatible con EDTA reducen la viscosidad que se origina mediante ADN celular y permiten así un funcionamiento sin perturbaciones del dispositivo en una escala microfluida. El uso de una DNasa compatible con EDTA permite además el uso de un regulador que contiene EDTA. En una escala microfluida, la obstrucción celular inducida por cationes impide o al menos obstaculiza la clasificación de células, y, por lo tanto, un regulador que contiene EDTA resulta beneficioso para el impedimento de obstrucción celular que se origina mediante cationes.

15 Mientras que diversos detalles se han descrito en conjunto con las implementaciones de ejemplo que se indican anteriormente, diversas alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalencias sustanciales, ya sean conocidas o que son o serán previstas en la actualidad pueden volverse aparentes una vez revisada la divulgación anterior. Además, los detalles que se relacionan con los métodos, dimensiones, usos de materiales, formas, técnicas de fabricación, etc. específicos se dirigen a ser ilustrativos solamente, y la invención no se limita a tales realizaciones. Los descriptores tales como parte superior, fondo, izquierda, derecha, al revés, etc., son arbitrarios, y debería comprenderse que los sistemas y métodos pueden realizarse en cualquier orientación. De acuerdo con esto, las implementaciones de ejemplo que se indican anteriormente se dirigen a ser ilustrativas, no limitantes.

20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Proceso para clasificación de células diana y células no diana mediante una válvula (110) de clasificación de células microfabricada en una superficie de un sustrato de silicona, con canales (120, 122, 140) microfabricados que conducen a partir de la válvula (11) de clasificación de células, en el que la válvula de clasificación de células separa las partículas diana a partir del material no diana;
- 10 un cartucho desechable que contiene un recipiente (20) de muestra, un recipiente (22) de clasificación y un recipiente (40) de desecho; caracterizado porque la muestra se proporciona en un regulador que comprende nucleasa.
2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la nucleasa es independiente de cationes.
- 15 3. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, caracterizado porque la nucleasa es independiente de cationes y el regulador contiene un agente quelante capaz de formar complejos con cationes.
4. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la nucleasa es dependiente de cationes.
- 20 5. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque la nucleasa es una DNasa.
6. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la nucleasa resulta no específica.
- 25 7. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el intercalador (1400) proporciona comunicación de fluido entre los canales microfabricados en el sustrato de silicona y los recipientes en el cartucho (1000) desechable.
- 30 8. Proceso de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizado porque el intercalador (1400) proporciona una ruta de fluido de clasificación entre un recipiente de clasificación en el cartucho desechable y el canal de clasificación en el sustrato de silicona, una ruta de fluido de desecho entre un recipiente de desecho en el cartucho desechable y el canal de desecho, y una ruta de fluido de muestra entre el canal de muestra y un recipiente de muestra.
- 35 9. Proceso de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, caracterizado porque los canales del intercalador (1400) se proporcionan en el fondo con un canal pequeño adicional que tiene del 5 al 20% de la profundidad y ancho del canal en el que se posiciona.
- 40 10. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque la válvula (110) de clasificación de células dirige las partículas diana de un canal (120) de muestra a un canal (122) de clasificación que se forma en el sustrato de silicona y el material no diana del canal (120) de muestra a un canal (140) de desecho que se forma también en el sustrato de silicona.
- 45 11. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado porque el recipiente (22) de clasificación comprende además una estructura de sifón que recolecta un volumen de fluido de clasificación más pequeño, en el que el volumen de fluido de clasificación más pequeño es menor que el 10% del volumen total de fluido del recipiente (22) de clasificación.
- 50 12. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque el recipiente (20) de muestra comprende además una característica de forma de embudo que se forma en la pared del recipiente de muestra, que recolecta volúmenes de fluido de muestra más pequeños, en el que el volumen de fluido de muestra más pequeño resulta menor que el 10% del volumen total de fluido del recipiente (20) de muestra.
- 55 13. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado porque el recipiente (40) de desecho comprende además una característica de forma de embudo que se forma en la pared del recipiente de desecho, que recolecta volúmenes de fluido de desecho más pequeños, en el que el volumen de fluido de desecho más pequeño resulta menor que el 10% del volumen total de fluido del recipiente (40) de desecho.
- 60 14. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, caracterizado porque el canal (122) de muestra comprende un medio (200) de interrogación que distingue partículas diana a partir de materiales no diana en la corriente de muestra.
15. Proceso de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizado porque el medio de interrogación comprende (200) un láser en un sistema de fluorescencia inducida basado en láser, en el que una etiqueta fluorescente se fija a la partícula diana, y emite una señal de fluorescencia cuando se irradia mediante el láser.



