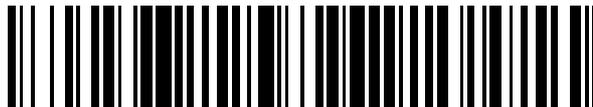


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 797 448**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.07.2012 PCT/US2012/048060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13019491**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2012 E 12819758 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2739587**

54 Título: **Sistema de captura de células**

30 Prioridad:

01.08.2011 US 201161513785 P

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

02.12.2020

73 Titular/es:

**BIO-RAD LABORATORIES, INC. (100.0%)
1000 Alfred Nobel Drive
Hercules, CA 94547, US**

72 Inventor/es:

**HANDIQUE, KALYAN;
GOGOL, PRIYADARSHINI;
SIEMER, CHRISTOPHER y
JAVDANI, SAEDEH, SEPEHRI**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 797 448 T3

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

DESCRIPCIÓN

Sistema de captura de células

Esta invención se refiere en general al campo de clasificación de células, y más específicamente a un nuevo y útil sistema de clasificación y análisis de células dentro del campo de clasificación de células.

5 Con un mayor interés en las pruebas de fármacos específicas de células, el diagnóstico y otros ensayos, los sistemas que permiten el aislamiento, la identificación y la recuperación de células individuales son cada vez más deseables dentro del campo del análisis celular. Adicionalmente, con el inicio de la medicina personalizada, los sistemas de clasificación celular de bajo coste y alta fidelidad se están volviendo altamente deseables. Sin embargo, los sistemas de captura de células preexistentes adolecen de varias deficiencias que impiden la adopción generalizada de pruebas específicas de células. Por ejemplo, la citometría de flujo requiere que la célula se identifique y clasifique simultáneamente, y limita la observación celular a una sola instancia. La citometría de flujo no permite múltiples análisis de la misma célula y no permite la clasificación arbitraria de subpoblaciones celulares. Los dispositivos microfluídicos convencionales se basan en anticuerpos específicos de células para la selección celular, en los que los anticuerpos que están unidos al sustrato del dispositivo microfluídico se unen selectivamente a las células que expresan el antígeno deseado. Los dispositivos microfluídicos convencionales no permiten la eliminación celular posterior sin daño celular, y solo capturan las células que expresan el antígeno específico; Las células que no expresan, que también podrían desearse, no son capturadas por estos sistemas. Los filtros celulares pueden separar los componentes de la muestra en función del tamaño sin daño celular significativo, pero sufren obstrucciones y no permiten la identificación, el aislamiento y la recuperación de células específicas.

10 Por lo tanto, subsiste la necesidad en el campo de clasificación de células de crear un nuevo y útil sistema de captura y análisis de células. A partir del documento US6150180 se conoce un dispositivo de captura de células microfluídicas para ensayos de cribado. Un aparato de análisis y clasificación de células que captura y libera partículas tales como células se conoce del documento US2006/0128006. El dispositivo para encerrar y analizar muestras de fluidos se divulga en el documento WO2006/098696. El método y aparato para analizar un material para detectar enfermedades, dicho aparato tiene una estación de ensayo de conoce del documento WO03/035909.

15 La invención reside en un sistema de captura de células con una herramienta de eliminación de acuerdo con la reivindicación 1.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de un sistema de captura de células.

20 La Figura 2 es una vista en perspectiva de una variación del sistema de captura de células.

Las Figuras 3A, 3B, 3C, 3D, y 3E son representaciones esquemáticas de una primera, segunda, tercera, cuarta, quinta variación de poros, respectivamente.

La Figura 4 es una vista superior de una variación del sistema de captura de células.

La Figura 5 es una vista superior de una segunda variación del sistema de captura de células.

25 La Figura 6 es una vista superior de una tercera variación del sistema de captura de células.

La Figura 7 es una vista superior de una cuarta variación del sistema de captura de células.

La Figura 8 es una vista superior de una quinta variación del sistema de captura de células.

La Figura 9 es una vista superior de una variación del sistema de captura de células que incluye un mecanismo de aislamiento.

30 La Figuras 10A, 10B, y 10C son una representación esquemática de introducción de un material de aislamiento, creación de una fotomáscara única, y selección de células de interés, respectivamente.

Las Figuras 11A, 11B, 11C, y 11D son vistas laterales de un primer, segundo, tercer y cuarto elemento óptico, respectivamente.

35 La Figura 12 es una representación esquemática de un método de fabricación de la fabricación del sistema de captura de células manufacture.

La Figura 13 es una representación esquemática de un segundo método de fabricación de la fabricación del sistema de captura de células manufacture.

40 Las Figuras 14A y 14B son una vista en perspectiva y una vista lateral de una primera variación de la herramienta de eliminación de célula, respectivamente.

Las Figuras 15A y 15B son una representación esquemática de un método de fabricación para una primera variación de la herramienta de eliminación de célula de acuerdo con la invención.

5 Las Figuras 16A, 16B, 16C, y 16D son representaciones esquemáticas de la primera variación de la eliminación de células, que incluye la identificación de células de interés, alineación de la herramienta de eliminación de célula, perforación de la herramienta de eliminación de célula de la capa superior, y eliminación de la célula de interés, respectivamente.

Las Figuras 17A y 17B son representaciones esquemáticas de una segunda variación de eliminación de células, que incluye la identificación de células de interés y alineación de la herramienta de eliminación de célula con el poro que contiene la célula de interés, respectivamente.

10 La Figura 18 es una vista superior de un poro que incluye una variación de microsferas.

La Figura 19 es una variación del uso del sistema de captura de células, que incluye la preparación de muestra.

La Figura 20 es una representación esquemática de una plataforma integrada con la que se puede utilizar un sistema de captura de células.

La Figura 21 es una representación esquemática de un colector fluidoico.

15 La Figura 22 es una representación esquemática de una estación de trabajo de muestra.

Las Figuras 23A, 23B, y 23C son representaciones esquemáticas de un método de enfoque automatizado.

Descripción detallada

La siguiente descripción incluye ejemplos útiles como antecedentes para comprender la invención para permitir que cualquier experto en la técnica haga y utilice la invención como se define en las reivindicaciones.

20 Como se muestra en las Figuras 1 y 2, un sistema 100 de captura de células incluye una matriz 200, un colector 300 de entrada y un colector 400 de salida. La matriz 200 incluye una pluralidad de poros 220, cada poro 220 incluye una cámara 222 conectada de forma fluida a un canal 224 de poros; un canal 240 de entrada conectado de forma fluida a la cámara 222; y un canal 260 de salida conectado de forma fluida al canal 224 de poros. El colector 300 de entrada se acopla de forma fluida al canal 240 de entrada, y el colector 400 de salida se acopla de forma fluida al canal 260 de salida. El sistema 100 de captura de células funciona para aislar, capturar, y mantener células, más preferiblemente células individuales, en ubicaciones direccionables conocidas. Una vez que las células se capturan en ubicaciones 25 definidas determinadas por cámaras de captura de células individuales, la red fluidica se puede utilizar para proporcionar y administrar reactivos múltiples de forma simultánea o secuencial para permitir que se realicen una variedad de reacciones celulares, subcelulares o moleculares en cada una de las células individuales. El sistema 100 de captura de células también puede permitir la interrogación óptica y la detección de eventos en cada una de las células capturadas en un solo nivel de célula. El sistema 100 de captura de células puede funcionar adicionalmente para liberar selectivamente o facilitar la eliminación selectiva de una o más de las células capturadas. El sistema 100 de captura de células puede conferir los beneficios del seguimiento de células en tiempo real, la recuperación de células viables y las pruebas moleculares selectivas posteriores, ya sea en el mismo chip microfluidico o fuera del chip. El sistema 100 de captura de células se puede utilizar para capturar células tumorales circulantes (CTC), pero también se puede utilizar para capturar cualquier otra célula adecuada de posible interés. El sistema 100 de captura de células se define preferiblemente en un chip, más preferiblemente un chip microfluidico, pero alternativamente puede ubicarse o definirse en cualquier sustrato 110 adecuado.

40 El sistema 100 de captura de células preferiblemente logra la captura y retención de células individuales sin cámaras 222 recubiertas de anticuerpos, y preferiblemente mantiene la viabilidad de las células durante todo el aislamiento, captura, retención y eliminación. El sistema 100 de captura de células preferiblemente minimiza adicionalmente la obstrucción. El sistema 100 de captura de células preferiblemente logra esto al utilizar poros 220 de tamaño adecuado y aprovechando un flujo paralelo masivo, de tal manera que las células cerca de la entrada 320 de muestra preferiblemente experimenten sustancialmente la misma presión que las células distales de la entrada 320 de muestra mientras minimizan el diferencial de presión total. Se requiere que el líquido fluya a altas velocidades a través del sistema de captura de células. La variación en la presión que sienten las células en los extremos respectivos de la matriz es preferiblemente menor al 50 % o 75 % de la presión de entrada, pero alternativamente puede ser mayor o menor. El flujo de muestra es preferiblemente sustancialmente laminar, pero alternativamente puede tener cualquier otra característica de flujo adecuada. La ruta del flujo de muestra es preferiblemente sustancialmente unidireccional, pero alternativamente puede ser bidireccional. La clasificación de células y el mantenimiento de la viabilidad se pueden lograr adicionalmente al controlar el caudal de muestra a través del sistema, o por cualquier otro medio adecuado.

55 En operación, el sistema 100 de captura de células recibe preferiblemente una muestra bajo presión positiva a través del colector 300 de entrada. El flujo de muestra a través del sistema 100 de captura de células puede fomentarse adicional o alternativamente al proporcionar presión negativa en el colector 400 de salida. Alternativamente, la presión de accionamiento se puede ciclar en forma de modulación de pulso con sinusoidal para proporcionar una presión de

accionamiento neta, ya sea neta positiva en la entrada o neta negativa en la salida. La muestra fluye preferiblemente a través del colector 300 de entrada al canal 240 de entrada, a través de las cámaras 222 y los canales 224 de poro al canal 260 de salida, y sale del sistema 100 de captura de células a través del colector 400 de salida. Las células de un tamaño predeterminado preferiblemente se atrapan dentro de la cámara 222 a medida que la muestra fluye a través de los poros 220, en los que las dimensiones del canal 224 de poros evitan preferiblemente el flujo de ciertos tamaños de célula a través de él. Por ejemplo, en la variación del sistema 100 de captura de células configurado para capturar CTC, las cámaras 222 se dimensionan preferiblemente más grandes que un CTC, y los canales 224 de poros se dimensionan preferiblemente más pequeños que el CTC.

Como se muestra en las Figuras 1 y 2, la matriz 200 del sistema 100 de captura de células funciona para capturar células de interés en ubicaciones direccionables y conocidas. La matriz 200 incluye una pluralidad de poros 220, cada poro 220 incluye una cámara 222 conectada de forma fluida a un canal 224 de poros; un canal 240 de entrada conectado de forma fluida a la cámara 222; y un canal 260 de salida conectado de manera fluida al canal 224 de poros. La matriz 200 es preferiblemente sustancialmente lineal con una anchura sustancialmente constante, pero alternativamente puede ser no lineal y/o tener una anchura variable. La matriz 200 incluye preferiblemente un canal 240 de entrada lineal, un canal 260 de salida lineal dispuesto paralelo al canal 240 de entrada, y una pluralidad de poros 220 paralelos dispuestos entre ellos, normales a los canales 320 de entrada y 260 de salida. Sin embargo, la matriz 200 puede alternativamente, ser sustancialmente lineal con una anchura divergente o convergente, en el que los canales 320 de entrada lineal y 260 de salida se disponen en ángulo, y los poros 220 consecutivos tienen longitudes crecientes o decrecientes. La matriz 200 puede ser alternativamente serpentina, bustrofedónica o tener cualquier otra geometría adecuada.

El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente una o más matrices 200. Más preferiblemente, el sistema 100 de captura de células incluye múltiples matrices 200 alineadas en paralelo, de tal manera que el canal 260 de salida de una primera matriz 200 está preferiblemente orientado en paralelo al canal 240 de entrada de una matriz 200 adyacente. Las matrices 200 múltiples son preferiblemente sustancialmente idénticas, en las que los poros 220 de las matrices 200 múltiples tienen preferiblemente las mismas dimensiones de cámara 222 o dimensiones de canal 224 de poro, los canales 240 de entrada tienen preferiblemente longitudes y anchuras similares, y los canales 260 de salida tienen preferiblemente longitudes y anchuras similares. Sin embargo, diferentes matrices 200 dentro del sistema 100 de captura de células pueden tener diferentes características de poro 220, diferentes características de canal 240 de entrada y/o diferentes características de canal 260 de salida. Por ejemplo, un sistema 100 de captura de células puede incluir múltiples matrices 200, en las que una primera matriz 200 tiene poros 220 con una anchura de canal 224 de poro grande que captura células grandes, una segunda matriz 200 tiene poros 220 con una anchura de canal 224 de poro medio que captura células de tamaño medio, y una tercera matriz 200 tiene poros 220 con una anchura de canal 224 de poro pequeño que captura células pequeñas.

Las matrices 200 múltiples se acoplan preferiblemente de forma fluida en paralelo por el colector 300 de entrada. Alternativamente, las matrices 200 múltiples se pueden acoplar de forma fluida en serie, como se muestra en la Figura 8, en las que el canal 260 de salida de una matriz 200 den dirección ascendente alimenta el canal 240 de entrada de una matriz 200 en dirección descendente adyacente.

Los poros 220 de la matriz 200 funcionan para capturar y retener células. Más preferiblemente, los poros 220 de la matriz 200 capturan y retienen una única célula. Los poros 220 incluyen preferiblemente una cámara 222 configurada para contener una célula, y un canal 224 de poros conectado de forma fluida a la cámara 222. La cámara 222 preferiblemente tiene una longitud que evita la salida de la célula debido al flujo cruzado dentro del canal 240 de entrada, y una anchura o una profundidad que evita el movimiento celular excesivo, pero permite que la célula se mueva lo suficiente como para que la célula no bloquee la unión del canal de poros. El extremo del canal 224 de poros próximo a la cámara 222 tiene preferiblemente una anchura que evita que la célula de interés pase a través, mientras permite que el componente de muestra más pequeño (por ejemplo, células lisadas, componentes celulares, etc.) fluya a través de él. El extremo del canal 224 de poros próximo a la cámara 222 es preferiblemente más pequeño que el diámetro de la célula de interés, pero puede tener cualquier otra dimensión adecuada.

Cada matriz 200 incluye preferiblemente múltiples poros 220. Por ejemplo, una matriz 200 puede incluir 100, 1000, 10.000, 1.000.000, o cualquier cantidad adecuada de poros 220. Los poros 220 preferiblemente se acoplan de forma fluida en paralelo dentro de la matriz 200, pero alternativamente se pueden acoplar de manera fluida en serie dentro de la matriz 200. Los poros 220 se disponen preferiblemente en paralelo dentro de la matriz 200, en la que los ejes longitudinales de los poros 220 adyacentes son preferiblemente paralelos. Sin embargo, los poros 220 pueden estar dispuestos en ángulo con respecto a los poros 220 adyacentes dentro de la matriz 200. Los poros 220 de una matriz 200 dada son preferiblemente sustancialmente similares o idénticos, con cámaras 222 de sustancialmente la misma dimensión y canales 224 de poros de sustancialmente misma dimensión Sin embargo, una sola matriz 200 puede tener poros 220 con dimensiones de cámara 222 y canal 224 de poros sustancialmente diferentes, con diferentes longitudes de cámara 222, anchuras de cámara 222, profundidades de cámara 222, longitudes de canal 224 de poros, anchuras de canal 224 de poros, profundidades de canal 224 de poros, número de canales 224 de poro por poro 220, número de cámaras 222 por poro 220 o poros 220 que varían a lo largo de cualquier otro parámetro adecuado. Por ejemplo, una matriz 200 puede tener múltiples poros 220 dispuestos en paralelo, en los que los poros 220 consecutivos tienen anchuras de canal de poros decrecientes.

La cámara 222 del poro 220 funciona para retener una célula. La cámara 222 se conecta de manera fluida al canal 240 de entrada y al canal 224 de poros. La cámara 222 tiene una longitud y una anchura configuradas para retener una célula aislada, en la que la cámara 222 está dimensionada para evitar la salida de la célula de la cámara 222 debido al flujo cruzado del canal de entrada. En un ejemplo, esto se logra al controlar la relación de anchura a altura de la cámara 222. La relación de anchura a altura de la cámara 222 es preferiblemente 1, pero alternativamente puede ser 1.25, 0.5 o cualquier otra relación adecuada. La cámara 222 se configura preferiblemente para retener una única célula y para evitar la retención de múltiples células. En un ejemplo, la cámara 222 está dimensionada de tal manera que la altura/anchura de la cámara 222 impide que una segunda célula se asiente al extremo de la cámara 222 proximal al canal 224 de poros (por ejemplo, el fondo de la cámara 222), y la longitud de la cámara 222 evita una salida de célula única desde la cámara 222 (por ejemplo, la longitud es más larga que el diámetro de la célula), pero fomenta la salida de una segunda célula desde la cámara 222 (por ejemplo, la longitud es más larga que el diámetro de la célula, pero más corta que dos diámetros de célula). La cámara 222 tiene una longitud, anchura y profundidad entre 25 y 50 micras. En un ejemplo, la cámara tiene una longitud de 50 micrómetros, una anchura de 50 micrómetros y una altura de 50 micrómetros. En otro ejemplo, la cámara tiene una longitud de 25 micrómetros, una anchura de 25 micrómetros y una altura de 30 micrómetros. La cámara 222 tiene preferiblemente una sección transversal sustancialmente constante, pero alternativamente puede tener una sección transversal que se estrecha gradualmente, preferiblemente que se estrecha desde el canal 240 de entrada al canal 224 de poros. La sección transversal variable puede ser la sección transversal paralela a la ancha cara del sustrato 112 y/o la sección transversal perpendicular al eje longitudinal de la cámara 222. En un ejemplo, como se muestra en la Figura 3B, la cámara 222 tiene una sección transversal rectangular, en la que el canal 224 de poros se conecta a un lado de la cámara 222 opuesto al conectado al canal 240 de entrada. En otro ejemplo, la cámara 222 tiene una sección transversal parabólica, como se muestra en la Figura 3A y la Figura 3C, en la que el canal 224 de poros se conecta al vértice del perfil parabólico. En otro ejemplo, como se muestra en la Figura 3D, la sección transversal de la cámara disminuye linealmente desde el canal 240 de entrada al canal 224 de poros. En otro ejemplo, como se muestra en la Figura 3E, la sección transversal de la cámara disminuye gradualmente desde el canal 240 de entrada hasta el canal 224 de poros. En este ejemplo, la cámara 222 define múltiples subcámaras, en la que las múltiples subcámaras se conectan preferiblemente de manera fluida en serie, en las que una primera subcámara se conecta de manera fluida al canal 240 de entrada y la última subcámara se conecta de manera fluida al canal 224 de poros. La primera subcámara tiene preferiblemente la mayor anchura y/o profundidad, y la última subcámara tiene preferiblemente la menor anchura y/o profundidad. La transición entre el canal 240 de entrada y la cámara 222 exhibe preferiblemente un ángulo convexo (por ejemplo, un ángulo de 90 °), pero alternativamente se puede curvar como se muestra en la Figura 3C. La transición entre la cámara 222 y el canal 224 de poros también exhibe preferiblemente un ángulo convexo (por ejemplo, un ángulo de 90 °), pero alternativamente puede ser curva.

El canal 224 de poros del poro 220 funciona para filtrar la célula 10 de interés y permitir que fluyan componentes de muestra más pequeños. El canal 224 de poros se conecta de manera fluida a la cámara 222 y el canal 260 de salida. El canal 224 de poros se conecta de manera fluida a la porción de la cámara 222 distal del canal 240 de entrada. El canal 224 de poros es preferiblemente sustancialmente recto y lineal, pero alternativamente puede ser curvo. El canal 224 de poros tiene una anchura menor que el diámetro de la célula 10 de interés, de tal manera que el canal 224 de poros impide el paso de la célula a su través. El canal 224 de poros tiene una anchura entre 7 y 10 micras y preferiblemente tiene una profundidad entre 1-25 micras y una longitud entre 5-500 micras. En un ejemplo, el canal 224 de poros tiene una anchura de 7-10 micrómetros, una profundidad de 7-10 micrómetros y una longitud de 5-50 micrómetros. El canal 224 de poros tiene preferiblemente una sección transversal sustancialmente constante, pero alternativamente puede tener una sección transversal que se estrecha o es variable. El canal 224 de poros se alinea preferiblemente con su eje longitudinal paralelo al eje longitudinal de la cámara 222. Más preferiblemente, el canal 224 de poros es coaxial con la cámara 222. Sin embargo, el canal 224 de poros se puede alinear en ángulo con la cámara 222. Cada poro 220 incluye preferiblemente un canal 224 de poro único, pero alternativamente puede incluir canales 224 de poro múltiples, en los que los canales 224 de poro múltiple se extienden preferiblemente en paralelo desde el extremo de la cámara 222 respectiva proximal al canal 260 de salida.

El canal 240 de entrada de la matriz 200 funciona para recibir un volumen de la muestra y distribuir la muestra a los poros 220. El canal 240 de entrada conecta de forma fluida el colector 300 de entrada a las cámaras 222 de la matriz 200. El canal 240 de entrada incluye preferiblemente un primer extremo, un segundo extremo y un canal que conecta los extremos primero y segundo. El canal 240 de entrada se conecta preferiblemente de forma fluida al colector 300 de entrada en el primer extremo, se conecta de forma fluida a las cámaras 222 de la matriz 200 a lo largo de la longitud del canal 240 de entrada, y se sella preferiblemente de forma fluida en el segundo extremo. El segundo extremo puede ser sellado por el sustrato 110 o puede ser sellado por un sellador, tal como un laminado autosellante (por ejemplo, hecho de caucho, polietileno, etc.). Sin embargo, el canal 240 de entrada puede incluir una primera y/o segunda válvula dispuesta dentro del primer y/o segundo extremo, en el que las válvulas pueden operar entre un estado abierto y un estado cerrado. El cuerpo del canal 240 de entrada se define preferiblemente por el sustrato 110, pero alternativamente puede estar parcialmente definido por el sustrato 110, en el que las otras porciones se pueden definir mediante un laminado autosellante o cualquier otro sellador adecuado. El canal 240 de entrada se dispone preferiblemente de tal manera que el eje longitudinal del canal de entrada sea perpendicular a los ejes longitudinales de las cámaras 222, pero alternativamente se puede disponer en ángulo. Las cámaras 222 se extienden preferiblemente desde un solo lado del canal 240 de entrada, pero alternativamente se pueden extender desde múltiples lados (por ejemplo, lados opuestos). El canal 240 de entrada es preferiblemente sustancialmente recto, pero alternativamente puede ser curvado.

o doblado. El canal 240 de entrada tiene preferiblemente una sección transversal sustancialmente constante, pero alternativamente puede tener una sección transversal variable. La sección transversal puede ser la sección transversal paralela al eje longitudinal del canal de entrada o perpendicular al eje longitudinal del canal de entrada. En una variación, el canal 240 de entrada se estrecha con la distancia del colector 300 de entrada. El canal 240 de entrada tiene preferiblemente una profundidad y una anchura mayores que el diámetro de la célula 10 de interés. El canal 240 de entrada preferiblemente tiene una profundidad y/o anchura entre 5-200 micras, pero alternativamente puede tener cualquier profundidad y/o anchura adecuada. En una variación, el canal de entrada tiene una anchura de 50-100 micrómetros y una profundidad de 50-100 micrómetros. El canal 240 de entrada tiene preferiblemente una longitud que puede acomodar todos los poros 220 de la matriz 200. En una variación, el canal 240 de entrada tiene preferiblemente una longitud más larga que las anchuras combinadas de las cámaras 222. En otra variación, el canal 240 de entrada se extiende hasta el borde del sustrato 110. Cada matriz 200 incluye preferiblemente un canal 240 de entrada, pero alternativamente puede incluir múltiples canales 240 de entrada. Por ejemplo, una matriz 200 puede incluir dos canales 240 de entrada que alimentan dos conjuntos de poros 220 que se extienden desde lado de un canal de salida central 260, en el que cada canal 240 de entrada alimenta un conjunto de poros 220. Sin embargo, la matriz 200 puede incluir cualquier configuración adecuada de canales 240 de entrada.

El canal 260 de salida de la matriz 200 funciona para recibir un volumen de la muestra y distribuir la muestra a los poros 220. El canal 260 de salida incluye preferiblemente un primer extremo, un segundo extremo y un canal que conecta el primero y segundo extremos. El canal 260 de salida se conecta preferiblemente de manera fluida al colector 400 de salida en el segundo extremo, conectado de manera fluida a las cámaras 222 de la matriz 200 a lo largo de la longitud del canal 260 de salida, y preferiblemente se sella de manera fluida en el primer extremo. El primer extremo del canal 260 de salida se puede sellar con el sustrato 110 o se puede sellar con un sellador, tal como un laminado autosellante (por ejemplo, hecho de caucho, polietileno, etc.). Alternativamente, el canal 260 de salida puede incluir una primera y/o segunda válvula dispuesta dentro del primer y/o segundo extremo, en el que las válvulas pueden operar entre un estado abierto y un estado cerrado. El cuerpo del canal 260 de salida se define preferiblemente por el sustrato 110, pero alternativamente se puede definir parcialmente por el sustrato 110, en el que las otras porciones se pueden definir por laminado autosellante o cualquier otro sellador adecuado. El canal 260 de salida puede preferiblemente dispuesto de tal manera que el eje longitudinal del canal de salida es perpendicular a los ejes longitudinales de las cámaras 222, pero alternativamente se puede disponer en ángulo. Las cámaras 222 se extienden preferiblemente desde un solo lado del canal 260 de salida, pero alternativamente pueden extenderse desde múltiples lados (por ejemplo, lados opuestos). El canal 260 de salida es preferiblemente sustancialmente recto, pero alternativamente se puede curvar o doblar. El canal 260 de salida tiene preferiblemente una sección transversal sustancialmente constante, pero alternativamente puede tener una sección transversal variable. La sección transversal del canal 260 de salida puede ser el eje longitudinal del canal de salida paralelo de la sección transversal o perpendicular al eje longitudinal del canal de salida. En una variación, el canal 260 de salida se estrecha con una distancia alejada del colector 400 de salida. El canal 260 de salida tiene preferiblemente una profundidad y anchura similar a la del canal 240 de entrada, pero alternativamente puede tener una profundidad y anchura menor o mayor que aquella del canal 240 de entrada. El canal 260 de salida preferiblemente tiene una profundidad y/o anchura entre 5-200 micras, pero alternativamente puede tener cualquier profundidad y/o anchura adecuada. En una variación, el canal de salida tiene una anchura de 50-100 micrómetros y una profundidad de 50-100 micrómetros. El canal 260 de salida tiene preferiblemente una longitud que puede acomodar todos los poros 220 de la matriz 200. En una variación, el canal 260 de salida tiene preferiblemente una longitud más larga que las anchuras combinadas de las cámaras 222. En otra variación, el canal 260 de salida se extiende hasta el borde del sustrato 110. Cada matriz 200 incluye preferiblemente un canal 260 de salida, pero alternativamente puede incluir múltiples canales 260 de salida. Por ejemplo, una matriz 200 puede incluir dos canales 260 de salida que salen dos conjuntos de poros 220 que se extienden desde lado de un canal 240 de entrada central, en el que cada canal 260 de salida sale de un conjunto de poros 220.

El colector 300 de entrada del sistema 100 de captura de células funciona para recibir una muestra y distribuir la muestra a las matrices 200. Más preferiblemente, el colector 300 de entrada distribuye la muestra a un canal 240 de entrada de una matriz 200. El colector 300 de entrada preferiblemente incluye adicionalmente una entrada 320, en la que el colector 300 de entrada recibe la muestra desde la entrada 320. El colector 300 de entrada proporciona preferiblemente una ruta de flujo sustancialmente lineal desde la entrada 320 hasta los canales 240 de entrada mientras minimiza sustancialmente las diferencias en la presión experimentada por diferentes matrices 200 dentro del sistema. El colector 300 de entrada se define preferiblemente dentro de la misma cara ancha del sustrato que la matriz 200, pero alternativamente se puede definir a través de una porción o la totalidad del grosor del sustrato. La totalidad del colector 300 de entrada, excepto la entrada 320, se sella preferiblemente de forma fluida por la capa 120 superior.

En una variación, como se muestra en la Figura 4, el sistema 100 de captura de células incluye colectores 300 de entrada múltiples, uno para cada canal 240 de entrada. En esta variación, los colectores 300 de entrada múltiples pueden recibir una única muestra o múltiples muestras.

En otra variación, como se muestra en las Figuras 5, 6 y 7, el sistema incluye un único colector 300 de entrada que alimenta todos los canales 240 de entrada. El colector 300 de entrada conecta de manera fluida las matrices 200 en paralelo para facilitar el flujo paralelo en todo el sistema 100 de captura de células. Sin embargo, el colector 300 de entrada puede conectar alternativamente de manera fluida las matrices 200 en serie o en cualquier combinación adecuada de serie y flujo paralelo. El colector 300 de entrada incluye preferiblemente uno o más niveles de

subcolectores 302 de entrada. Cada subcolector 302 de entrada incluye preferiblemente un canal 204 principal y una pluralidad de canales 206 de alimentación, en los que los canales 206 de alimentación facilitan el flujo de la muestra en los subcolectores subsiguientes o los canales 240 de entrada de las matrices 200. Los canales 206 de alimentación conectados directamente de forma fluida a los canales 240 de entrada están preferiblemente alineados y coextensivos con los canales 240 de entrada, pero alternativamente pueden ser perpendiculares a los canales 240 de entrada o dispuestos en cualquier configuración adecuada. El canal 204 principal conecta preferiblemente de manera fluida los canales 206 de alimentación en paralelo. Los canales 206 de alimentación se disponen preferiblemente paralelos a los otros canales 206 de alimentación, y preferiblemente todos se extienden perpendicularmente desde un lado del canal 204 principal. Sin embargo, los canales 206 de alimentación pueden estar dispuestos en un ángulo agudo con relación al canal 204 principal, se extienden desde lados opuestos del canal 204 principal, o estar dispuesto de otra manera adecuadamente. Los subcolectores conectados directamente de manera fluida a los canales 240 de entrada se acoplan preferiblemente cada uno a un subconjunto de las matrices 200 para minimizar la diferencia de presión entre las matrices 200 proximales a la entrada del subcolector y las matrices 200 distales de la entrada 320 del subcolector. Sin embargo, un único subcolector puede alimentar directamente todas las matrices 200 del sistema 100 de captura de células.

En una variación, el sistema 100 de captura de células incluye un colector 300 de entrada con un nivel de subcolector de entrada, en el que el subcolector 302 de entrada incluye múltiples canales 206 de alimentación, cada canal de alimentación se conecta independientemente de forma fluida a un canal 240 de entrada de una matriz 200.

En otra variación, el sistema 100 de captura de células incluye un colector 300 de entrada que incluye dos niveles de subcolectores 302 de entrada (como se muestra en la Figura 5), en el que los canales 206 de alimentación del primer nivel se conectan de manera fluida a los canales 204 principales del segundo nivel, y los canales 206 de alimentación del segundo nivel se conectan de manera fluida a los canales 240 de entrada. El primer nivel incluye preferiblemente un subcolector 302 de entrada, con un canal 204 principal y múltiples canales 206 de alimentación. El segundo nivel incluye preferiblemente subcolectores 302 de entrada múltiples, en los que cada subcolector 302 de entrada de segundo nivel se conecta de manera fluida a un canal de alimentación de primer nivel y un subconjunto de matrices 200 del sistema 100 de captura de células. Por ejemplo, un subcolector 302 de entrada de segundo nivel el colector se puede conectar de manera fluida a cuatro canales 240 de entrada de un sistema 100 de captura de células de cuarenta matrices 200, en el que el subcolector 302 de entrada de segundo nivel incluye un canal 204 principal y cuatro canales 206 de alimentación, cada canal de alimentación se conecta independientemente de manera fluida a un canal 240 de entrada. En esta variación, el canal 204 principal de primer nivel tiene preferiblemente una anchura y/o altura mayor que los canales 204 principales de segundo nivel, y los canales 206 de alimentación del primer nivel tienen preferiblemente una anchura y una anchura mayores/o altura que los canales 206 de alimentación de segundo nivel. Los canales 206 de alimentación de segundo nivel son preferiblemente sustancialmente de la misma anchura y/o altura que los canales 240 de entrada, pero alternativamente pueden tener diferentes dimensiones que los canales 240 de entrada. En otra variación, el colector 300 de entrada incluye tres niveles de subcolectores 302 de entrada ramificados. Sin embargo, el colector 300 de entrada puede incluir cualquier número adecuado de niveles de subcolector de entrada.

La entrada 320 del colector 300 de entrada funciona para proporcionar una conexión fluida entre el sistema 100 de captura de células exterior e interior. Más preferiblemente, la entrada 320 proporciona una conexión fluida entre el exterior del sistema 100 de captura de células y el colector 300 de entrada. El sistema 100 de captura de células preferiblemente incluye una entrada 320, pero alternativamente puede incluir múltiples entradas 320. Cada entrada 320 preferiblemente se conecta de forma fluida a un colector 300 de entrada a través de una conexión fluida (por ejemplo, un canal), pero alternativamente se puede conectar a colectores 300 de entrada múltiples. Cada colector 300 de entrada se conecta preferiblemente de forma fluida a una entrada 320, pero alternativamente se puede conectar a múltiples entradas 320. El eje longitudinal de la entrada 320 es preferiblemente normal al eje longitudinal del canal 204 principal del colector 300 de entrada, pero alternativamente puede ser paralelo. El eje longitudinal de entrada 320 es preferiblemente normal a la cara ancha del sustrato 112, pero alternativamente puede ser paralelo a la cara ancha del sustrato 112, en ángulo con respecto a la cara ancha del sustrato 112, o dispuesto de cualquier manera adecuada. En una variación del sistema 100 de captura de células, la entrada 320 es un orificio o abertura a través de una porción del grosor del sustrato, que se extiende desde una cara ancha del sustrato 112 hasta el plano que define el colector 300 de entrada. La cara ancha del sustrato 112 desde el cual se extiende la entrada 320 puede ser la cara ancha en la que se define el colector 300 de entrada, en donde una conexión de fluido que conecta la entrada 320 y el colector 300 de entrada también se define en la misma cara ancha, o puede ser la cara ancha opuesta a la que se define el colector 114 de entrada, en el que la entrada 320 se extiende a través de sustancialmente todo el grosor del sustrato para conectarse con el colector 300 de entrada. En otra variación del sistema 100 de captura de células, la entrada 320 es un orificio o abertura a través de un lado del sustrato 110, en el que la entrada 320 se extiende en paralelo con una cara ancha del sustrato 112 hacia el colector 300 de entrada. En esta variación, una conexión de fluido normal a la cara ancha del sustrato 112 conecta preferiblemente la entrada 320 con el colector 300 de entrada. Sin embargo, se puede utilizar cualquier configuración adecuada de la entrada 320.

El colector 400 de salida del sistema 100 de captura de células funciona para recibir la muestra filtrada y para extraer la muestra filtrada del sistema 100 de captura de células. Más preferiblemente, el colector 400 de salida recibe la muestra filtrada desde un canal 260 de salida de una matriz 200. El colector 400 de salida preferiblemente incluye adicionalmente una salida 420, en la que el colector 400 de salida sale de la muestra filtrada de la salida 420. El

colector 400 de salida proporciona preferiblemente una ruta de flujo sustancialmente lineal desde los canales 260 de salida hasta la salida 420, pero puede alternativamente, proporcionar una ruta de flujo tortuoso. El colector 400 de salida se define preferiblemente dentro de la misma cara ancha del sustrato que la matriz 200, pero alternativamente se puede definir a través de una porción o la totalidad del grosor del sustrato, en la cara ancha opuesta del sustrato 112, o en cualquier porción adecuada del sustrato 110. La totalidad del colector 400 de salida, excepto la salida 420, está preferiblemente sellada de forma fluida por la capa 120 superior.