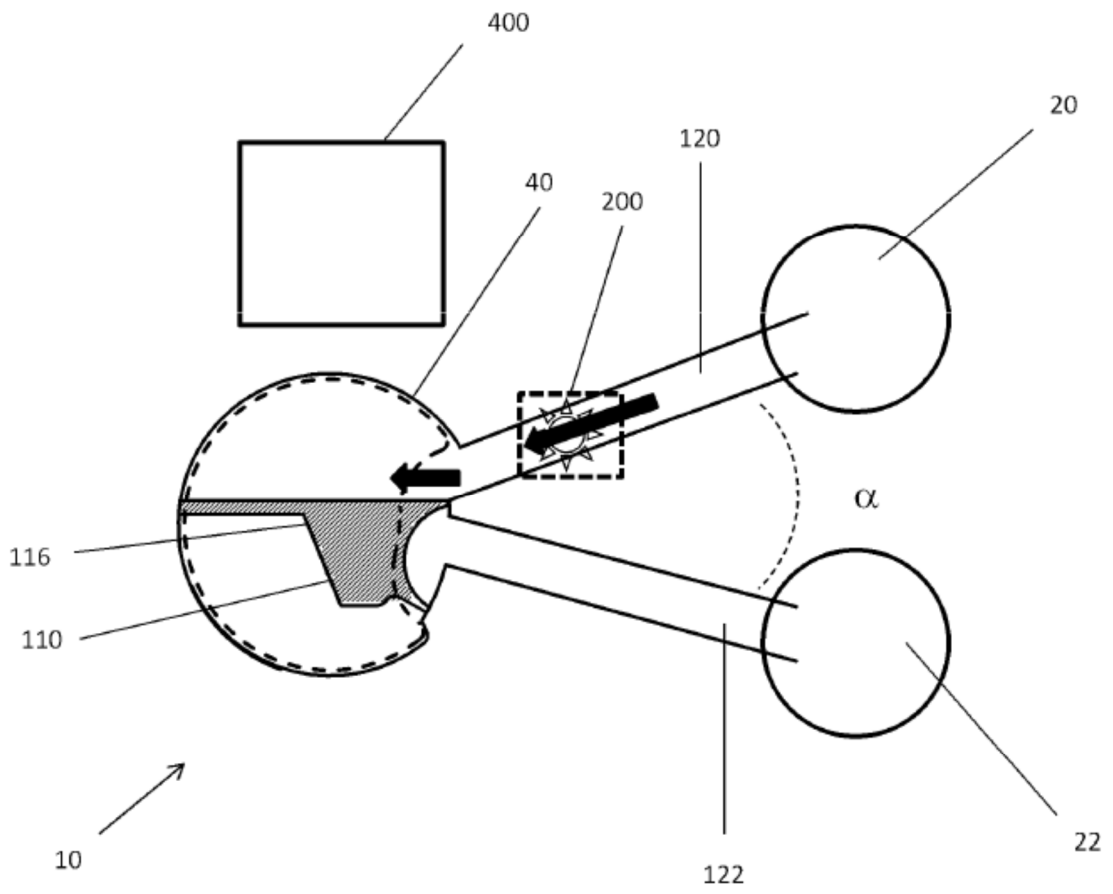


Fig. 2

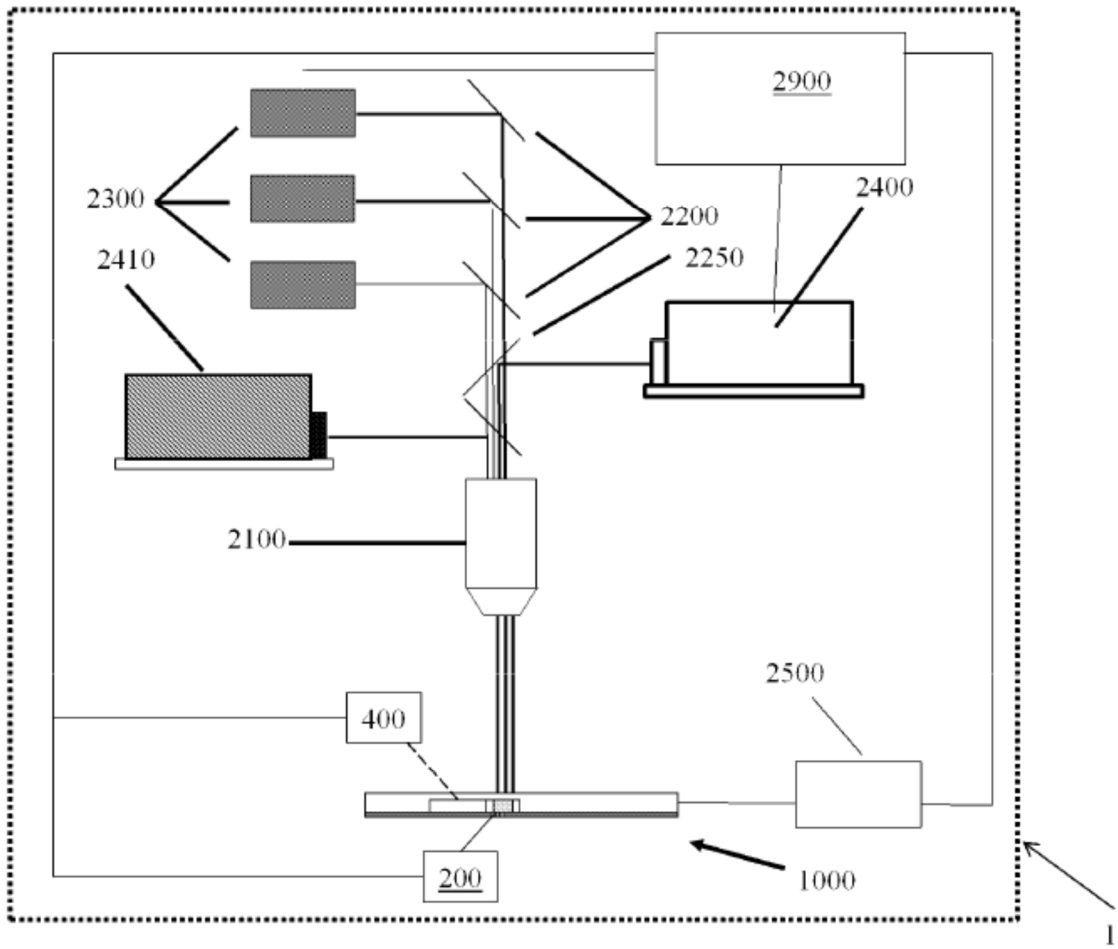


Fig. 3