En una variación, como se muestra en la Figura 4, el sistema 100 de captura de células incluye múltiples colectores 400 de salida, uno para cada canal 260 de salida. En esta variación, los múltiples colectores 400 de salida pueden recibir una sola muestra filtrada o múltiples muestras filtradas.

En otra variación, como se muestra en las Figuras 5, 6 y 7, el sistema incluye un único colector 400 de salida que recibe la muestra filtrada de todos los canales 260 de salida. El colector 400 de salida preferiblemente conecta de forma fluida las matrices 200 en paralelo, pero alternativamente puede conectar de forma fluida las matrices 200 en serie o en cualquier combinación adecuada de flujo en serie y paralelo. El colector 400 de salida incluye preferiblemente uno o más niveles de subcolectores 402 de salida. Cada subcolector 402 de salida incluye preferiblemente un canal 204 principal y una pluralidad de canales 206 de alimentación, en los que los canales 206 de alimentación facilitan el flujo de muestra filtrada desde los subcolectores en dirección ascendente o los canales 260 de salida de las matrices 200 al canal 204 principal. Los canales 206 de alimentación directamente conectados de forma fluida a los canales 260 de salida son preferiblemente paralelos y coextensivos con los canales 260 de salida, pero alternativamente pueden ser perpendiculares a los canales 260 de salida o se disponen en cualquier configuración adecuada. El canal 204 principal conecta preferiblemente de manera fluida los canales 206 de alimentación en paralelo. Los canales 206 de alimentación se disponen preferiblemente paralelos a los otros canales 206 de alimentación, y preferiblemente todos se extienden perpendicularmente desde un lado del canal 204 principal. Sin embargo, los canales 206 de alimentación se pueden disponer en un ángulo agudo con respecto al canal 204 principal, extender desde lados opuestos del canal 204 principal, o estar dispuestos de otra manera adecuadamente. Los subcolectores 402 de salida directamente conectados de forma fluida a los canales 260 de salida están preferiblemente acoplados cada uno a un subconjunto de las matrices 200. Sin embargo, un único subcolector 402 de salida puede recibir directamente la muestra filtrada de todas las matrices 200 del sistema 100 de captura de células.

En una variación, el sistema 100 de captura de células incluye un colector 400 de salida con un nivel de subcolector de salida, en el que el subcolector 402 de salida incluye múltiples canales 206 de alimentación, cada canal de alimentación se conecta independientemente de forma fluida a un canal 260 de salida de una matriz 200.

En otra variación, el sistema 100 de captura de células incluye un colector 400 de salida que incluye dos niveles de subcolectores 402 de salida, en los que los canales 206 de alimentación del primer nivel se conectan de manera fluida a los canales 204 principales del segundo nivel, y los canales 206 de alimentación del segundo nivel se conectan de forma fluida a los canales 260 de salida. El primer nivel incluye preferiblemente un subcolector 402 de salida, con un canal 204 principal y múltiples canales 206 de alimentación. El segundo nivel preferiblemente incluye múltiples subcolectores 402 de salida, en los que cada subcolector 402 de salida de segundo nivel se conecta de manera fluida a un canal de alimentación de primer nivel y un subconjunto de las matrices 200 del sistema 100 de captura de células. Por ejemplo, un subcolector 402 de salida de segundo nivel puede estar conectado de manera fluida a cuatro canales 260 de salida de un sistema 100 de captura de células de cuarenta matrices 200, en el que el subcolector 402 de salida de segundo nivel incluye un canal 204 principal y cuatro canales 206 de alimentación, cada canal de alimentación se conecta de manera fluida independientemente a un canal 260 de salida. En esta variación, el canal 204 principal de primer nivel tiene preferiblemente una anchura y/o altura mayor que los canales 204 principales de segundo nivel, y los canales 206 de alimentación del primer nivel tienen preferiblemente una anchura y/o altura mayor que los canales 206 de alimentación del segundo nivel. Los canales 206 de alimentación del segundo nivel son preferiblemente sustancialmente de la misma anchura y/o altura que los canales 260 de salida, pero alternativamente pueden tener diferentes dimensiones que los canales 260 de salida. En otra variación, el colector 400 de salida incluye tres niveles de subcolectores 402 de salida ramificada. En otra variación, el colector 400 de salida incluye el mismo número de niveles que el colector 300 de entrada. Sin embargo, el colector 400 de salida puede incluir cualquier número adecuado de niveles de subcolector de salida.

La salida 420 del colector 400 de salida funciona para proporcionar una conexión fluida entre el sistema 100 de captura de células interior y el sistema 100 de captura de células exterior. Más preferiblemente, la salida 420 proporciona una conexión fluida entre el sistema 100 de captura de células exterior y el colector 400 de salida. El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente una salida 420, pero alternativamente puede incluir múltiples salidas 420. Cada salida 420 preferiblemente se conecta de forma fluida a un colector 400 de salida a través de una conexión de fluido (por ejemplo, un canal), pero se puede conectar alternativamente a múltiples colectores 400 de salida. Cada colector 400 de salida se conecta preferiblemente de forma fluida a una salida 420, pero alternativamente se puede conectar a múltiples salidas 420. El eje longitudinal de la salida 420 es preferiblemente normal al eje longitudinal del canal 204 principal del colector 400 de salida, pero alternativamente puede ser paralelo. El eje longitudinal de la salida 420 es preferiblemente normal a la cara ancha del sustrato 112, pero alternativamente puede ser paralelo a la cara ancha del sustrato 112, en un ángulo con respecto a la cara ancha del sustrato 112, o dispuesto de cualquier manera adecuada. En una variación del sistema 100 de captura de células, la salida 420 es un orificio o abertura a través de una porción del grosor del sustrato, que se extiende desde una cara ancha del sustrato 112 hasta el plano que define

el colector 400 de salida. La cara ancha del sustrato 112 desde el cual se extiende la salida 420 puede ser la cara ancha en la que se define el colector 400 de salida, en el que una conexión de fluido que conecta la salida 420 y el colector 400 de salida también se definen en la misma cara ancha, o la cara ancha opuesta a esa en el que se define el colector de salida 114, en el que la salida 420 se extiende sustancialmente a través de todo el grosor del sustrato para conectarse con el colector 400 de salida. Cuando la entrada 320 se define en una cara ancha del sustrato 112, la salida 420 se define preferiblemente en la misma cara ancha que la entrada 320, pero alternativamente se puede definir en la cara ancha opuesta. En otra variación del sistema 100 de captura de células, la salida 420 es un orificio o abertura a través de un lado del sustrato 110, en el que la salida 420 se extiende en paralelo con una cara ancha del sustrato 112 hacia el colector 400 de salida. En esta variación, una conexión de fluido normal a la cara ancha del sustrato 112 conecta preferiblemente la salida 420 con el colector 400 de salida. Cuando la entrada 320 también se define en un lado del sustrato 110, la salida 420 se define preferiblemente en un lado del sustrato opuesto al lado que define la entrada 320. Sin embargo, la salida 420 se puede definir alternativamente en el mismo lado o en un lado adyacente. Sin embargo, se puede utilizar cualquier configuración adecuada de la salida 420.

El sistema 100 de captura de células puede incluir adicionalmente un mecanismo 500 de aislamiento que funciona para aislar células dentro de los poros 220 individuales. En una variación, el mecanismo 500 de aislamiento incluye una entrada 520 de aislamiento y una salida 540 de aislamiento, conectada de forma fluida a una matriz 200, que funciona para permitir la entrada y salida de material de aislamiento, respectivamente. Tanto la entrada 520 de aislamiento como la salida 540 de aislamiento preferiblemente se conectan de manera fluida tanto al canal 240 de entrada como al canal 260 de salida. En una variación, como se muestra en la Figura 9, la entrada 520 de aislamiento se puede disponer entre el primer extremo del canal 240 de entrada y el canal 260 de salida en el extremo de entrada de la matriz 200, y la salida 540 de aislamiento se dispone entre el segundo extremo del canal 240 de entrada y el canal 260 de salida en el extremo de salida de la matriz 200. Las entradas 520 de aislamiento o las salidas 540 de las matrices 200 se pueden conectar de manera fluida en paralelo o en serie por uno o más colectores de entrada o salida de aislamiento, respectivamente. En operación, el material de aislamiento fluye preferiblemente a través de la entrada 520 de aislamiento, hacia el canal 240 de entrada y el canal 260 de salida, hacia la salida 540 de aislamiento, formando una primera capa de aislamiento entre la cámara 222 y el canal 240 de entrada, y una segunda capa de aislamiento entre el canal 224 de poros y el canal 260 de salida. Las capas de aislamiento tienen preferiblemente un grosor de 10 a 20 micrómetros, pero alternativamente pueden ser más gruesas. Durante la introducción del material de aislamiento, el tampón preferiblemente fluye simultáneamente a través del canal 240 de entrada y el canal 260 de salida, preferiblemente en la misma dirección que el flujo de material de aislamiento, en el que la velocidad de flujo del tampón controla preferiblemente el grosor de las capas de material de aislamiento. El flujo de tampón se establece preferiblemente en las porciones de la entrada 320 y el canal 260 de salida distales de los poros 220. El caudal de tampón se mantiene preferiblemente en flujo laminar, pero alternativamente puede tener cualquier otro caudal adecuado. Alternativamente, la entrada 520 de aislamiento y la salida 540 se pueden conectar de manera fluida a un primer y segundo canal de aislamiento ubicado dentro del canal 240 de entrada y el canal 260 de salida, respectivamente, en el que el primer y el segundo canal de aislamiento guían el flujo de material de aislamiento. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro mecanismo adecuado que pueda establecer una primera y segunda capa de aislamiento.

El material de aislamiento aísla preferiblemente un poro 220 dentro de una matriz 200. El material de aislamiento tiene preferiblemente un estado de flujo y un estado establecido, en el que una reacción fotoquímica, reacción termoquímica, reacción de polimerización o cualquier otra reacción adecuada cambia el material de aislamiento del estado de flujo al estado establecido. En el estado de flujo, el material de aislamiento es preferiblemente sustancialmente viscoso, de tal manera que el material de aislamiento no fluye hacia los poros 220 durante la introducción en el sistema 100 de captura de células. En el estado establecido, el material de aislamiento es preferiblemente un sólido o gel que impide salida de la célula del poro 220, y es preferiblemente poroso o selectivamente permeable para permitir la penetración del tampón y el reactivo a través del mismo. El material de aislamiento es preferiblemente un hidrogel fotopolimerizable, tal como PEG o poliacrilamida con fotoiniciador, pero alternativamente puede ser cualquier material adecuado con cualquier otro agente de polimerización adecuado. En una variación, la capa de aislamiento puede ser un líquido inmiscible tal como el aceite. En otra variación, se pueden hacer reaccionar porciones seleccionadas del material de aislamiento para sellar poros 220 específicos. Por ejemplo, como se muestra en la Figura 10B, se puede crear una fotomáscara 504 única que permite la irradiación colimada de segmentos de material de aislamiento que bloquean los poros 220 que contienen las células de interés. La fotomáscara 504 se puede crear mediante la impresión de alta resolución de tinta negra que bloquea los rayos UV en una hoja de transparencia o mediante el uso de fotolitografía estándar sobre máscaras de vidrio recubiertas con fotorresistencia. La exposición selectiva a los rayos UV de regiones seleccionadas del chip microfluidico también se puede lograr al mover un láser UV o un punto UV colimado y concentrado a las ubicaciones seleccionadas utilizando una etapa x-y. Como se muestra en la Figura 10C, las células 20 no deseadas y el material de aislamiento sin reaccionar entonces se pueden eliminar del sistema 100 de captura de células al introducir fluido a través del colector 400 de salida (por ejemplo, reflujo). Alternativamente, la fotomáscara 504 puede permitir la irradiación de segmentos de material de aislamiento que bloquean los poros 220 que contienen células 20 no deseadas, en los que las células 10 deseadas se recuperan del sistema. Sin embargo, puede reaccionar cualquier porción adecuada del material de aislamiento.

El sistema 100 de captura de células puede incluir adicionalmente elementos 130 ópticos que funcionan para facilitar la formación de imágenes. Los elementos 130 ópticos funcionan para ajustar la luz entrante, preferiblemente para

facilitar una mejor formación de imágenes. Los elementos 130 ópticos pueden funcionar para doblar, reflejar, colimar, enfocar, rechazar o ajustar la luz entrante. Los elementos 130 ópticos se fabrican preferiblemente dentro del mismo proceso que la fabricación del sistema 100 de captura de células, pero alternativamente se pueden incluir después de la fabricación del sistema 100 de captura de células. Los elementos 130 ópticos se definen preferiblemente dentro del sustrato 110, pero alternativamente se pueden definir por la capa 120 superior o por un componente separado. Los elementos 130 ópticos pueden incluir reflectores de luz dispuestos dentro del grosor del sustrato adyacente a las matrices 200 (como se muestra en la Figura 11A), definidos en una cara ancha del sustrato 112 opuesto al que define el sistema 100 de captura de células (como se muestra en la Figura 11B), o microlentes definidos en la capa 120 superior (como se muestra en la Figura 11C), colimadores de luz, polarizadores de luz, filtros de interferencia, iluminación de 90 °, elementos que minimizan la entrada de rayos de excitación en la ruta de la luz de emisión de fluorescencia, filtros de difracción, difusores de luz o cualquier otro elemento óptico adecuado. Alternativamente, los elementos 130 ópticos se pueden definir mediante una etapa de formación de imágenes (como se muestra en la Figura 11D) o mediante cualquier componente externo.

El sistema 100 de captura de células puede incluir adicionalmente mecanismos de afinidad de poros que funcionan para atraer una célula 10 de interés hacia una cámara 222 de poros. Los mecanismos de afinidad de poros pueden incluir trampas de campo eléctrico, características dentro del canal 240 de entrada que dirigen el flujo hacia un poro 220, aplicación de presión negativa al canal 260 de salida, o cualquier otro mecanismo de afinidad de poros adecuado.

El sistema 100 de captura de células se define preferiblemente en un sustrato 110. Más preferiblemente, el sistema 100 de captura de células se define en una sola cara ancha de un sustrato 112, en el que la matriz 200, que incluye el canal 240 de entrada, poros 220, y el canal 260 de salida, se define preferiblemente en una sola cara ancha del sustrato 112. Más preferiblemente, la matriz 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida están todos definidos en la misma cara ancha. Por lo tanto, el flujo de muestra a través del sistema 100 de captura de células preferiblemente corre sustancialmente paralelo a la cara ancha del sustrato 112. La matriz 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida se definen preferiblemente por cavidades en la cara ancha del sustrato 112, pero alternativamente pueden ser canales definidos por paredes que están construidas sobre el sustrato 110, o definidas de cualquier otra manera adecuada. El sustrato 110 define preferiblemente una porción del sistema 100 de captura de células (por ejemplo, tres paredes del sistema), en el que las porciones restantes (por ejemplo, una pared) se definen preferiblemente por una capa 120 superior. La capa 120 superior preferiblemente forma un sello sustancialmente impermeable a los fluidos con el sustrato 110 para sellar de manera fluida el sistema 100 de captura de células. Alternativamente, el sistema 100 de captura de células se puede definir a través del grosor del sustrato 110, en el que el canal 240 de entrada se define en una primera cara ancha del sustrato 112, el canal 260 de salida se define en una cara ancha opuesta del sustrato 112, y los poros 220 se definen a través del grosor del sustrato 110.

El sustrato 110 es preferiblemente ópticamente transparente, biocompatible y sustancialmente inerte. Los ejemplos de material que se pueden utilizar para el sustrato 110 incluyen vidrio, polímero de alto índice de refracción o cualquier otro material ópticamente transparente adecuado; silicio; cualquier polímero adecuado tal como polietileno, polipropileno, policarbonato, acrílico o silicona; cuarzo, vidrio, metales, cerámica o cualquier otro material adecuado. La capa 120 superior es preferiblemente una capa ópticamente transparente que está laminada, adherida, unida por calor, unida por láser, unida anódica, o unida de otra manera al sustrato 110. La capa 120 superior es preferiblemente un laminado polimérico, pero alternativamente puede ser un cubreobjetos de vidrio o cualquier otra capa 120 superior adecuada.

El sistema 100 de captura de células se fabrica preferiblemente mediante procesos de microfabricación, pero alternativamente se puede fabricar mediante moldeo por inyección, una combinación de microfabricación (por ejemplo, para crear maestros) y moldeo por inyección (por ejemplo, para la fabricación a granel), una combinación de microfabricación (por ejemplo, para crear maestros) y estampado en caliente (por ejemplo, para la fabricación a granel), grabado con láser, CNC o cualquier otro proceso de fabricación adecuado. Las técnicas de microfabricación que se pueden utilizar incluyen fotolitografía, DRIE, grabado húmedo y unión anódica, pero se puede utilizar cualquier técnica de microfabricación adecuada. Las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida se forman preferiblemente dentro de un único proceso de fabricación, pero se pueden formar alternativamente a través de múltiples procesos secuenciales o interrumpidos. La entrada 320 y la salida 420 se pueden formar adicionalmente dentro del mismo proceso que aquel de las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida, pero alternativamente se pueden formar antes o después de utilizar diferentes procesos.

En una variación, como se muestra en la Figura 12, el sistema 100 de captura de células se fabrica utilizando un proceso de moldeo por inyección. El maestro de moldeo por inyección incluye una porción 102 de definición de matriz, una porción 104 de definición inferior y uno o más pasadores 106 centrales. La porción de definición de matriz incluye preferiblemente el negativo para las matrices 200, y puede incluir adicionalmente el negativo para el colector 300 de entrada y colector 400 de salida. La porción de definición de matriz se forma preferiblemente utilizando técnicas de microfabricación, pero alternativamente se puede formar a través de corte por láser, CNC, o cualquier otro método adecuado. La porción de definición inferior incluye preferiblemente canales a través de los cuales se pueden extender los pasadores centrales. Los pasadores centrales tienen preferiblemente extremos cónicos que se insertan en los canales de la porción de definición inferior, y funcionan para definir la entrada 320 y la salida 420. El material del sustrato se inyecta preferiblemente desde un borde del sistema 100 de captura de células o paralelo a la cara ancha del futuro sustrato 110. Sin embargo, el material del sustrato se puede inyectar a través de la porción de definición

inferior, normal a la cara ancha del que va a ser el sustrato 110, o a través de cualquier otra porción adecuada del maestro.

5 En otra variación, como se muestra en la Figura 13, el sistema 100 de captura de células se fabrica utilizando un proceso de microfabricación, y utiliza una serie de etapas de fotolitografía para crear los componentes del sistema 100 de captura de células en el sustrato 110. Sin embargo, el sistema 100 de captura de células se puede formar utilizando cualquier otro método adecuado.

Ejemplos del sistema de captura de células

10 En un primer ejemplo, como se muestra en la Figura 4, el sistema 100 de captura de células incluye una pluralidad de matrices 200 sustancialmente idénticas dispuestas en paralelo; una pluralidad de colectores 300 de entrada, cada uno independientemente conectado de forma fluida a un canal 240 de entrada; una pluralidad de entradas 320, cada una independientemente conectada de forma fluida a un colector 300 de entrada; una pluralidad de colectores 400 de salida, cada uno independientemente conectado de manera fluida a un canal 260 de salida; y una pluralidad de salidas 420, cada una conectada independientemente de forma fluida a un colector 400 de salida. Cada matriz 200 incluye preferiblemente una pluralidad de poros 220 sustancialmente idénticos conectados a un canal 240 de entrada en la cámara 222 y un canal 260 de salida en el canal 224 de poros. Las matrices 200, los colectores 300 de entrada y los colectores 400 de salida son preferiblemente cavidades definidas en una cara ancha de un sustrato 112, y preferiblemente están definidas cooperativamente por una capa 120 superior que sella de manera fluida las matrices 200, los colectores 300 de entrada y los colectores 400 de salida del sistema 100 de captura de células exterior. Las entradas 320 y las salidas 420 son preferiblemente agujeros definidos a través del grosor del sustrato 110, y preferiblemente se originan a partir de la cara ancha del sustrato opuesta a la cara que define las matrices 200, los colectores 300 de entrada y los colectores 400 de salida. Alternativamente, las entradas 320 y las salidas 420 pueden ser agujeros que se extienden a través del sustrato 110 desde los lados del sustrato.

25 En un segundo ejemplo, como se muestra en la Figura 5, el sistema 100 de captura de células incluye una pluralidad de matrices 200 sustancialmente idénticas dispuestas en paralelo; un colector 300 de entrada que incluye dos o más niveles; una entrada 320 conectada de forma fluida al colector 300 de entrada; una pluralidad de colectores 400 de salida, cada uno independientemente conectado de manera fluida a un canal 260 de salida; y una pluralidad de salidas 420, cada una conectada independientemente de forma fluida a un colector 400 de salida. Cada matriz 200 incluye preferiblemente una pluralidad de poros 220 sustancialmente idénticos conectados a un canal 240 de entrada en la cámara 222 y un canal 260 de salida en el canal 224 de poros. Los subcolectores 302 de entrada conectados directamente a los canales 240 de entrada preferiblemente se conectan cada uno independientemente a diez o menos canales 240 de entrada. Por ejemplo, cuando el sistema 100 de captura de células incluye cuarenta matrices 200, el sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente diez subcolectores 302 de entrada de segundo nivel, cada uno conectado a cuatro canales 240 de entrada. Las matrices 200, los colectores 300 de entrada y los colectores 400 de salida son preferiblemente cavidades definidas en una cara ancha de un sustrato 112, y preferiblemente se definen cooperativamente por una capa 120 superior que de forma fluida sella las matrices 200, los colectores 300 de entrada y los colectores 400 de salida del exterior del sistema 100 de captura de células. La entrada 320 y las salidas 420 son preferiblemente agujeros definidos a través del grosor del sustrato 110, y preferiblemente se originan a partir de la cara ancha del sustrato opuesta a la cara que define las matrices 200, los colectores 300 de entrada y los colectores 400 de salida. Alternativamente, la entrada 320 y las salidas 420 pueden ser agujeros que se extienden a través del sustrato 110 desde los lados del sustrato. Alternativamente, la entrada 320 puede ser un agujero definido a través del grosor del sustrato 110, mientras que las salidas 420 son agujeros que se extienden paralelos a la cara ancha del sustrato a través del sustrato 110.

45 En un tercer ejemplo, como se muestra en las Figuras 7 y 8, el sistema 100 de captura de células incluye una pluralidad de matrices 200 sustancialmente idénticas dispuestas en paralelo; un colector 300 de entrada que incluye dos o más niveles; una entrada 320 conectada de forma fluida al colector 300 de entrada; un colector 400 de salida que incluye dos o más niveles; y una salida 420 conectada de forma fluida al colector 400 de salida. Cada matriz 200 incluye preferiblemente una pluralidad de poros 220 sustancialmente idénticos conectados a un canal 240 de entrada en la cámara 222 y un canal 260 de salida en el canal 224 de poros. El colector 400 de salida preferiblemente tiene el mismo número de niveles que el colector 300 de entrada, y preferiblemente refleja el colector 300 de entrada. Por ejemplo, un subcolector 402 de salida directamente conectado a las matrices 200 se conecta preferiblemente a las mismas matrices 200 que un subcolector 302 de entrada correspondiente está directamente conectado a. Sin embargo, el colector 400 de salida puede incluir un número diferente de niveles, agrupar las matrices 200 de manera diferente o tener cualquier otra configuración adecuada. Los subcolectores 320 de entrada y 402 de salida se conectan directamente a los canales 320 de entrada y 260 de salida preferiblemente cada uno se conecta independientemente a diez o menos canales 320 de entrada y 260 de salida, respectivamente. Por ejemplo, cuando el sistema 100 de captura de células incluye cuarenta matrices 200, el sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente diez subcolectores 320 de entrada y 402 de salida de segundo nivel, cada uno conectado a cuatro canales 320 de entrada y 260 de salida, respectivamente. Las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida son preferiblemente cavidades definidas en una cara ancha de un sustrato 112, y preferiblemente están definidas cooperativamente por una capa 120 superior que sella de manera fluida las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida del sistema 100 de captura de células exterior. La entrada 320 y la salida 420 son preferiblemente agujeros definidos a través del grosor del sustrato 110, y preferiblemente se originan a partir de la

5 cara ancha del sustrato opuesta a la cara que define las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida. Alternativamente, la entrada 320 y la salida 420 pueden ser agujeros que se extienden a través del sustrato 110 desde los lados del sustrato. Alternativamente, la entrada 320 puede ser un orificio definido a través del grosor del sustrato 110, mientras que la salida 420 es un orificio que se extiende paralelo a la cara ancha 112 del sustrato, a través del sustrato 110.

10 En un cuarto ejemplo, como se muestra en la Figura 8, el sistema 100 de captura de células incluye una pluralidad de matrices 200 diferentes dispuestas en paralelo pero conectadas de forma fluida en serie; un colector 300 de entrada conectado al canal 240 de entrada en dirección ascendente; una entrada 320 conectada de forma fluida al colector 300 de entrada; un colector 400 de salida conectado al canal 260 de salida en dirección descendente; y una salida 420 conectada de forma fluida al colector 400 de salida. La anchura del canal de poros de las matrices 200 preferiblemente disminuye con cada matriz 200 subsiguiente lejos de la entrada 320. Adicionalmente, el tamaño de la cámara de las matrices 200 puede disminuir con cada matriz 200 subsiguiente alejada desde la entrada 320. El tamaño del canal de entrada y salida de las matrices 200 también puede disminuir con cada matriz 200 subsiguiente alejada de la entrada 320. Cada matriz 200 incluye preferiblemente una pluralidad de poros 220 sustancialmente idénticos conectados a un canal 240 de entrada en la cámara 222 y un canal 260 de salida en el canal 224 de poros. El canal 260 de salida de una matriz 200 en dirección ascendente se conecta preferiblemente de forma fluida al canal 240 de entrada de la matriz 200 adyacente en dirección descendente. En un ejemplo específico, el sistema 100 de captura de células incluye una primera, segunda, tercera y cuarta matriz 200 conectadas de forma fluida en serie. La primera matriz 200 tiene un tamaño de canal de poro de 30 micrómetros, la segunda matriz 200 tiene un tamaño de canal de poro de 25 micrómetros, la tercera matriz 200 tiene un tamaño de canal de poro de 15 micrómetros y la cuarta matriz 200 tiene un tamaño de canal de poro de 10 micrómetros. Las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida son preferiblemente cavidades definidas en una cara ancha de un sustrato 112, y preferiblemente están definidas cooperativamente por una capa 120 superior que sella de manera fluida las matrices 200, el colector 300 de entrada y el colector 400 de salida del sistema 100 de captura de células exterior. La entrada 320 y la salida 420 pueden ser agujeros definidos a través del sustrato 110 en el mismo lado del sustrato 110, en la misma cara ancha del sustrato 112, en caras anchas opuestas del sustrato 110, en caras adyacentes del sustrato 110, o dispuestos en cualquier configuración adecuada.

30 En un quinto ejemplo, como se muestra en la Figura 9, el sistema 100 de captura de células incluye un primer y un segundo conjunto 202 de matrices, cada conjunto 202 de matrices incluye una pluralidad de matrices 200 sustancialmente idénticas dispuestas en paralelo, en el que cada matriz 200 preferiblemente incluye una pluralidad de poros 220 sustancialmente idénticos. El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente un colector 300 de entrada conectado de manera fluida a los canales 240 de entrada de ambos conjuntos 202s de matrices, pero alternativamente puede incluir dos colectores 300 de entrada, cada uno conectado independientemente a un conjunto 202 de matrices, o cualquier otro número adecuado de colectores 300 de entrada. En una variación, el colector 300 de entrada se puede disponer entre el conjunto 202s de matrices, de tal manera que el segundo conjunto 202 de matrices es un enantiómero del primer conjunto 202 de matrices. Sin embargo, el colector 300 de entrada se puede disponer en cualquier posición adecuada. El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente una entrada 320, pero alternativamente puede incluir más. En una variación, la entrada 320 se dispone equidistante entre el conjunto 202s de matrices. El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente dos colectores 400 de salida, uno para cada conjunto 202 de matrices, pero alternativamente puede incluir una pluralidad de colectores 400 de salida, un colector para cada canal 260 de salida, o cualquier otro número adecuado de colectores 400 de salida. En una variación, el colector 400(s) de salida se puede disponer próximo a los bordes del sustrato 110, de tal manera que el colector 400(s) de salida para el primer conjunto 202 de matrices esté dispuesto en el lado del primer conjunto 202 de matrices distal al segundo conjunto 202 de matrices, y el colector 400(s) de salida se dispone en el lado del segundo conjunto 202 de matrices distal al primer conjunto 202 de matrices. El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente al menos dos salidas 420, pero alternativamente puede incluir más.

50 En un sexto ejemplo, como se muestra en la Figura 9, el sistema 100 de captura de células es sustancialmente similar al sistema 100 de captura de células del quinto ejemplo, y puede incluir adicionalmente un tercer conjunto 202 de matrices que incluye una pluralidad de poros 220 paralelos sustancialmente idénticos y un canal 502 de recuperación que conecta de manera fluida el colector 300 de entrada del primer y segundo conjunto 202 de matrices con el colector 300 de entrada del tercer conjunto 202 de matrices. En este ejemplo, el tercer conjunto 202 de matrices puede funcionar como un reactor de célula única, en el que cada matriz 200 dentro del tercer conjunto de conjunto 202 puede incluir adicionalmente una entrada 520 de aislamiento y una salida 540 de aislamiento para cada matriz 200 dentro del conjunto, la entrada 520 de aislamiento y la salida 540 dispuestas entre el primer y el segundo extremo del canal 240 de entrada y canal 260 de salida, respectivamente. En operación, el canal 502 de recuperación se sella preferiblemente de manera proximal al colector 300 de entrada, y las células de interés se aíslan dentro del primer y segundo conjunto 202s de matrices haciendo pasar una muestra a través de la entrada 320, a través del colector 300 de entrada, y dentro del primer y segundo conjunto 202s de matrices. Después del aislamiento de la célula, el canal 502 de recuperación se puede abrir, sellar la entrada 320 y hacer que las células aisladas retrocedan a través del colector 300 de entrada, a través del canal 502 de recuperación y dentro de la tercera matriz 200 haciendo pasar un tampón a través del colector 400(s) de salida del primer y segundo conjunto 202s de matrices. Como se muestra en la Figura 10, las células se pueden aislar de las células adyacentes al introducir simultáneamente un material de aislamiento, como hidrogel, en la entrada 520 de aislamiento y un tampón en los primeros extremos del canal 240 de

5 entrada y el canal 260 de salida. El aislamiento Entonces, el material reacciona preferiblemente para cambiar el material de aislamiento de un estado de flujo a un estado establecido. En una variación, solo se hacen reaccionar porciones del material de aislamiento que sella los poros 220 que contienen las células de interés. Por ejemplo, las células aisladas se pueden teñir, los poros 220 que contienen las células de interés identificadas (por ejemplo, en las que las células de interés emiten una longitud de onda deseada), y se crea una fotomáscara 504, en la que la fotomáscara 504 permite solo a las porciones del material de aislamiento sellar los poros de interés para ser fotorreaccionados (por ejemplo, mediante irradiación UV). El material de aislamiento no reaccionado y las células 20 no deseadas pueden salir por reflujó del tampón a través del colector 400 de salida. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro método adecuado de reacción selectiva del material de aislamiento. Los reactivos (por ejemplo, anticuerpos fluorogénicos, etc.), analitos o cualquier otra sustancia adecuada se pueden introducir en la tercera matriz 200 a través de la entrada de la tercera matriz 320 antes del aislamiento celular. Alternativamente, se pueden introducir reactivos después del aislamiento celular. En una primera variación, los reactivos se pueden introducir a través del colector de entrada de la tercera matriz, en la que el reactivo penetra a través del material de aislamiento establecido para ingresar al poro 220. En una segunda variación, los reactivos, analitos u otras sustancias se pueden introducir en poros 220 individuales al introducir la sustancia a través de la porción de la capa 120 superior contigua al poro de interés.

Eliminación Celular

20 El sistema 100 de captura de células se configura para facilitar la eliminación selectiva de células de ubicaciones direccionables conocidas. Mientras que una célula individual de un único poro 220 se elimina preferiblemente de forma selectiva, el sistema puede facilitar la eliminación simultánea de múltiples células de una única matriz 200 o un subconjunto de matrices 200. La célula se elimina preferiblemente al aplicar una fuerza de eliminación a la célula. La fuerza de eliminación se aplica preferiblemente al bombear fluido a través del canal 224 de poros dentro de la cámara 222, pero alternativamente se puede aplicar al aspirar el contenido fuera de la cámara 222. En una variación, la presión de la bomba proporcionada por un mecanismo de bomba en la salida 420 del sistema 100 de captura de células tiene menos de 10.000 Pa. En una variación específica, la presión de la bomba proporcionada es de 6.000 Pa. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otra bomba adecuada o presión de aspiración.

30 En una primera variación del método de eliminación de células, se pueden eliminar una o más células del sistema 100 de captura de células al introducir un fluido de purga a través de un colector 400 de salida y recogiendo células expulsadas en la entrada 320 (haciendo retroceder las células). Esto puede ser particularmente deseable cuando se desea la recolección de células de múltiples sitios unidos de manera fluida. El sistema 100s de captura de células que incluye múltiples colectores 400 de salida (por ejemplo, sistemas con un colector 400 de salida por matriz 200) puede ser particularmente adecuado para este método de eliminación de células, ya que las células dentro de una matriz dada 200 se pueden eliminar sin afectar las células capturadas adyacentes dentro de otras matrices 200 al ingresar únicamente fluido a través del colector 400 de salida directamente conectado a la matriz seleccionada 200. Alternativamente, el sistema 100 de captura de células con múltiples niveles de subcolectores puede ser adecuado para este método de eliminación de células, en el que las células retenidas dentro de un subconjunto de matrices 200 que se conectan de forma fluida por subcolector se pueden eliminar simultáneamente. Sin embargo, cualquier configuración adecuada del sistema 100 de captura de células se puede utilizar con este método de eliminación de células.

40 En una variación del método de eliminación de células y de acuerdo con la invención reivindicada, la eliminación de células se logra al utilizar una herramienta 600 de eliminación de células. La herramienta 600 de eliminación de células del sistema 100 de captura de células funciona para eliminar selectivamente una o más células aisladas desde una ubicación direccionable dentro del sistema 100 de captura de células. La herramienta 600 de eliminación de células se configura preferiblemente para eliminar una célula de una única cámara 222, pero alternativamente puede configurarse para eliminar simultáneamente múltiples células de múltiples cámaras 222.