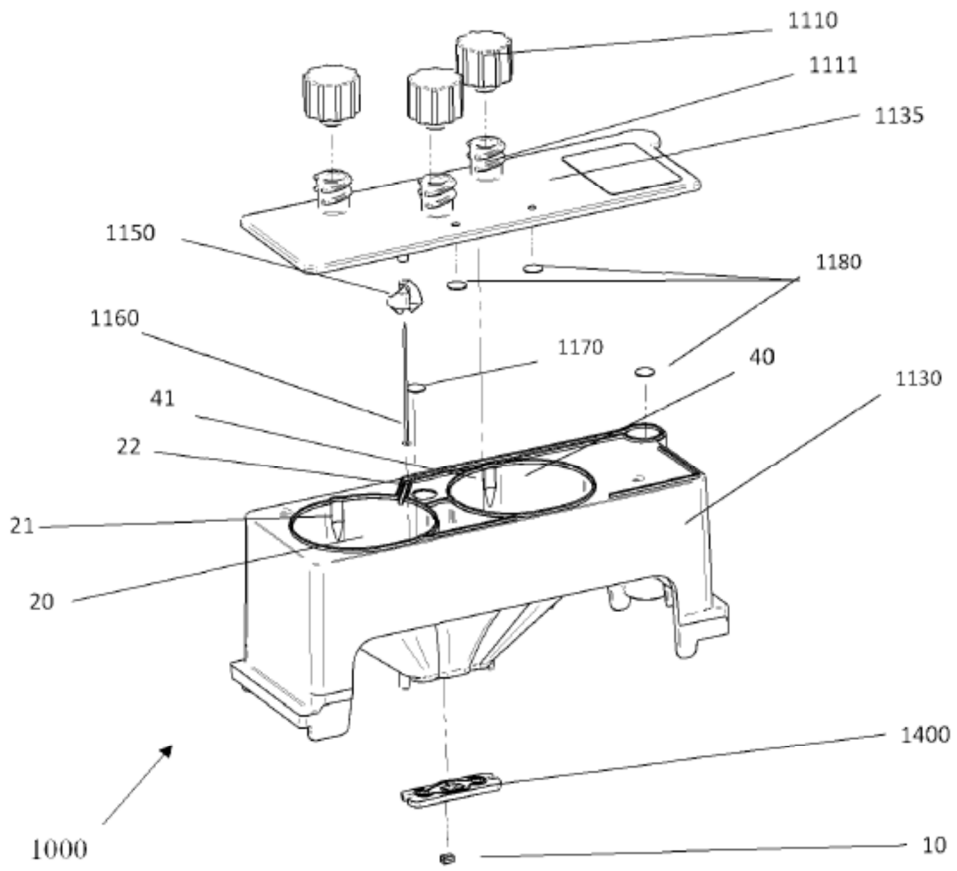


Fig. 4

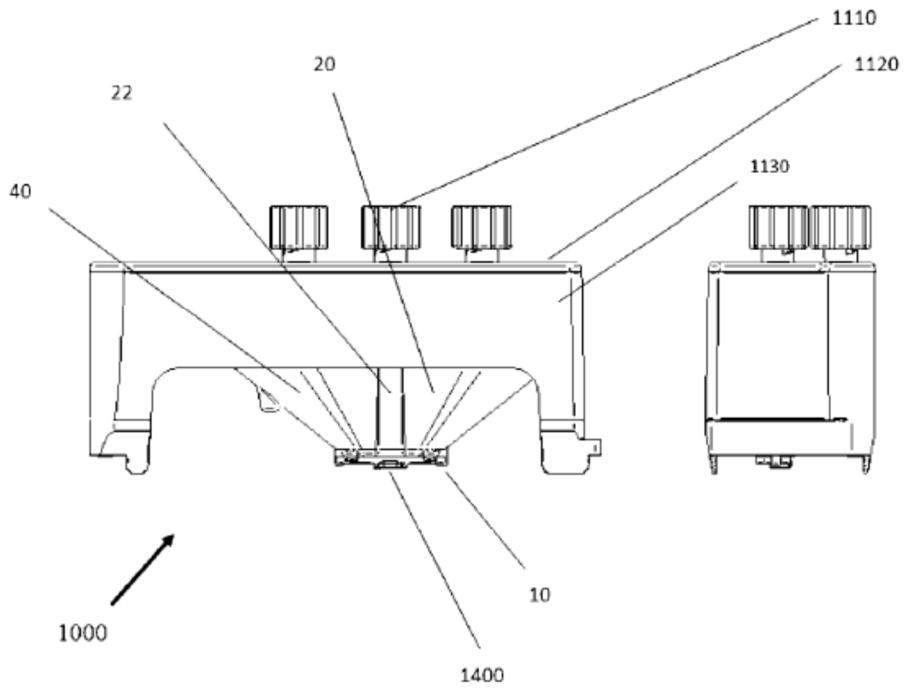


Fig. 5a

Fig. 5b

Fig. 5