50 En una primera realización de la herramienta de eliminación de células, la herramienta 600 de eliminación de células se configura para perforar la capa 120 superior desde una dirección normal a la cara ancha del sustrato 112. La herramienta 600 de eliminación de células elimina preferiblemente la célula en una dirección sustancialmente normal desde la cara ancha del sustrato 112, pero alternativamente puede eliminar la célula en una dirección en ángulo con respecto a la cara ancha del sustrato 112. La herramienta de eliminación de célula 600 incluye preferiblemente una aguja hueca que perfora la capa 120 superior y define un volumen sustancialmente fluido aislado en comunicación fluida con uno o más poros 220 (por ejemplo, el número deseado de poros 220). Como se muestra en las Figuras 14A y 14B, la aguja hueca incluye preferiblemente uno o más elementos de sellado en la punta 620, tal como un recubrimiento polimérico o una geometría adecuada, que facilitan la formación de sellado de fluido con la capa 120 superior. La aguja hueca preferiblemente incluye una cánula que termina en una punta 620 hueca. La cánula define preferiblemente un lumen, y preferiblemente se conecta de manera fluida a un volumen de recolección de células. En una realización, la punta 620 incluye geometría que facilita la formación de sellado de fluido con la capa 120 superior. La punta 620 incluye preferiblemente una primera y segunda pared opuesta, cada una con perfiles cóncavos que se estrechan en un extremo perforante distal de la cánula. La primera pared es preferiblemente un enantiómero de la segunda pared, pero alternativamente puede ser sustancialmente idéntica o diferente. Los lados primero y segundo de cada pared (622 y 624, respectivamente) exhiben preferiblemente curvaturas diferentes, de tal manera que el centro del extremo de perforación está preferiblemente desplazado del eje longitudinal del lumen. Sin embargo, las paredes

primera y segunda pueden ser alternativamente sustancialmente similares (por ejemplo, tener la misma curvatura). Las paredes opuestas primera y segunda funcionan preferiblemente para perforar la capa 120 superior y para formar un primer y segundo sello de fluido con el sustrato 110 para definir el volumen aislado de forma fluida. Sin embargo, la aguja hueca puede incluir cualquier otra geometría adecuada. En una realización, las agujas huecas tienen una altura de 200 micrómetros y un diámetro de lumen de 40 micrómetros.

La aguja hueca se configura preferiblemente para formar un volumen aislado de forma sustancialmente fluida dentro de una cámara 222 de poros de interés o un segmento del canal 240 de entrada adyacente a una cámara 222 de poros de interés. Preferiblemente, se utiliza un generador de baja presión (por ejemplo, una bomba) para aspirar la célula retenida fuera de la cámara 222 de poros, a través de la aguja hueca, y dentro del volumen de recolección de células.

La aguja hueca se fabrica preferiblemente utilizando técnicas de microfabricación, pero alternativamente se puede moldear por inyección, cortar con láser, estampar o fabricar utilizando cualquier otra técnica de fabricación adecuada. En una realización de la fabricación de agujas huecas, como se muestra en la Figura 15, un lumen se graba preferiblemente en un sustrato 110, tal como silicio, utilizando técnicas de grabado tales como grabado con iones reactivos profundos (DRIE), grabado con plasma o cualquier otro método de grabado adecuado. Esta etapa se utiliza preferiblemente con una máscara que cubre las porciones del sustrato 110 que se van a proteger. Las paredes y los perfiles asociados se fabrican preferiblemente mediante grabado isotrópico del sustrato 110 utilizando un líquido o plasma corrosivo, pero se puede utilizar cualquier otro método de eliminación de material isotrópico adecuado. Una máscara se utiliza preferiblemente para proteger el extremo de punción. Las agujas huecas múltiples se fabrican preferiblemente simultáneamente como una matriz 200, pero alternativamente se pueden fabricar individualmente.

En una segunda realización de la herramienta de eliminación de células, la herramienta 600 de eliminación de células también se configura para perforar la capa 120 superior desde una dirección normal a la cara ancha del sustrato 112. La herramienta 600 de eliminación de células elimina preferiblemente la célula en una dirección sustancialmente normal desde la cara ancha del sustrato 112, pero alternativamente puede eliminar la célula en una dirección en ángulo con respecto a la cara ancha del sustrato 112. Como se muestra en la Figura 16, la herramienta de eliminación de célula 600 incluye preferiblemente un par de agujas huecas incluyendo una primera aguja 640 y una segunda aguja 660, en las que ambas agujas son preferiblemente sustancialmente similares a las descritas en la primera realización de la herramienta 600 de eliminación de células. Las paredes primera y segunda de la primera aguja 640 se configuran preferiblemente para formar un primer y segundo sello impermeable a los fluidos con el canal 240 de entrada y/o la cámara 222 de poros. Las paredes primera y segunda de la segunda aguja 660 se configuran preferiblemente para formar un primer y segundo sellado impermeable al fluido con el canal 260 de salida y/o el canal 224 de poros. Las agujas primera y segunda están preferiblemente alineadas en paralelo, con las puntas de perforación de las agujas primera y segunda adyacentes y orientadas en la misma dirección dentro de la herramienta 600 de eliminación de células (por ejemplo, en la que ambas puntas están ubicadas en el mismo lado de la herramienta 600 de eliminación de células). La primera y segunda agujas se fabrican preferiblemente utilizando el proceso de fabricación mencionado anteriormente, pero alternativamente se pueden fabricar utilizando diferentes procesos. Las agujas primera y segunda se fabrican preferiblemente simultáneamente en el mismo sustrato 110, pero alternativamente se pueden fabricar por separado y unirse después de la fabricación. La distancia entre la primera y la segunda aguja 660 es preferiblemente sustancialmente equivalente a la longitud del poro 220 (por ejemplo, la suma las longitudes de la cámara 222 y del canal 224 de poros). Sin embargo, la distancia entre la primera y la segunda aguja 660 puede ser la longitud de la cámara, la longitud del canal 224 de poros o cualquier distancia adecuada. La primera y segunda agujas 660 preferiblemente forman cooperativamente un volumen aislado de forma fluida, el volumen aislado de forma fluida incluye uno o más poros de interés, segmento del canal 240 de entrada adyacente a los poros de interés y segmento del canal 260 de salida adyacente a los poros de interés, de tal manera que los poros de interés se aíslan de forma fluida de los poros 220 adyacentes. En operación, el fluido se introduce preferiblemente a través de la segunda aguja 660 en el segmento aislado de forma fluida del canal 260 de salida, a través del canal 224 de poros, a través de la cámara 222, y dentro de la primera aguja 640. A medida que el fluido se mueve a través de la cámara 222, el fluido preferiblemente arrastra la célula retenida y mueve la célula hacia la primera aguja 640. La segunda aguja 660 se puede acoplar de forma fluida a una bomba y una fuente de fluido. Alternativa/adicionalmente, la primera aguja 640 se puede acoplar de manera fluida a un generador de baja presión (por ejemplo, una bomba). El fluido es preferiblemente un tampón, pero alternativamente puede ser un medio de cultivo celular o cualquier otro fluido adecuado que retenga la viabilidad celular.

En una tercera realización de la herramienta de eliminación de células, la herramienta 600 de eliminación de células se configura para eliminar una o más células del sistema 100 de captura de células en una dirección sustancialmente paralela a la cara ancha del sustrato 112. Como se muestra en la Figura 17, la herramienta 600 de eliminación de células incluye preferiblemente una cánula 680 que define un lumen y una abertura 684. La cánula 680 preferiblemente termina en una punta 682 de punción sellada en un primer extremo, y preferiblemente se conecta de forma fluida a un volumen de recolección de células en un segundo extremo. La abertura 684 es preferiblemente un orificio que se extiende a través de la pared de la cánula 680, en la que el orificio tiene preferiblemente una anchura sustancialmente equivalente o mayor que la anchura de una cámara 222 de poros, pero lo suficientemente pequeña como para que la abertura 684 no abarque dos cámaras 222 de poros. La cánula 680 incluye preferiblemente una abertura 684, pero alternativamente puede incluir múltiples aberturas 684, en las que las múltiples aberturas 684 se pueden alinear en una línea paralela al eje longitudinal de la cánula 680, o pueden distribuirse alrededor de la superficie de la cánula 680

(por ejemplo, espiral alrededor del eje longitudinal de la cánula 680). La abertura 684 se extiende preferiblemente a través de una pared longitudinal de la cánula 680, pero alternativamente se puede extender a través de una porción de la punta 682 de punción. En un ejemplo, la abertura 684 se extiende a través de una porción de la pared de la cánula longitudinal proximal a la punta 682 de punción. En otro ejemplo, la abertura 684 se extiende a través de una porción de la pared de la cánula longitudinal a una distancia predeterminada de la punta 682 de punción, en la que la distancia se puede configurar de tal manera que la pared de la cánula bloquee uno o más de los poros 220 adyacentes. En otro ejemplo, la abertura 684 se puede extender a través de la punta 682 de punción de manera que el eje longitudinal de la abertura 684 se extienda en paralelo o coaxialmente sobre el eje longitudinal de la cánula 680. La transición entre la abertura 684 y la cánula 680 exterior y/o interior es preferiblemente convexa y curvada para prevenir el daño celular, pero alternativamente puede ser cóncavo, en ángulo, estar en ángulo recto o tener cualquier configuración adecuada. La cánula 680 tiene preferiblemente una sección transversal circular, pero alternativamente puede tener una sección transversal rectangular o cuadrada, una sección transversal ovular o cualquier otra sección transversal adecuada. La cánula 680 es preferiblemente rígida, pero alternativamente puede ser flexible o incluir porciones flexibles. En una alternativa, la cánula 680 es flexible e incluye un dispositivo 686 de punción rígido, en el que el dispositivo 686 de punción rígido se acopla deslizadamente sobre la cánula 680. El dispositivo 686 de punción rígido forma y retiene una entrada en el canal 240 de entrada, y la cánula 680 se puede avanzar a través de este. Sin embargo, la cánula 680 puede tener cualquier otra configuración adecuada. La cánula 680 puede incluir adicionalmente un perforador acoplado de forma deslizante dentro del lumen, en el que el perforador se puede extender a través de la abertura 684 para perforar cualquier capa intermedia entre la cánula 680 y el poro 220 (por ejemplo, una capa de aislamiento). La posición posterior a la perforación del perforador se puede retener para facilitar la eliminación celular a través de la misma, o el perforador se puede retraer antes de la eliminación celular.

En una realización de la operación de la herramienta de recuperación de células, la cánula atraviesa preferiblemente el canal 240 de entrada de una matriz 200 que tiene una célula 10 de interés hasta que la abertura se alinea con el poro 220 que contiene la célula 10 de interés. El fluido puede entonces entrar a través del colector 400 de salida asociado, en el que la presión del fluido ingresado empuja la célula 10 de interés fuera de la cámara 222 de poros, a través de la abertura, y dentro de la cánula. La entrada de fluido posterior a través del canal 240 de entrada puede recapturar cualquier célula que haya sido expulsada de sus respectivos poros 220. La cánula puede incluir adicional o alternativamente un mecanismo de generación de baja presión acoplado de manera fluida al lumen luz que aspira la célula del poro 220. Alternativa o adicionalmente, la cánula puede facilitar el ingreso de células a través de la acción capilar. La célula preferiblemente viaja a través del lumen y se almacena dentro del volumen de recolección de células.

En esta realización de la operación de la herramienta de recuperación de células, la cánula se inserta preferiblemente en el canal 240 de entrada a través del lado del sustrato 110, como se muestra en la Figura 17B, en el que el canal 240 de entrada se define preferiblemente parcialmente por una pared autosellante. La cánula se extiende preferiblemente a través de esta pared autosellante. Alternativamente, la cánula se puede insertar en el canal 240 de entrada a través de la capa 120 superior, en la que la cánula puede ser flexible para acomodar el ángulo de entrada, o la capa 120 superior puede ser elástica para acomodar el ángulo de entrada. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro método adecuado para introducir la cánula en el canal 240 de entrada.

En otra realización de la operación de la herramienta de recuperación de células, la cánula incluye una abertura a través de la punta de punción. La cánula se hace avanzar a través del canal 240 de entrada, bloqueando sucesivamente cada cámara de poros sucesiva 222 hasta que solo el subconjunto deseado de poros 220 quede sin cubrir. Entonces se puede proporcionar fluido a través del canal 260 de salida directamente conectado de forma fluida con los poros 220 no cubiertos para liberar simultáneamente las células de los poros 220 no cubiertos, en los que el fluido preferiblemente arrastra las células y mueve las células dentro de la cánula. La cánula se puede conectar de manera adicional o alternativa a un generador de baja presión para aspirar las células al volumen de recolección de células.

La eliminación de células del sistema 100 de captura de células está preferiblemente automatizada, pero alternativamente puede ser semiautomatizada o manual. En una variación, la eliminación de células está automatizada, en la que una plataforma 30 integrada identifica y elimina las células de interés. La identificación celular puede incluir la fijación automática, la permeabilización, la tinción, la formación de imágenes y la identificación de las células a través del análisis de imágenes (por ejemplo, a través del procesamiento visual con un procesador, mediante el uso de un detector de luz, etc.). La eliminación de células puede incluir el avance de una herramienta 600 de eliminación de células al poro 220 que contiene la célula 10 de interés. La eliminación de células puede incluir adicionalmente la selección del método de eliminación de células y/o la selección de la herramienta de eliminación de células. En otra variación, la identificación celular puede ser semiautomatizada y se puede automatizar la recuperación celular. Por ejemplo, la tinción celular y la formación de imágenes se pueden hacer automáticamente, en la que la identificación y selección de las células de interés se puede hacer manualmente. En otra variación, todas las etapas se pueden realizar manualmente. Sin embargo, se puede utilizar cualquier combinación de pasos automáticos o manuales.

Aplicaciones de ejemplo

El sistema 100 de captura de células descrito anteriormente se puede utilizar para una variedad de ensayos y procedimientos biológicos. La ejecución de un ensayo o procedimiento preferiblemente incluye la captura de células

diana en ubicaciones direccionables dentro del sistema de captura de células y el suministro de reactivos al interior o la superficie de cada célula capturada mientras se mantienen el registro celular con su poro o ubicación respectiva.

En un primer ejemplo, el sistema 100 de captura de células se puede utilizar como una micromatriz 200, en la que las microesferas 140 se introducen en el sistema 100 de captura de células antes de la introducción de la muestra. Las microesferas 140 son preferiblemente ligeramente más grandes que los canales 224 de poros, pero alternativamente pueden ser más pequeños. Las microesferas 140 se pueden recubrir con analitos específicos (por ejemplo, moléculas de afinidad, etc.), en las que las microesferas 140 pueden crear columnas de afinidad dentro de los poros 220. Las microesferas 140 pueden etiquetarse adicionalmente para la formación de imágenes. En una variación, múltiples conjuntos de microesferas 140 se introducen secuencialmente en el sistema 100 de captura de células, en el que cada conjunto de microesferas 140 tiene un recubrimiento de molécula de afinidad diferente de los otros conjuntos. Cada conjunto de microesferas se etiqueta preferiblemente con la misma etiqueta de formación de imagen (por ejemplo, todas etiquetadas con Cal Red), pero alternativamente se puede etiquetar con diferentes etiquetas de formación de imagen. Cada conjunto de microesferas incluye preferiblemente un pequeño número de microesferas 140 (por ejemplo, menos que el número de poros 220 en el sistema), pero alternativamente puede tener más. El sistema 100 de captura de células preferiblemente forma una imagen después de que se introduce cada conjunto de microesferas para identificar los poros 220 ocupados por las microesferas 140 constituyentes del conjunto. Sin embargo, el sistema 100 de captura de células puede formar una imagen después de que se introducen todas las microesferas 140, particularmente cuando cada conjunto de microesferas está etiquetado con una etiqueta de imagen diferente. De esta manera, se pueden crear micromatrices 200 de cuentas altamente multiplexadas dentro del sistema 100 de captura de células. En otra variación, como se muestra en la Figura 18, las microesferas 140 pueden formar redes de poros pequeños dentro de los poros 220 que funcionan como dispositivos de filtro de poros más pequeños. Por ejemplo, las microesferas 140 de aproximadamente 10 micras se pueden utilizar para crear un filtro de bacterias, mientras que las microesferas 140 de aproximadamente 2 micras se pueden utilizar para crear un filtro de virus. En otro ejemplo, las microesferas recubiertas de molécula de afinidad se pueden introducir simultáneamente con la muestra, en la que las microesferas se unen con las células diana para formar complejos. Las microesferas se dimensionan preferiblemente de tal manera que los complejos quedan atrapados dentro de los poros mientras las microesferas no unidas fluyen a través del sistema. Las microesferas 140 pueden ser poliméricas, metálicas, paramagnéticas, magnéticas o tener propiedades biológicas. Por ejemplo, las microesferas 140 pueden estar hechas de materiales térmicamente conductores y pueden funcionar como unidades de intercambio rápido de calor.

En otro ejemplo, se pueden ejecutar uno o más ensayos dentro del sistema 100 de captura de células. Las células de interés se aíslan primero preferiblemente haciendo pasar la muestra a través del sistema 100 de captura de células. Las células capturadas se tiñen preferiblemente, en las que la tinción preferiblemente mantiene la viabilidad celular. El análisis celular, que incluye la morfología y el recuento celular, se realiza preferiblemente. Luego se pueden realizar uno o más ensayos en las células capturadas. Estos ensayos pueden incluir inmunocitoquímica, hibridación fluorescente in situ (FISH), reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y otros ensayos celulares y moleculares estándar conocidos por un experto en la técnica.

El aislamiento de las células de interés incluye, preferiblemente, bombear la muestra a través de la entrada 320 del sistema de captura de células y extraer el resto de la muestra a través de la salida 420 del sistema 100 de captura de células. El aislamiento de las células de interés puede incluir adicionalmente el enriquecimiento de la muestra antes de la entrada de la muestra dentro del sistema 100 de captura de células. Aislar las células de interés puede incluir adicionalmente ejecutar un tampón a través del sistema 100 de captura de células para enjuagar las células aisladas. Aislar las células de interés preferiblemente incluye dejar las células dentro de los poros 220, pero alternativamente puede incluir la eliminación de células del sistema 100 de captura de células. Las células eliminadas se pueden pasar a través de un segundo sistema 100 de captura de células para enriquecer secuencialmente la población de células aisladas, o se puede almacenar dentro de un volumen de recolección de células para análisis fuera del chip.