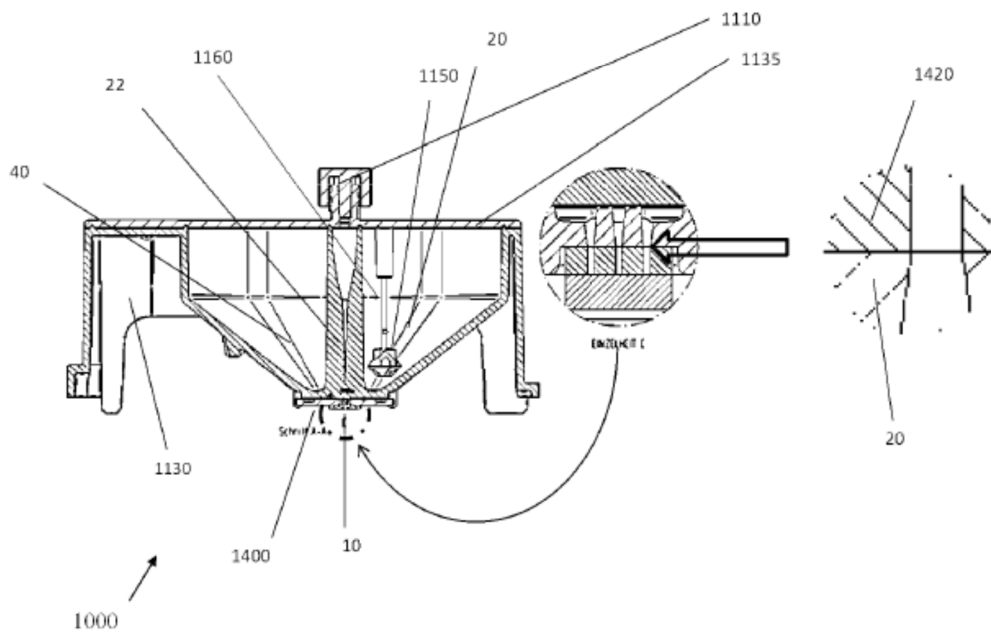
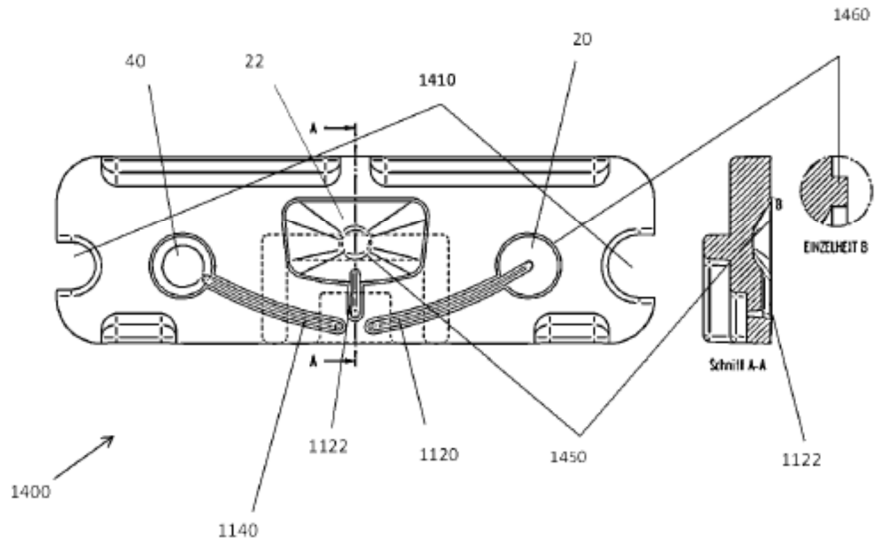
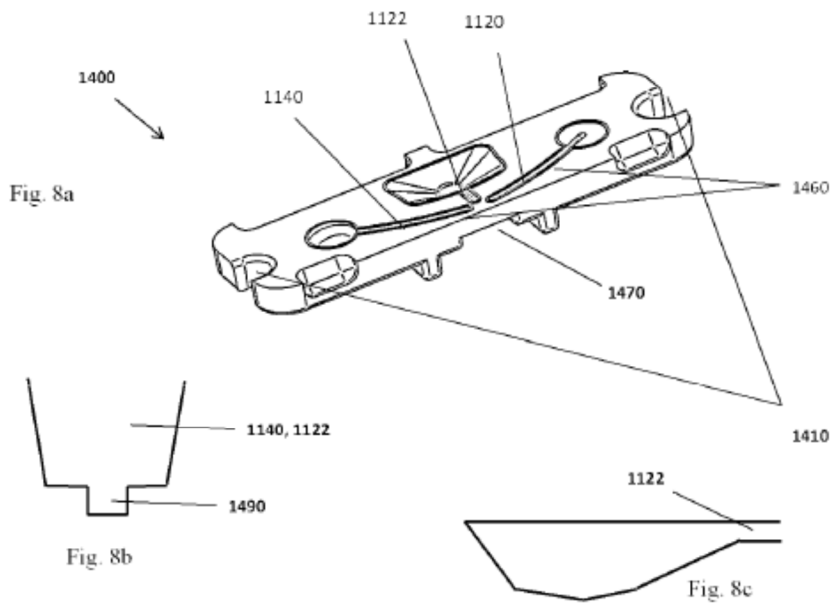


Fig. 6

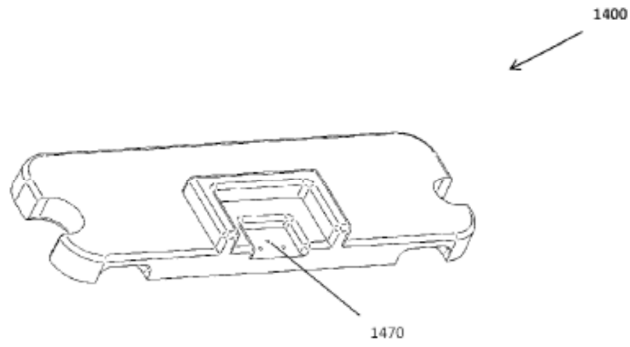


**Fig. 7**

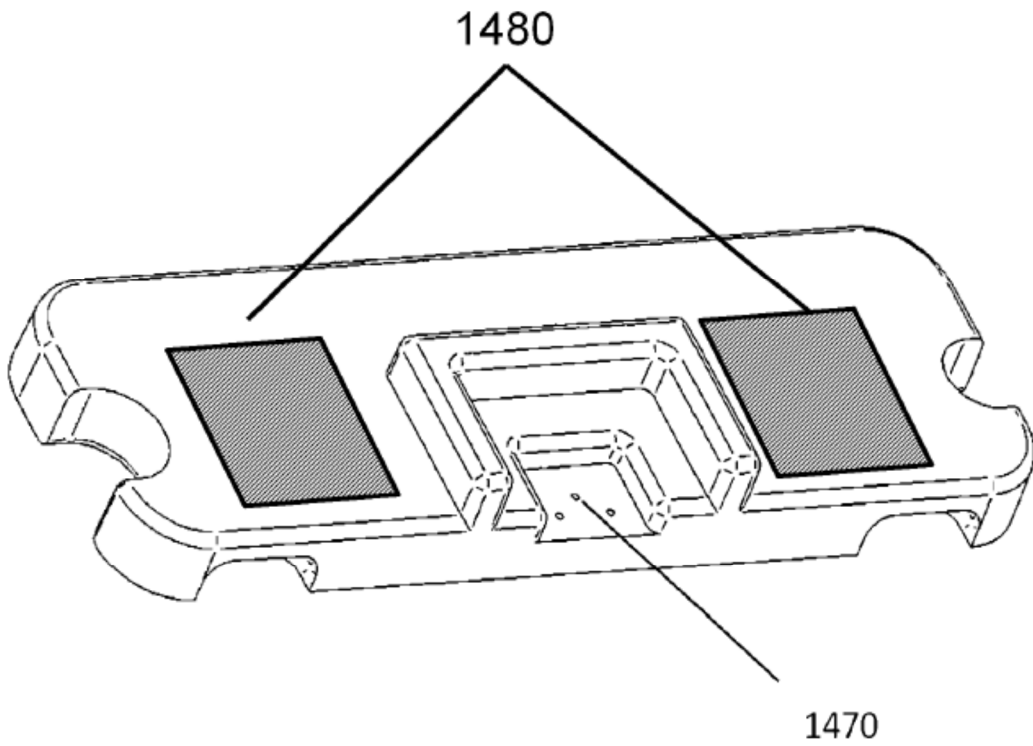


**Fig. 8**





**Fig. 9**



**Fig. 10**

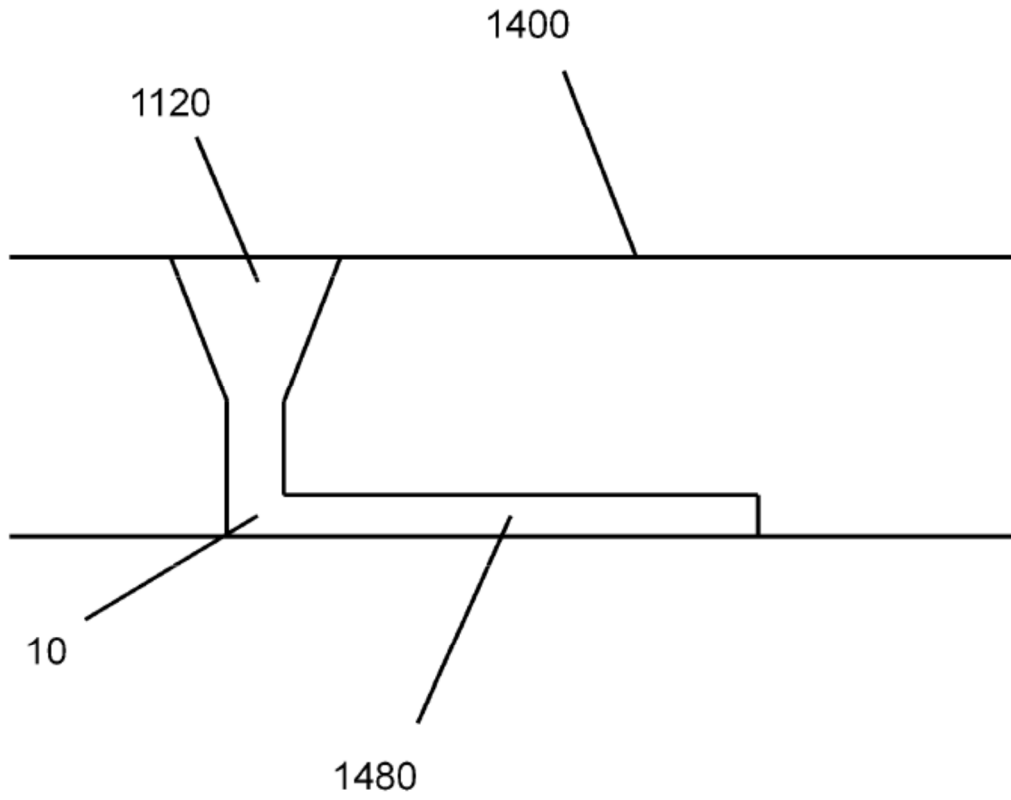
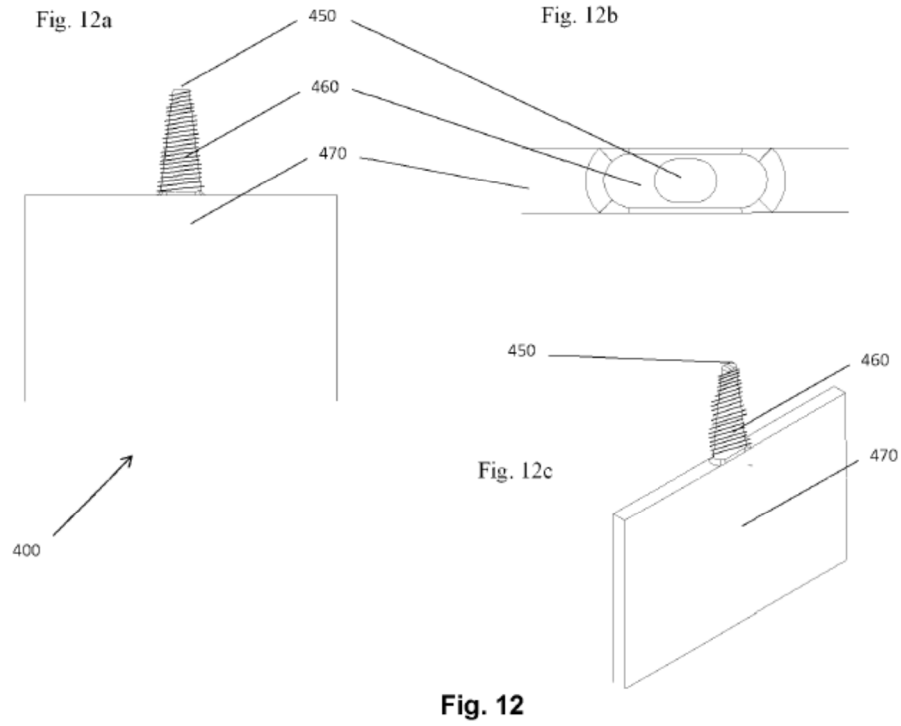