La tinción de anticuerpos se utiliza preferiblemente para identificar los poros 220 que contienen las células de interés. La tinción de anticuerpos puede distinguir adicionalmente las células de interés sobre las células 20 no deseadas de tamaño similar que también han sido capturadas. La tinción de anticuerpos incluye preferiblemente la introducción de una solución de anticuerpos conjugados, específicos de la célula 10 de interés, a través del sistema 100 de captura de células. Los anticuerpos conjugados son preferiblemente anticuerpos primarios, pero alternativamente pueden ser anticuerpos secundarios, en los que los anticuerpos primarios no conjugados se introducen preferiblemente en el sistema 100 de captura de células antes de la introducción del anticuerpo conjugado. Sin embargo, se puede utilizar cualquier método de tinción celular adecuado.

El análisis celular se utiliza preferiblemente para determinar la morfología de las células capturadas y para determinar el número y la ubicación de las células capturadas de interés. El análisis celular se realiza preferiblemente mediante una plataforma 30 integrada asociada, en la que la morfología y el recuento celular se realizan preferiblemente a través de formación de imágenes de chips globales y análisis de formación de imágenes. La formación de imágenes y el análisis se realizan preferiblemente de forma automática, pero también pueden ser semiautomatizados o manuales. Sin embargo, la determinación de la morfología y el recuento celular se pueden lograr mediante cualquier otro método adecuado.

La realización de ensayos en las células aisladas funciona para determinar las características de las células y/o determinar las respuestas celulares a estímulos dados. Los análisis se pueden ejecutar en las células individualmente (por ejemplo, análisis de nivel de célula única), en el que las células se pueden aislar individualmente de forma fluida dentro del sistema 100 de captura de células. Alternativamente, los análisis se pueden ejecutar en el sistema 100 de captura de células en su conjunto. Alternativamente, los subconjuntos de matrices 200 individuales se pueden aislar de manera fluida de otros subconjuntos de matrices 200, en los que se pueden realizar diferentes análisis en diferentes subconjuntos de la matriz 200. Los ensayos de ejemplo que se pueden ejecutar en las células incluyen ensayos FISH, lisis celular selectiva y recolección de lisado, análisis molecular de células individuales (por ejemplo, PCR, RT-PCR, amplificación del genoma completo, ELISPOT, ELISA, inmuno-PCR, etc.), pruebas de fármacos, cultivo celular, análisis de afinidad, análisis sensibles al tiempo, pero se pueden realizar otros análisis alternativamente/adicionalmente. Las células aisladas se pueden eliminar antes, durante o después de que se hayan realizado los ensayos, preferiblemente con la herramienta 600 de eliminación de células, pero alternativamente con cualquier método adecuado. Alternativamente, las células aisladas se pueden aislar dentro de la cámara 222 (por ejemplo, con una capa de aislamiento), fijar, cultivar dentro de la cámara 222 o retener dentro de la cámara 222 de cualquier otra manera adecuada.

En un ejemplo específico, ensayar células con el sistema 100 de captura de células incluye preprocesar una muestra que contiene células de cáncer marcadas, cebar el sistema 100 de captura de células, hacer fluir la muestra a través del sistema 100 de captura de células, fijar las células dentro de sus respectivos poros y manchando las células fijas. Después del procedimiento de ensayo, las células se pueden obtener imágenes y analizarse manual o automáticamente. La muestra es preferiblemente una muestra de sangre entera periférica, pero puede ser cualquier otra muestra adecuada que contenga células diana. El sistema 100 de captura de células incluye preferiblemente 12.800 poros, pero alternativamente puede incluir más o menos poros. El procesamiento previo de la muestra incluye preferiblemente diluir la muestra (por ejemplo, con formalina al 0,5 % en mezcla 1X PBS o cualquier otra solución adecuada que contenga un agente de fijación) e incubar la muestra, preferiblemente en un balancín (por ejemplo, durante 15-30 minutos). Cebar el sistema 100 de captura de células preferiblemente incluye introducir un tampón inicial (por ejemplo, BSA al 1 % + tritón X al 0.1 % en 1X PBS) y eliminar las burbujas de aire del sistema 100. Hacer fluir la muestra a través del sistema 100 de captura de células preferiblemente incluye hacer fluir la muestra a través del sistema 100 a una presión de menos de 10.000 Pa en menos de 10 minutos mientras se minimiza la introducción de burbujas de aire, pero también puede incluir el flujo de la muestra a través del sistema 100 a cualquier presión adecuada en cualquier período de tiempo adecuado. La fijación de las células incluye preferiblemente la fijación posterior de las células con un agente de fijación (por ejemplo, formalina al 2 % en tampón de lavado), que puede preparar las células para la posterior tinción de anticuerpos. La tinción de las células fijas puede incluir lavar las células fijas (por ejemplo, con BSA al 1 % + EDTA 25 mM en 1X PBS) e introducir un cóctel de anticuerpos que contiene anticuerpos específicos para las células de interés (por ejemplo, un cóctel de anticuerpos primarios que incluye anti-citoqueratina 8/18 o anti-EpCAM que reconoce las células de cáncer epitelial humano, CD45 que reconoce los leucocitos y/o la tinción nuclear Hoescht 33342) en el sistema 100 de captura de células. La tinción de las células fijas puede incluir además incubar las células (por ejemplo, durante 30-45 minutos a temperatura ambiente). La tinción de las células puede incluir adicionalmente lavar las células con un tampón de lavado (por ejemplo, BSA al 1 % + EDTA 25 mM en 1X PBS), introducir un cóctel de anticuerpos secundarios que contiene anticuerpos que se unen a los anticuerpos primarios (por ejemplo, un cóctel que incluye anti-CD45 conjugado con Alexa, anti-citoqueratina 8/18 y/o anti-EpCAM), e incubar las células (por ejemplo, a temperatura ambiente durante 45 minutos). El ensayo de las células puede incluir adicionalmente etapas de lavado entre cada etapa de ensayo. Las células se lavan preferiblemente con un tampón de lavado que incluye medios de cultivo, tampón, eliminadores de iones metálicos y/o surfactantes (por ejemplo, un tampón de lavado que incluye 1 % de BSA y 0,1 % de tritón X en PBS 1X, un tampón de lavado que incluye EDTA, etc.).

Preparación de la muestra

El sistema 100 de captura de células se utiliza preferiblemente con una muestra que contiene células. La muestra que contiene células es preferiblemente una muestra de sangre, pero alternativamente puede ser fluido corporal, células suspendidas en tampón o medio de cultivo, o cualquier otra muestra adecuada que contenga células.

Aunque la muestra que contiene células se puede introducir en el sistema 100 de captura de células sin ningún procesamiento previo, se puede preferir el procesamiento previo para aumentar la eficacia de la clasificación celular. El procesamiento previo de la muestra incluye preferiblemente el enriquecimiento de la muestra para aumentar la proporción de células 10 deseadas dentro de la muestra. El enriquecimiento de la muestra incluye preferiblemente eliminar sustancialmente los componentes no deseados de la muestra antes de que la muestra ingrese al sistema 100 de captura de células. El procesamiento previo de la muestra puede incluir adicionalmente la preparación de la muestra para el procesamiento en dirección descendente o el procesamiento de la muestra de cualquier otra manera adecuada para cualquier aplicación adecuada.

En una primera variación, preferiblemente se eliminan los componentes de muestra que pueden formar obstáculos, tales como coágulos, dentro del sistema 100 de captura de células. Por ejemplo, en una muestra de sangre, dichos componentes pueden incluir glóbulos rojos, plaquetas y otros componentes sanguíneos similares. Estos componentes se eliminan preferiblemente mediante centrifugación en gradiente de densidad, en el que el sedimento de eritrocitos y

granulocitos se desecha preferiblemente, y el resto de la muestra se retiene. Sin embargo, estos componentes se pueden eliminar mediante filtración, lisis selectiva o cualquier otro método adecuado de eliminación o inactivación.

En una segunda variación, las células 20 no deseadas de sustancialmente el mismo tamaño que las células 10 deseadas se eliminan selectivamente. Por ejemplo, si los CTC son las células 10 deseadas, entonces las células mono-nucleares (por ejemplo, PMBC) se eliminan preferiblemente. Las células indeseadas de tamaño similar se eliminan preferiblemente mediante selección negativa, pero alternativamente se pueden eliminar mediante otros métodos de eliminación adecuados, tales como la centrifugación. La selección negativa se logra preferiblemente a través de la separación inmunomagnética de células no deseadas, en las que se introducen partículas magnéticas recubiertas con anticuerpos en la muestra. Los anticuerpos que recubren las partículas magnéticas se dirigen preferiblemente hacia antígenos expresados por las células 20 no deseadas, pero no expresadas por las células 10 deseadas. Por ejemplo, si los leucocitos son las células 20 no deseadas, entonces se puede utilizar anti-CD45. Luego, la muestra se pasa a través de un campo magnético, en el que las partículas magnéticas eliminan selectivamente las células unidas indeseadas 20 de la muestra.

La selección negativa se puede conseguir de forma alternativa o adicional dentro del sistema 100 de captura de células, en el que el sistema 100 de captura de células incluye una primera etapa conectada de forma fluida a una segunda etapa en dirección descendente. Los canales de la primera etapa incluyen preferiblemente moléculas de afinidad (por ejemplo, anticuerpos) que se unen selectivamente a las células 20 no deseadas, mientras permiten que las células 10 deseadas fluyan a través de los mismos. Las moléculas de afinidad se pueden introducir como un recubrimiento, como microesferas 140 recubiertas de molécula de afinidad, micropilares recubiertos de molécula de afinidad, microcanales recubiertos de molécula de afinidad, o introducirse de cualquier otra manera adecuada. La primera etapa puede ser una porción del colector 300 de entrada o un subconjunto de matrices 200 en dirección ascendente, un sistema 100 de captura de células separado, o cualquier etapa en dirección ascendente adecuada. La primera etapa incluye preferiblemente un tamaño de canal de poro grande s, preferiblemente mayor que el diámetro de la célula 10 deseada (por ejemplo, 35-50 micrómetros). La segunda etapa selecciona preferiblemente la célula 10 deseada de acuerdo con el tamaño de la célula y/o la deformabilidad, y preferiblemente no incluye ningún anticuerpo o recubrimiento de unión celular.

En una variación de la preparación de la muestra, como se muestra en la Figura 19, la muestra se prepara al eliminar componentes de muestra pequeños a través de la separación por gradiente de densidad S100 y eliminando las células mononucleares a través de la separación inmunogénica S200. Las células de interés se aíslan luego utilizando el sistema de captura de células S300, y se realizan ensayos posteriores en las células aisladas S400.

Plataforma integrada

Como se muestra en la Figura 20, el sistema 100 de captura de células se utiliza preferiblemente con una plataforma 30 integrada que incluye una estación 40 de trabajo de muestra y una plataforma 50 de formación de imágenes. La plataforma 30 integrada está preferiblemente completamente automatizada, pero alternativamente puede ser semiautomática o operada manualmente. La plataforma 30 integrada puede realizar todas o algunas de las funciones de pipeteado, alícuota, mezcla, bombeo y monitoreo. La plataforma 30 integrada puede identificar adicionalmente automáticamente las cámaras ocupadas 222, crear imágenes de dichas cámaras 222 y/o realizar análisis en dichas cámaras 222. La plataforma 30 integrada puede eliminar adicionalmente selectivamente células del sistema 100 de captura de células. La plataforma 30 integrada puede adicionalmente o alternativamente realizar cualquier otra función adecuada. El sistema 100 de captura de células se utiliza preferiblemente con un sistema 100 de captura de células como se describe anteriormente, pero se puede utilizar alternativamente con cualquier aparato o método adecuado.

La estación 40 de trabajo de muestra incluye preferiblemente un sistema de bombeo que regula el caudal de muestra a través del sistema para controlar las fuerzas de corte en las células mientras proporciona suficiente presión positiva para empujar células y fragmentos no deseados a través de las cámaras 222 de poros de los poros 220. En una variación, el sistema de bombeo proporciona una presión de bombeo inferior a 10.000 Pa. Más preferiblemente, el sistema de bombeo proporciona una presión de bombeo de aproximadamente 6.000 Pa, pero alternativamente puede proporcionar cualquier presión de bombeo adecuada. El sistema de bombeo es preferiblemente capaz de manejar entradas de volumen variable, que varían preferiblemente de 100 microlitros a decenas de mililitros. Como se muestra en la Figura 21, el sistema de bombeo se acopla preferiblemente a la entrada 320 y a la salida 420 del sistema 100 de captura de células a través de un colector 42 de fluidos, en donde el colector 42 de fluidos preferiblemente introduce fluido en el sistema 100 de captura de células desde arriba, pero puede alternativamente introducir fluido en el sistema 100 de captura de células desde abajo, desde un lado o desde cualquier dirección adecuada. El colector 42 de fluidos incluye preferiblemente elementos 43 de formación de sellado de fluido alrededor de las porciones de contacto de entrada y salida, tales como juntas tóricas, empaquetaduras o cualquier otro elemento de sellado adecuado. La estación 40 de trabajo de muestra incluye preferiblemente un sistema de ventilación para ventilar burbujas de aire (por ejemplo, utilizando respiraderos hidrófobos). La estación 40 de trabajo de muestra puede funcionar adicionalmente para preparar la muestra para utilizar con el sistema 100 de captura de células. Por ejemplo, la estación 40 de trabajo de muestra puede mezclar reactivos, facilitar la eliminación de células no deseadas de la muestra o realizar cualquier otra función adecuada. La estación 40 de trabajo de muestra puede funcionar adicionalmente para recuperar células capturadas, y puede incluir el volumen de recolección de células y el generador de baja presión, si se utiliza.

La estación de trabajo preferiblemente permite el procesamiento simultáneo de múltiples muestras (por ejemplo, 12, 24, 96 muestras, etc.) de sangre o cualquier otro espécimen adecuado. Como se muestra en la Figura 22, la estación 40 de trabajo de muestra puede incluir adicionalmente ubicaciones de muestra predeterminadas, en las que los tubos de muestra, tales como los tubos de espécimen, se pueden cargar en una ubicación específica para una identificación positiva durante todo el proceso. Los tubos de espécimen pueden incluir identificadores únicos (por ejemplo, códigos de barras) que la estación de trabajo puede identificar automáticamente o leer manualmente. La estación 40 de trabajo de muestra puede aceptar adicionalmente reactivos utilizados para procesar la muestra y/o las células capturadas. Los reactivos se proporcionan preferiblemente como una tira reactiva unificada que contiene reactivos precargados o parcialmente cargados, pero alternativamente se pueden proporcionar como frascos separados o en cualquier otro factor de forma adecuado. Los reactivos pueden incluir tampones de lavado, líquidos de purga, reactivos de tinción celular, reactivos de fijación celular, medios de crecimiento celular, reactivos de lisis celular, reactivos necesarios para la hibridación in situ, reactivos necesarios para la amplificación específica de ácido nucleico (por ejemplo, reactivos de PCR), reactivos necesarios para bloquear la función de fracciones específicas, reactivos necesarios para limpiar el sistema 100 de captura de células, o cualquier otro reactivo adecuado. La configuración de los reactivos en la tira y/o el orden de suministro o disposición de reactivos depende preferiblemente de los procesos deseados. La estación de trabajo preferiblemente acepta reactivos para múltiples procesos, en la que múltiples procesos se pueden realizar simultáneamente en un solo chip. Los ejemplos de procesos que se pueden realizar incluyen inmunotinción, análisis proteómico de células individuales, análisis de ácido nucleico, secuenciación genómica o una comparación entre el ARN celular expresado y la expresión plasmática de fondo, prueba de la eficacia de los agentes farmacéuticos. La estación 40 de trabajo de muestra está controlada preferiblemente por un procesador independiente, pero alternativamente se puede controlar por cualquier mecanismo de control adecuado.

La plataforma 30 integrada puede incluir adicionalmente una plataforma 50 de formación de imágenes. La plataforma 50 de formación de imágenes puede funcionar para capturar imágenes de células. El sistema de formación de imágenes digitales también puede incluir software que puede permitir la cuantificación de imágenes específicas y la presentación de informes en la plataforma. La plataforma 50 de formación de imágenes incluye preferiblemente hardware de formación de imágenes y software de formación de imágenes. El software de formación de imágenes controla preferiblemente el hardware de formación de imágenes y puede procesar adicionalmente las imágenes. En una variación, el software de formación de imágenes analiza una primera imagen para determinar las direcciones de los poros 220 que retienen las células de interés, luego controla el hardware de formación de imágenes para obtener imágenes e interrogar individualmente cada poro 220 identificado. El software de formación de imágenes puede almacenar adicionalmente la ubicación de las células de interés para el procesamiento celular adicional, tal como la eliminación de células o el análisis de células individuales.

El hardware de formación de imágenes se configura preferiblemente para aceptar el sistema 100 de captura de células, y además puede aceptar equipos de formación de imágenes convencionales, tales como portaobjetos de microscopio, placas de cultivo celular o cualquier otro equipo de formación de imágenes adecuado. El hardware de formación de imágenes es preferiblemente capaz de autoenfocar el microscopio antes de la captura de imagen, pero también puede tomar una serie de imágenes a múltiples distancias focales, utilizar el procesamiento posterior de la imagen para enfocar la imagen o utilizar cualquier otro método adecuado para lograr una imagen enfocada.

El hardware de formación de imágenes incluye preferiblemente una etapa 52 automatizada que puede facilitar la autocalibración, la interrogación del sistema de captura de células, la agitación del sistema 100 de captura de células o mover el equipo de formación de imágenes de cualquier otra manera adecuada. La etapa 52 automatizada puede funcionar adicionalmente para alinear el sistema 100 de captura de células con el objetivo o campo de imagen. La etapa 52 automatizada puede mover adicionalmente el sistema 100 de captura de células en relación con la herramienta 600 de eliminación de células para alinear la abertura de la herramienta 600 de eliminación de células con un poro 220 deseado. La etapa 52 automatizada puede mover adicionalmente la célula a la estación 40 de trabajo de muestra. La etapa 52 automatizada es conducida preferiblemente por un motor, pero puede ser conducida por cualquier otro mecanismo adecuado.