Fig. 11



**Fig. 12**

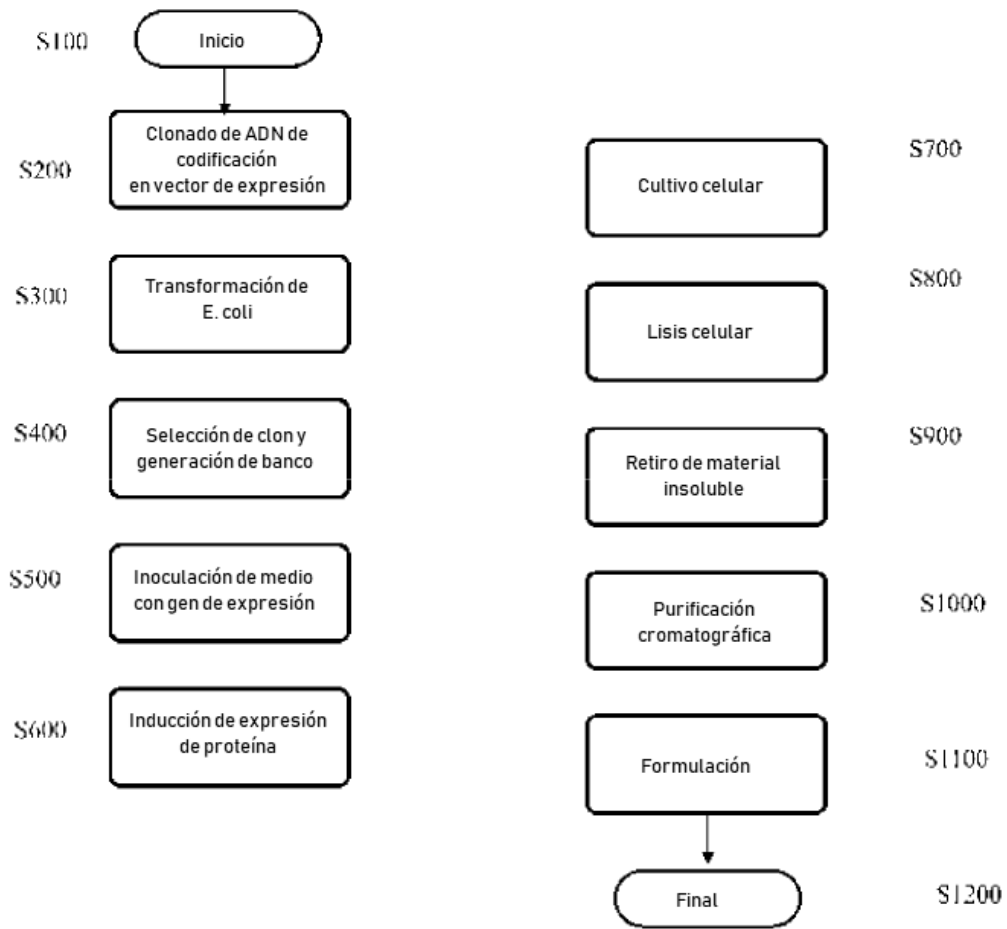


Fig. 13

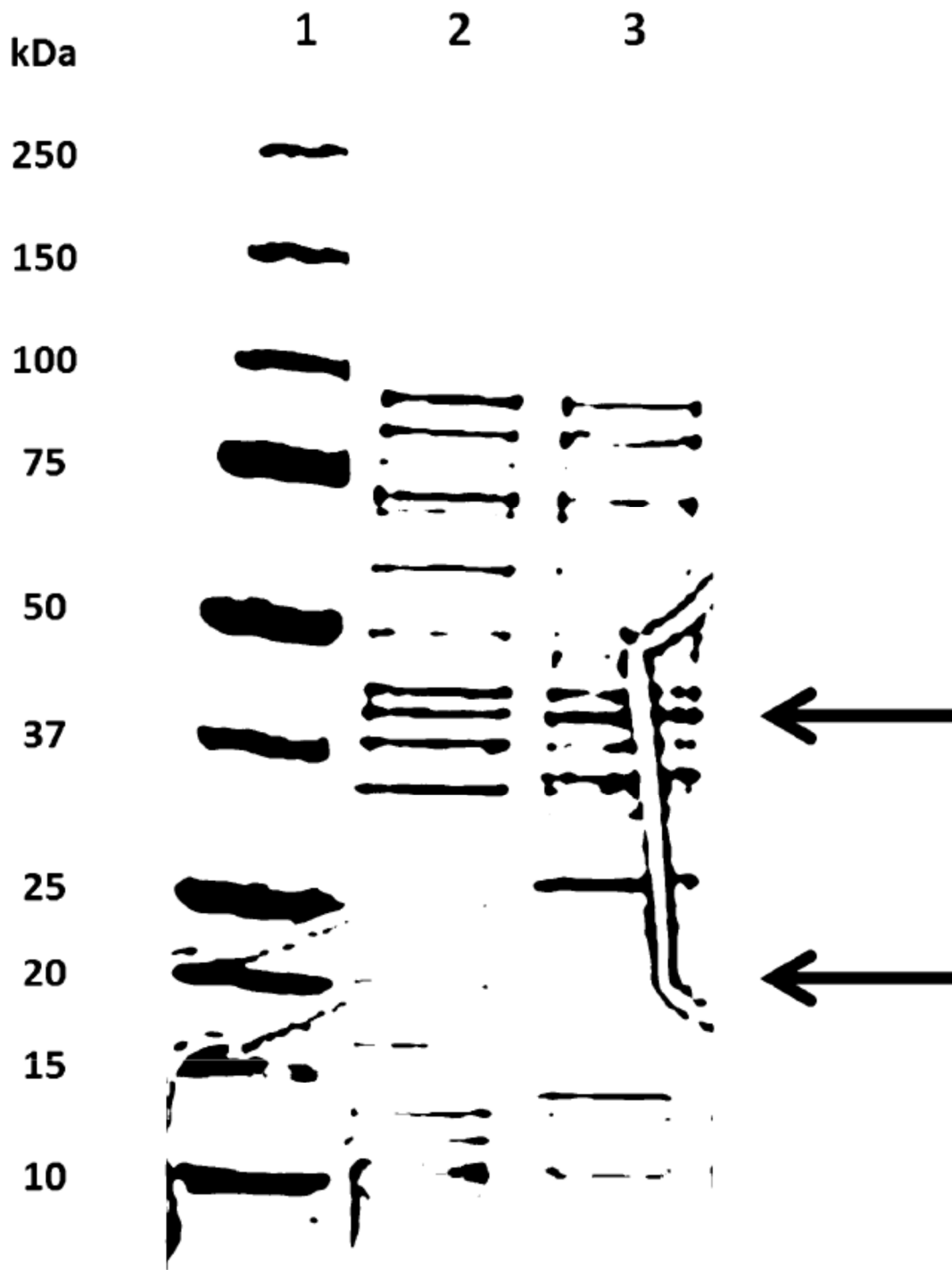


Fig. 14

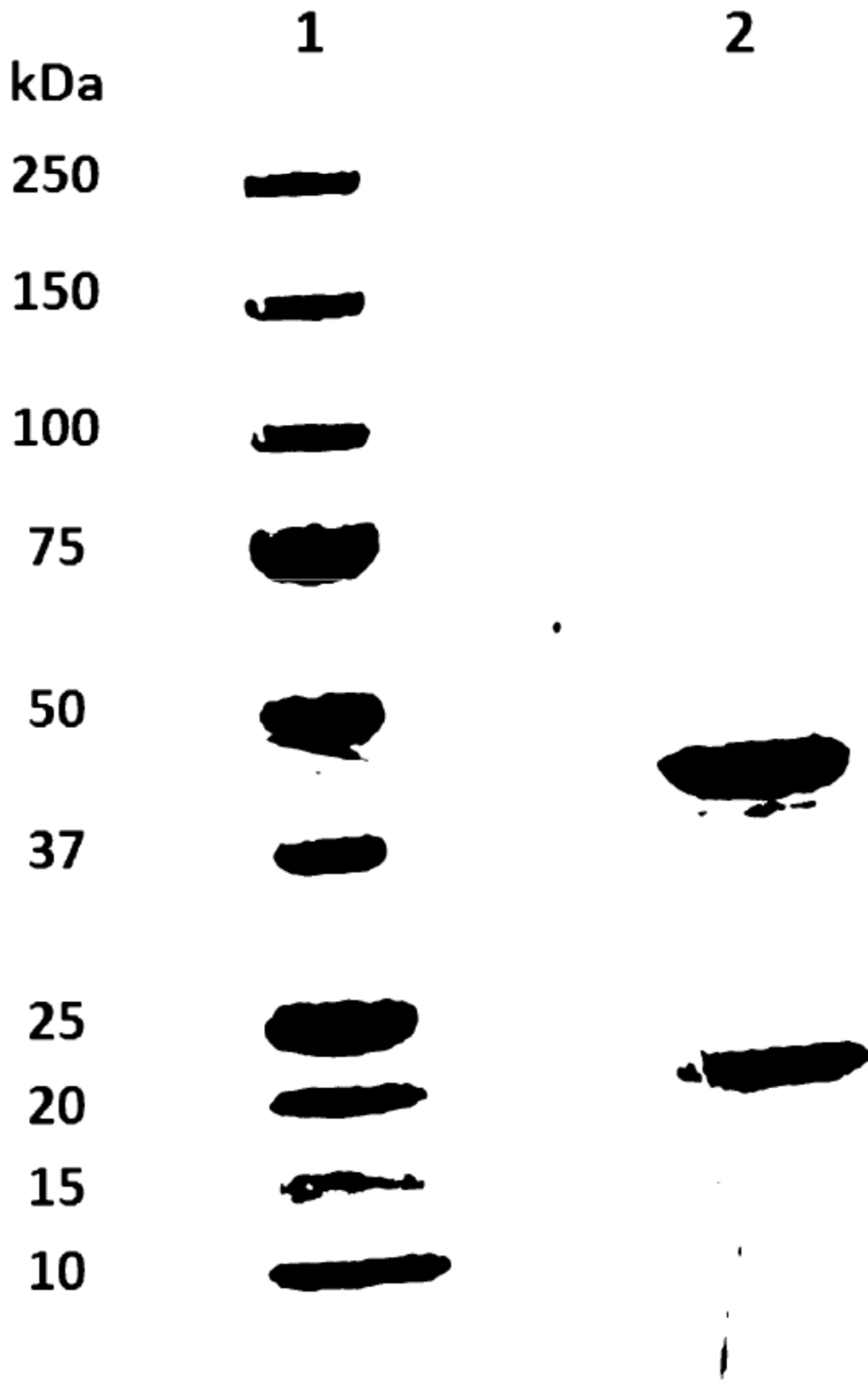
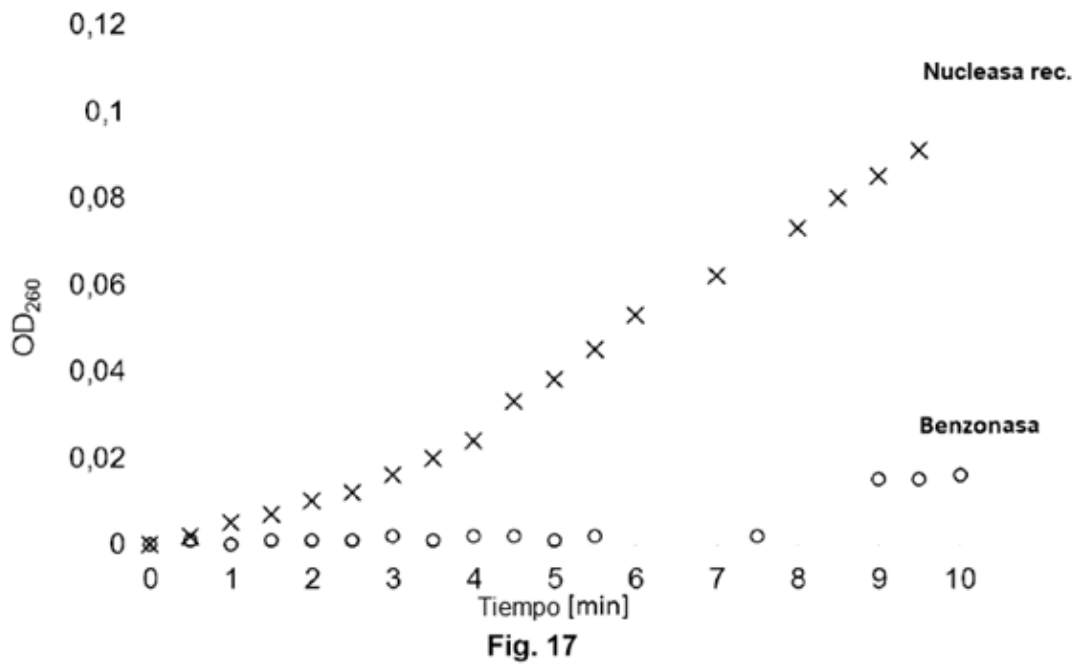
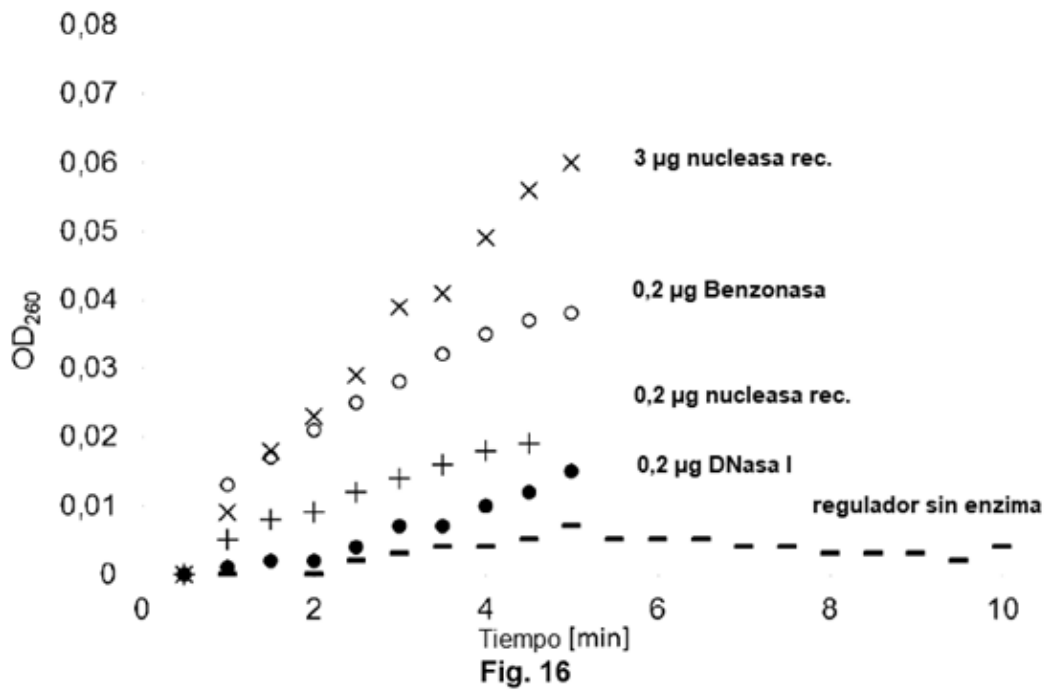