La etapa 52 automatizada es preferiblemente capaz de moverse en al menos la dirección z, y se puede mover adicionalmente en la dirección x y/o dirección y. En una variación, como se muestra en la Figura 23, la etapa es adicionalmente capaz de inclinar el sistema 100 de captura de células, lo que puede habilitar el enfoque automático del módulo 56 de formación de imágenes. El sistema 100 de captura de células puede inclinarse en un ángulo específico, en el que algunas áreas de la imagen de la diapositiva estarán mejor enfocadas que otras en función de las diferentes distancias focales resultantes. Las diferencias de contraste creadas son luego interrogadas por un algoritmo de ordenador que determina la sección vertical con el mayor contraste, una medida indicativa de la longitud focal ideal (altura z óptima). La etapa 52 automatizada luego reemplaza el sistema 100 de captura de células a una posición plana paralela a la base, y mueve el sistema 100 de captura de células a la altura z óptima determinada.

La etapa incluye preferiblemente un mecanismo 54 de retención que retiene la posición del sistema 100 de captura de células con respecto al resto de la etapa. El mecanismo 54 de retención es preferiblemente además capaz de retener otros equipos de formación de imágenes, tales como portaobjetos de vidrio o placas de cultivo celular. El mecanismo 54 de retención puede ser como un clip que desvía el sistema 100 de captura de células contra un soporte, una cavidad en una cara ancha de la plataforma o cualquier otro mecanismo de retención adecuado 54. La plataforma preferiblemente acomoda un sistema 100 de captura de células a la vez, pero alternativamente puede acomodar

múltiples sistemas 100s de captura de célula simultáneamente. En una variación, la etapa incluye una bandeja de carrusel o transportador que incluye una pluralidad de sistemas de captura de células 100s, en los que la etapa gira sucesivamente el sistema 100s de captura de células debajo del módulo 56 de formación de imágenes.

5 La etapa puede incluir adicionalmente un sistema de control térmico acoplado térmicamente a la porción de la etapa configurada para contactar con el sistema 100 de captura de células. El sistema de control térmico se puede utilizar para controlar la temperatura del sistema 100 de captura de células al calentar y/o enfriar el sistema 100 de captura de células durante los ensayos o reacciones. Por ejemplo, el sistema de control térmico puede calentar el sistema 100 de captura de células para incubar las células retenidas allí, y enfriar el sistema 100 de captura de células para detener las reacciones bioquímicas dadas. En una variación, el sistema de control térmico incluye un solo bloque configurado para contactar con una cara ancha completa del sistema 100 de captura de células. En otra variación, el sistema de control térmico incluye múltiples secciones, cada sección configurada para calentar o enfriar una porción dada del Sistema 100 de captura de células de cara ancha. El sistema de control térmico incluye preferiblemente calentadores eléctricos, pero alternativamente puede incluir calentadores inductivos, calentadores de cerámica o cualquier otro calentador adecuado. El sistema de control térmico puede incluir un disipador de calor, bomba de calor, intercambiador de calor o cualquier otro mecanismo de enfriamiento activo o pasivo adecuado. El sistema de control térmico es preferiblemente ópticamente transparente, pero alternativamente puede tener cualquier otra propiedad óptica adecuada.

20 La etapa puede incluir adicionalmente un colector 42 de fluidos que interactúa con la entrada 320 y la salida 420 del sistema 100 de captura de células, de tal manera que se puede visualizar el flujo en tiempo real a través del sistema 100 de captura de células.

25 El hardware de formación de imágenes incluye adicionalmente un módulo 56 de formación de imágenes que incluye un generador de imágenes y un iluminador optimizado capaz de capturar imágenes de alta resolución en múltiples ubicaciones predefinidas de la diapositiva y/o imágenes globales de la diapositiva. El módulo 56 de formación de imágenes es preferiblemente capaz de trabajar con varios conjuntos de longitudes de onda de emisión y excitación, de tal manera que la plataforma 50 de formación de imágenes puede resolver múltiples marcadores (por ejemplo, marcadores fluorescentes, teñidos, etc.). El iluminador es preferiblemente capaz de proporcionar la iluminación y las longitudes de onda apropiadas para resolución de fluorescencia, microscopía de contraste de fase, microscopía de campo oscuro, microscopía de campo brillante y/o cualquier otra técnica de imagen adecuada. Por ejemplo, el hardware de formación de imágenes puede incluir uno o más emisores capaces de resolver tintes fluorescentes tales como FAM, Cal Red, Texas Red, Cy5, Cy5.5, o cualquier otro tinte fluorescente adecuado utilizado en el análisis celular. El módulo 56 de formación de imágenes incluye preferiblemente un generador de imágenes que se conecta ópticamente preferiblemente a un microscopio que amplía la porción del sistema 100 de captura de células del que se va a formar imagen. El generador de imágenes puede ser de 5 megapíxeles, 10 megapíxeles, 20 megapíxeles, 50 megapíxeles, 100 megapíxeles o cualquier tamaño de imagen adecuado. El generador de imágenes puede ser una cámara CCD, CMOS, escáner de línea o cualquier otro generador de imágenes adecuado.

35 El hardware de formación de imágenes puede incluir adicionalmente un lector de identificador que funciona para leer e identificar identificadores de equipos de formación de imágenes. El hardware de formación de imágenes puede incluir un lector de código de barras, un lector de etiquetas RFID, un lector de códigos QR, un dispositivo de comunicación de campo cercano o cualquier otro mecanismo adecuado que pueda identificar un identificador único ubicado en el equipo de formación de imágenes (por ejemplo, el sistema 100 de captura de células, una diapositiva de microscopio, etc.). Alternativa o adicionalmente, el módulo 56 de formación de imágenes se puede utilizar como el lector identificador. En una variación, una lente objetivo dada se coloca sobre el identificador único para obtener la relación de aspecto correcta para la imagen del módulo 56 de formación de imágenes. En otra variación, el identificador único se puede reconstruir a partir de múltiples imágenes. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro método adecuado para obtener e identificar el identificador único.

40 El hardware de formación de imágenes se controla preferiblemente mediante un procesador que ejecuta un software de formación de imágenes, en el que el procesador controla preferiblemente el movimiento del escenario, el enfoque del microscopio y la captura de imágenes, y puede controlar adicionalmente otras funciones. El control del hardware de formación de imágenes se basa preferiblemente en una imagen tomada por el hardware de la imagen, pero
50 alternativamente puede basarse en señales recibidas de sensores u otras partes de la plataforma 30 integrada.

Un experto en la técnica reconocerá a partir de la descripción detallada anterior y de las figuras y reivindicaciones, que se pueden realizar modificaciones y cambios a las realizaciones preferidas de la invención sin apartarse del alcance de esta invención definida en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema (100) de captura de células que comprende:
una matriz (200) definida sobre una cara ancha de un sustrato (110), que comprende:
una pluralidad de poros (220) paralelos, cada poro comprende:
- 5 una cámara (222) conectada de forma fluida a un canal (240) de entrada configurado para capturar y retener una célula (10) única, en la que cada una de una longitud de cámara, anchura de cámara y profundidad de cámara está entre 25 y 50 micras; y
- 10 un canal (224) de poro conectado de forma fluida a una porción de la cámara (222) distal al canal (240) de entrada, el canal (224) de poro tiene una anchura de canal de poro entre 7 y 10 micras y por lo cual se configura para bloquear la salida de la célula (10) única;
- el canal (240) de entrada conectado de forma fluida a cada cámara (222) de la pluralidad de poros (220) paralelos en un lado de entrada fluido;
- un canal (260) de salida conectado de forma fluida a los canales (224) de poro de la pluralidad de poros (220) paralelos en un lado de la salida de fluido;
- 15 un colector (300) de entrada, definido en la cara ancha del sustrato, conectado de forma fluida al canal (240) de entrada;
- un colector (400) de salida, definido sobre la cara ancha del sustrato, conectado de forma fluida al canal (260) de salida; y caracterizado porque el sistema (100) de captura de células comprende adicionalmente una herramienta (600) de eliminación de célula configurada para realizar el canal (240) de entrada y extraer los contenidos de un poro (220).
- 20
2. El sistema (100) de captura de células de la reivindicación 1, en el que los poros (220), canal (240) de entrada, y canal (260) de salida cada uno comprende hendiduras sobre una cara ancha singular del sustrato (110).
3. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que todos los poros en la pluralidad de poros (220) paralelos de la matriz (200) son idénticos.
- 25
4. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que el sistema comprende adicionalmente una segunda matriz idéntica a la matriz, un segundo canal de entrada idéntico al canal de entrada y acoplado de forma fluida a la segunda matriz, un segundo colector de entrada acoplado de forma fluida al segundo canal de entrada, un segundo canal de salida acoplado de forma fluida al segundo canal de entrada, un segundo canal de salida acoplado de forma fluida a la segunda matriz, y un segundo colector de salida acoplado de forma fluida a la segunda salida; en la que la
- 30
- matriz y la segunda matriz se aíslan de forma fluida una de la otra.
5. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que el sistema comprende un conjunto de matrices, cada matriz es idéntica; en el que el sistema comprende un colector (320) de entrada único que se conecta de forma fluida a los canales de entrada de cada matriz en el conjunto de matrices en paralelo.
- 35
6. El sistema de captura de células de la reivindicación 5, en el que el sistema comprende un conjunto de colectores de salida, en el que cada canal de salida del conjunto de matrices se acopla de forma fluida independientemente a un respectivo colector de salida del conjunto de colectores de salida.
7. El sistema de captura de células de la reivindicación 5, en el que el colector de salida se acopla de forma fluida a los canales de salida del conjunto de matrices en paralelo y en el que el colector de salida comprende una pluralidad de subcolectores (302) de salida conectados de forma fluida en paralelo, en el que cada subcolector de salida conecta de forma fluida un subconjunto de los canales de salida del conjunto de matrices en paralelo.
- 40
8. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que el sistema comprende un conjunto de matrices, cada matriz en el conjunto de matrices tiene una anchura de canal de poro diferente de las otras matrices en el conjunto de matrices; en el que el conjunto de matrices se acopla de forma fluida en serie, en el que el canal de entrada de la matriz con la mayor anchura de canal de poro se acopla de forma fluida al colector de entrada y el canal de salida de la matriz con la más pequeña anchura de canal de poro se acopla de forma fluida al colector de salida; en el que el canal de salida de una matriz en dirección ascendente se acopla de forma fluida al canal de entrada de una matriz en dirección descendente adyacente.
- 45
9. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que cada poro en la pluralidad de poros paralelos comprende un conjunto de cámaras acoplado de forma fluida que tiene cámaras de diferentes anchuras de cámara, en el que el conjunto de cámaras acoplado de forma fluida se dispone linealmente al aumentar la anchura, de tal manera que la cámara del conjunto de cámaras acoplado de forma fluida con la mayor anchura es proximal al canal
- 50

de entrada de la matriz, y la cámara del conjunto de cámaras acoplado de forma fluida con la más pequeña anchura es proximal al canal de salida para un respectivo poro.

5 10. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que el sustrato (110) comprende adicionalmente un reflector (130), adyacente a la matriz (200) o definido sobre la cara ancha del sustrato que se opone al sistema de captura de células, en el que el reflector se configura para reflejar la luz incidente en un ángulo de 90 grados en cada poro de la pluralidad de poros paralelos.

11. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que la herramienta (600) de eliminación de célula comprende una cánula (680) que define:

una punta (620) de perforación sellada en un primer extremo configurado para penetrar el canal (240) de entrada;

10 una apertura a través de una pared longitudinal de la cánula, en el que la apertura se configura para transferir una célula desde la cámara de poros en la cánula cuando se aplica presión desde el fluido del colector de salida al poro;

y un lumen configurado para ser conectado de forma fluida a un volumen de recolección de células en un segundo extremo de la cánula.

12. El sistema de captura de células de la reivindicación 1, en el que

15 un conjunto de las matrices (200) se disponen en paralelo sobre la cara ancha del sustrato,

en el que el colector (300) de entrada se acopla de forma fluida a cada canal de entrada del conjunto de matrices paralelas, en el que una entrada, definida a través del grosor del sustrato, se conecta de forma fluida al colector (300) de entrada,

20 en el que el colector (400) de salida se acopla de forma fluida a cada canal de salida del conjunto de matrices paralelas, y

en el que una salida (420), definida a través del grosor del sustrato, se conecta de forma fluida al colector (400) de salida.

25 13. El sistema de captura de células de la reivindicación 12, en el que los canales de entrada y los canales de salida del conjunto de matrices paralelas se extienden perpendicularmente a través del grosor del sustrato desde una segunda cara ancha de sustrato hasta la entrada y colectores de salida, respectivamente, y en el que la segunda cara ancha de sustrato es paralela a y se opone a la primera cara ancha de sustrato.