Fig. 15



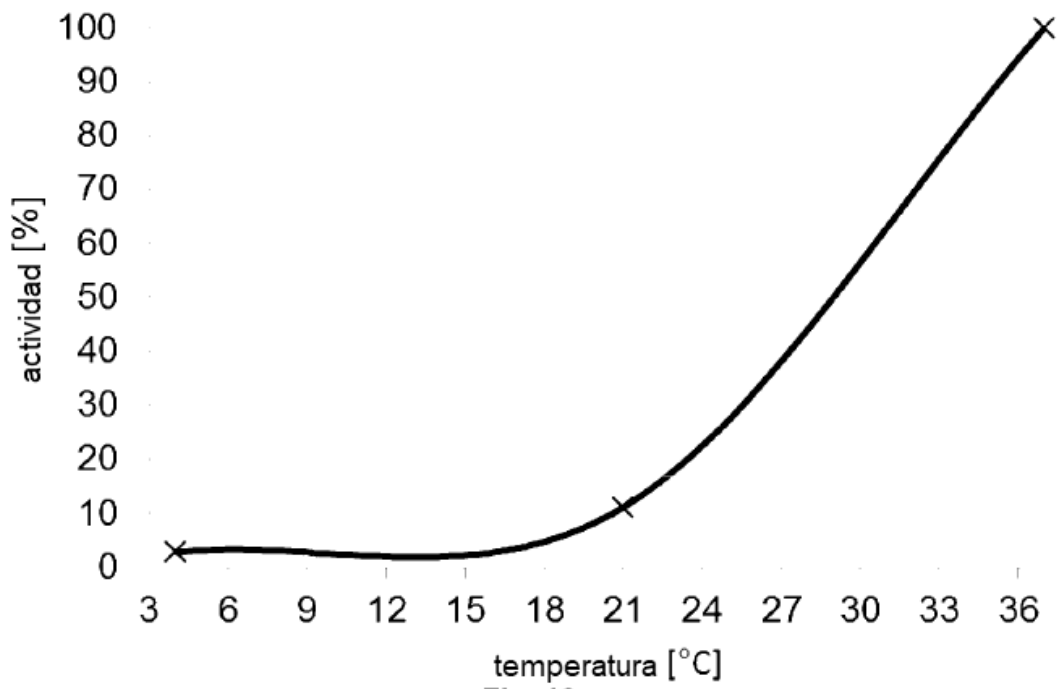


Fig. 18

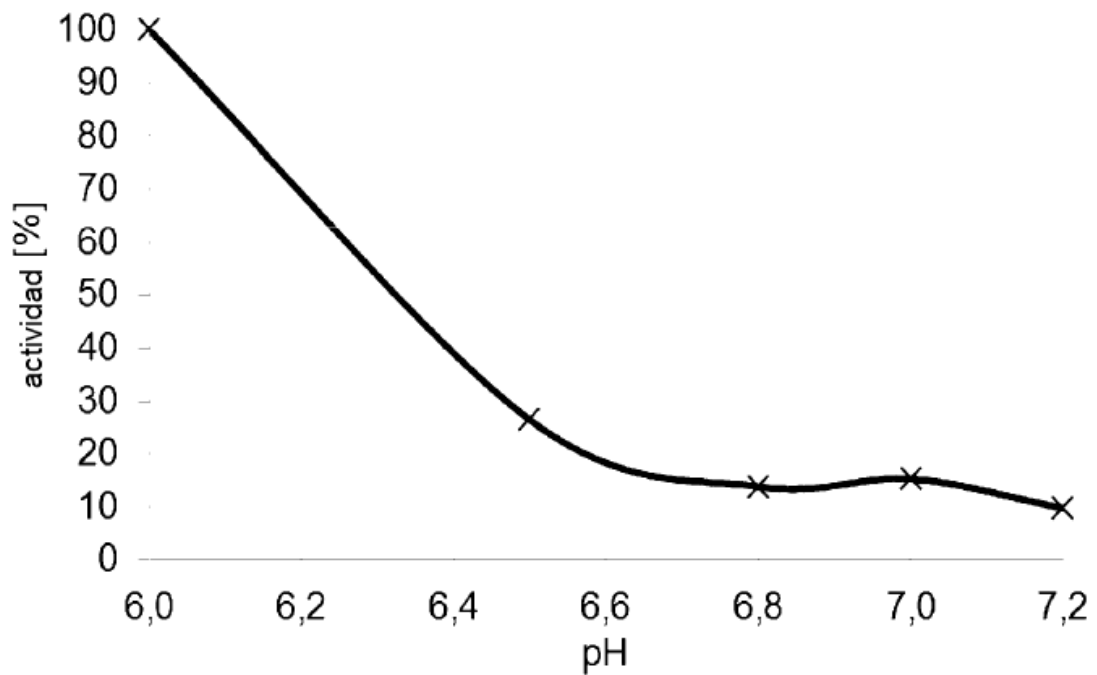


Fig. 19