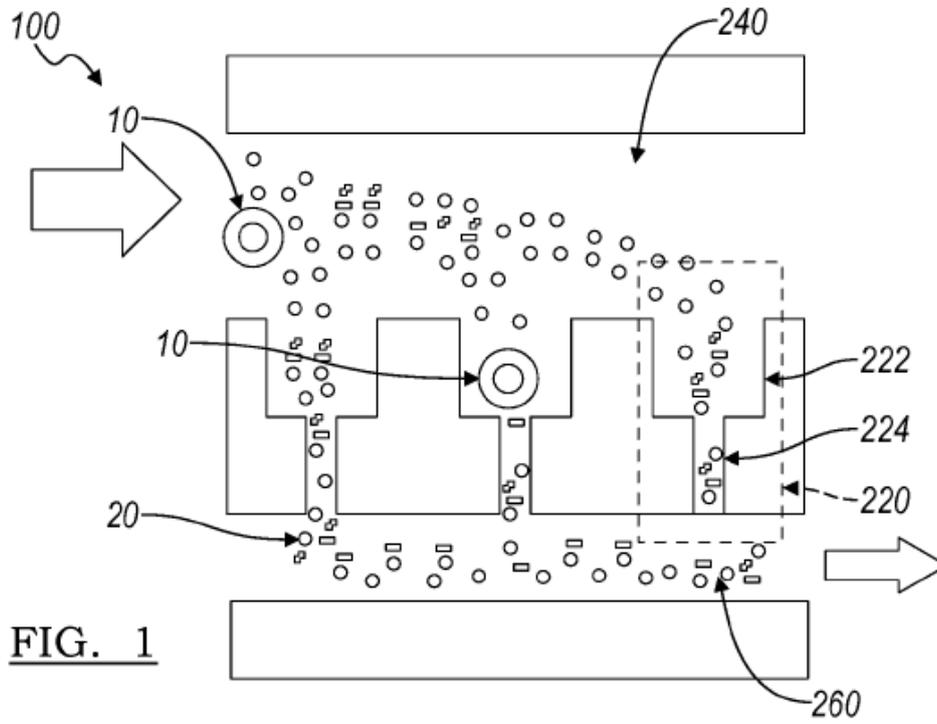


FIG. 1

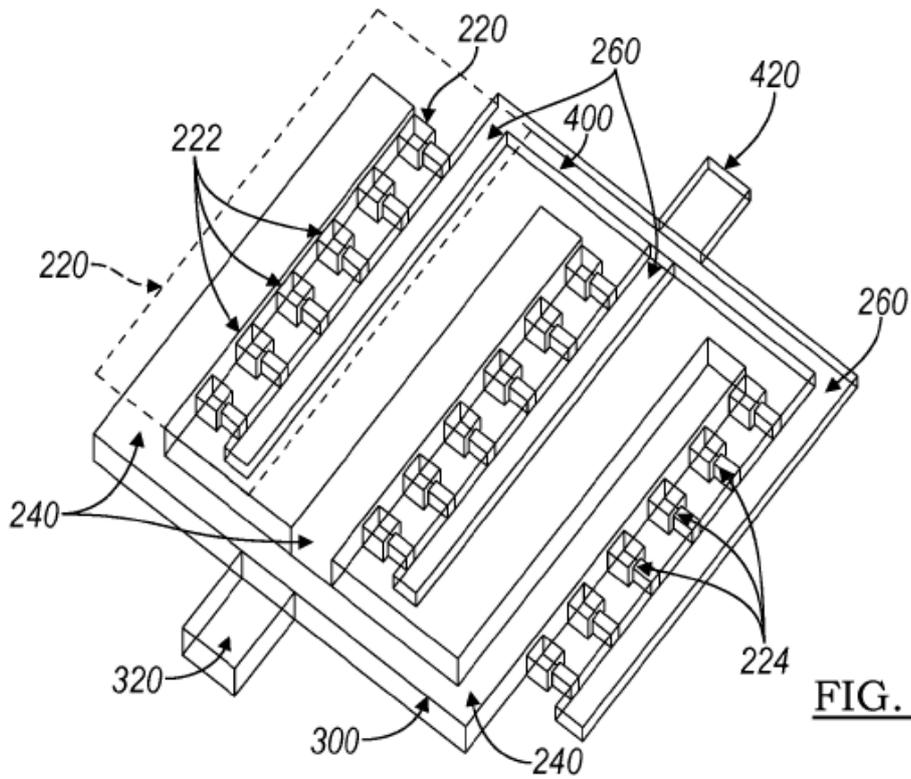
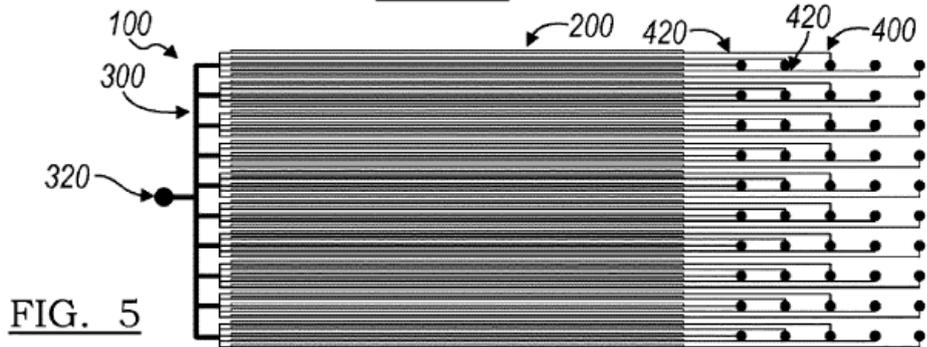
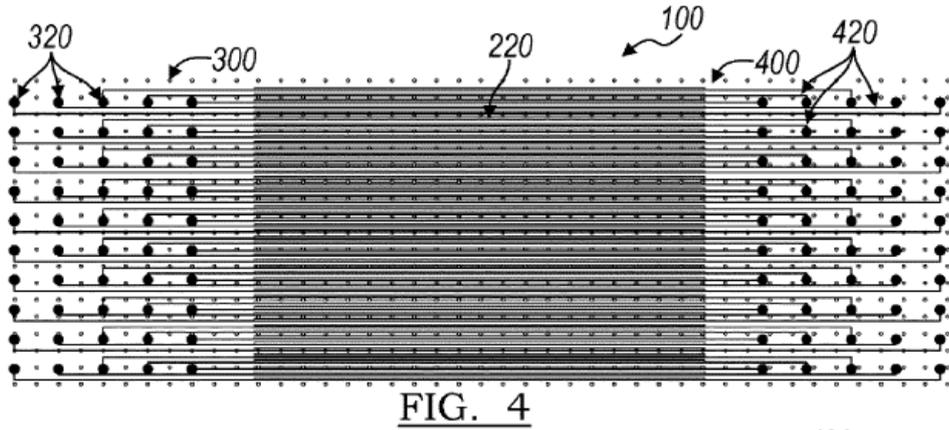
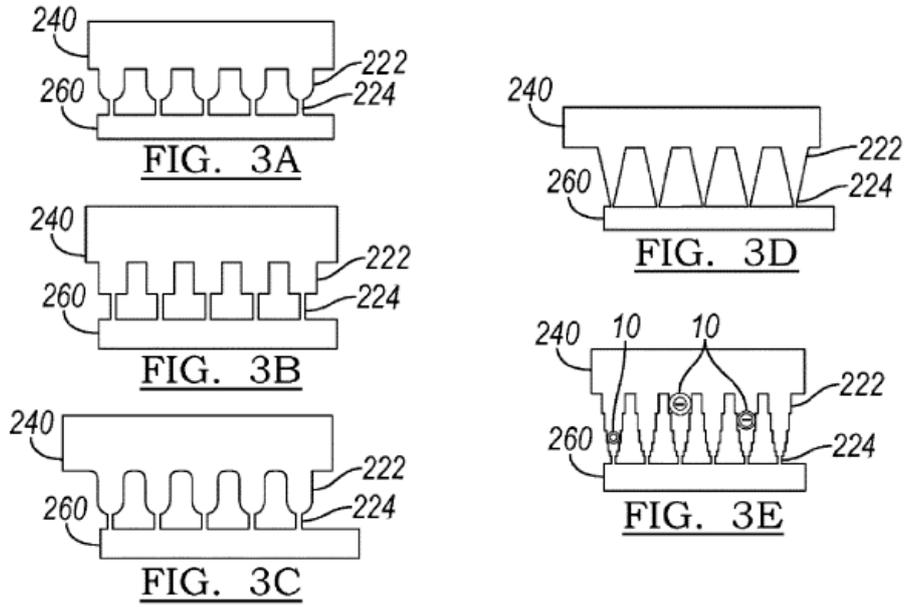
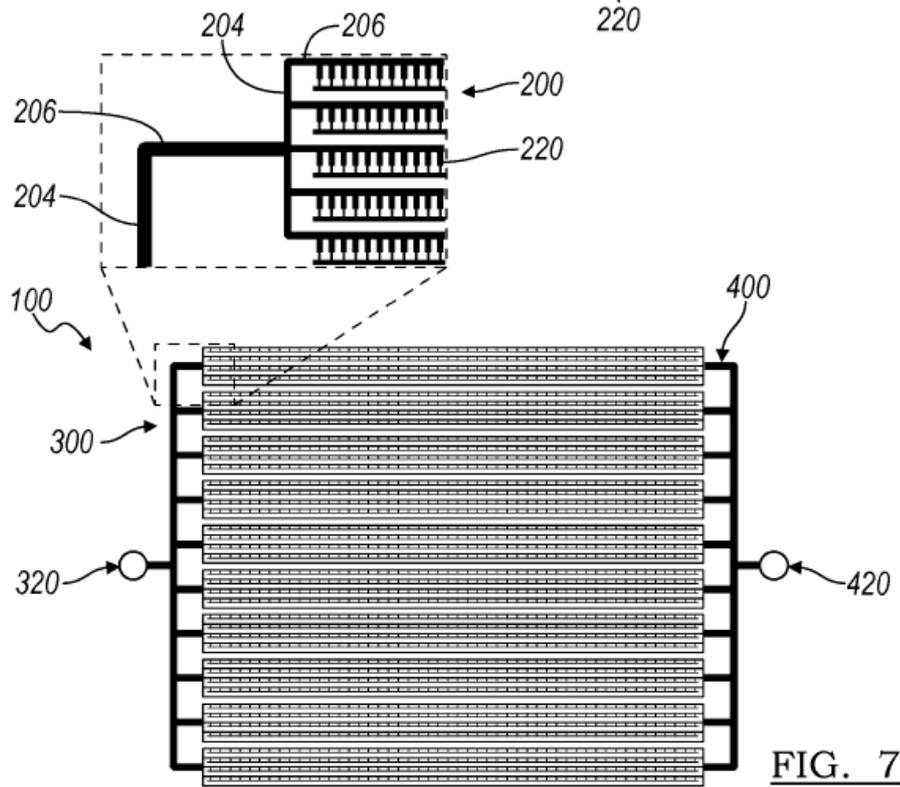
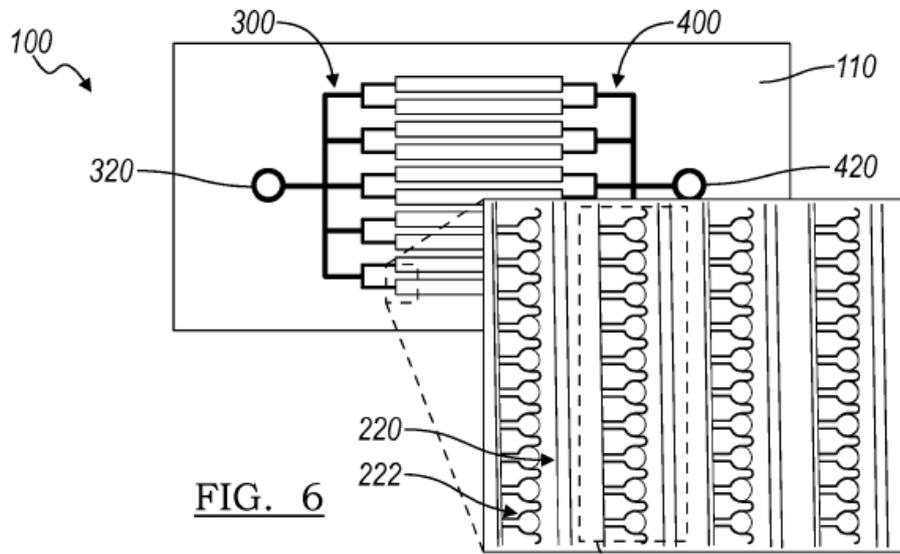


FIG. 2





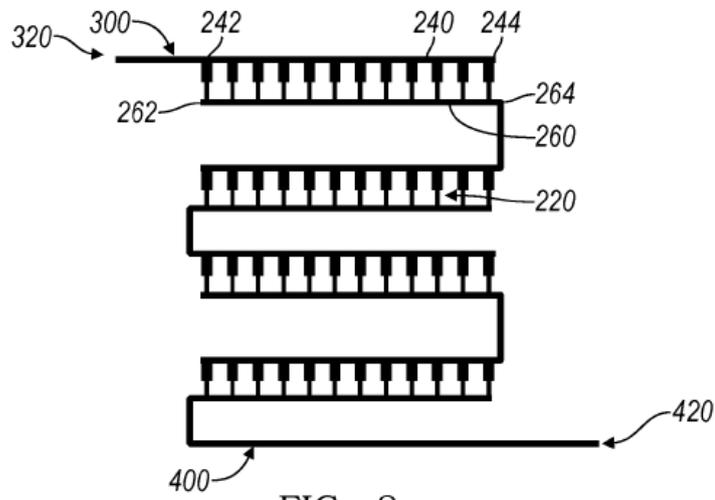


FIG. 8

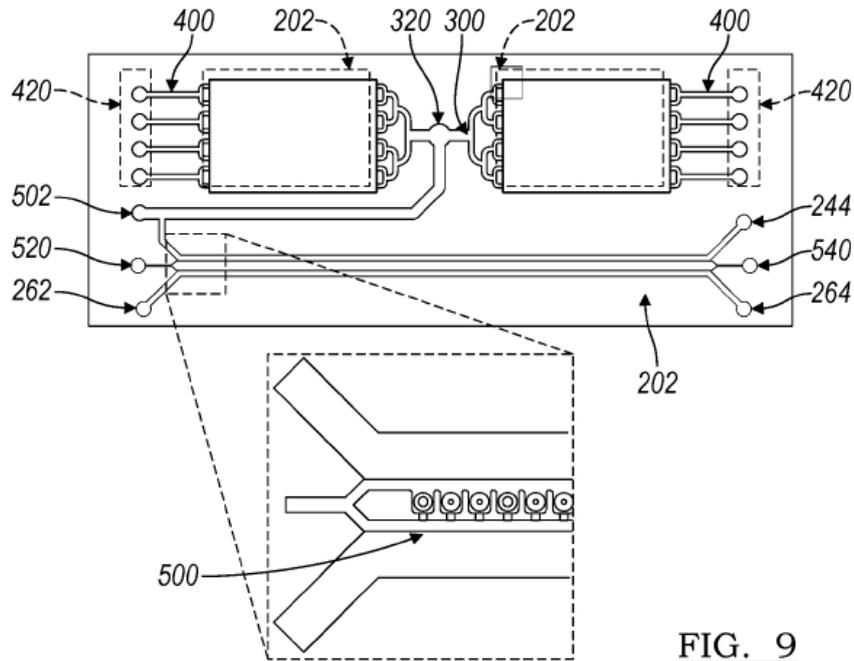


FIG. 9

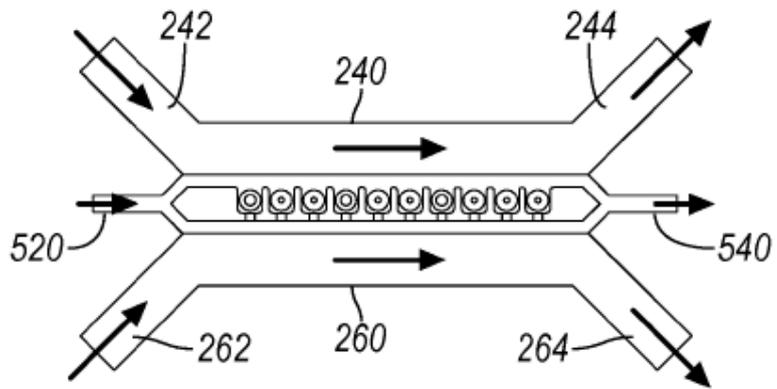


FIG. 10A

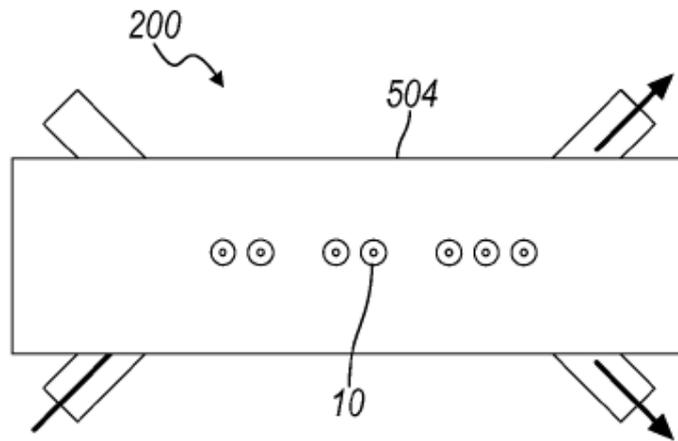


FIG. 10B

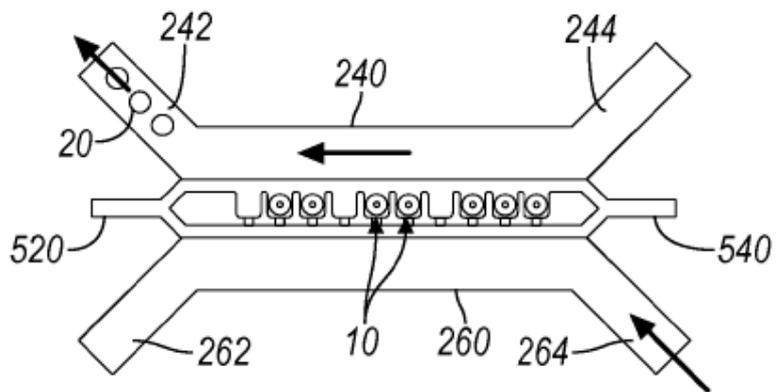


FIG. 10C

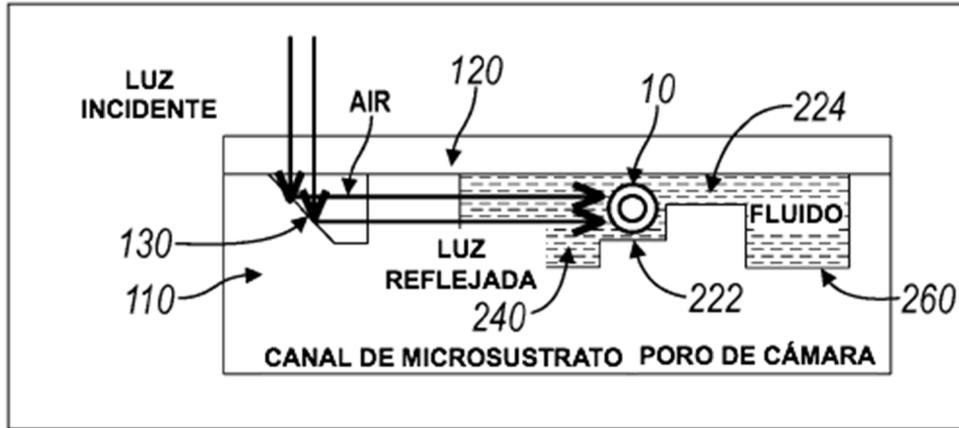


FIG. 11A

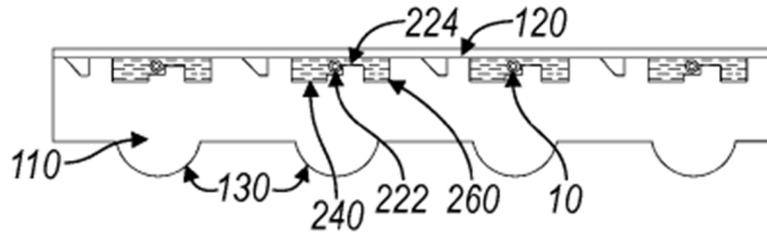


FIG. 11B

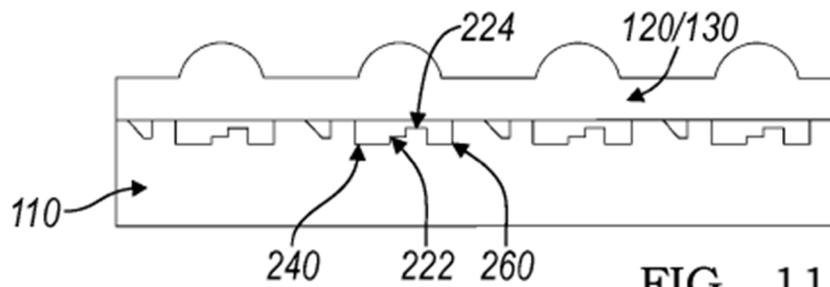


FIG. 11C

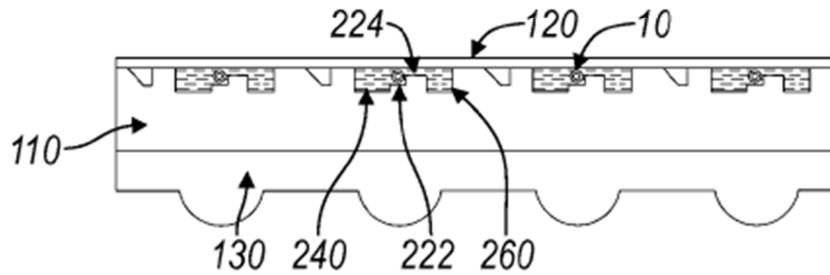


FIG. 11D

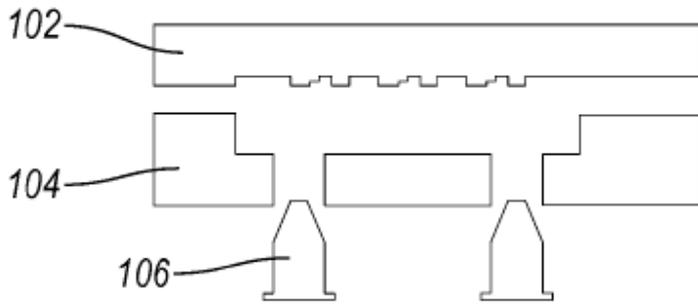


FIG. 12A

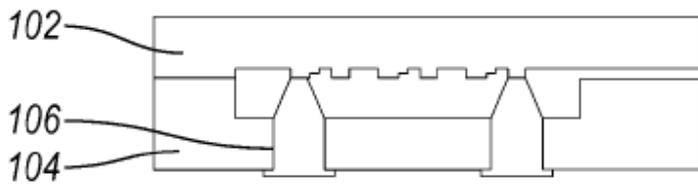


FIG. 12B

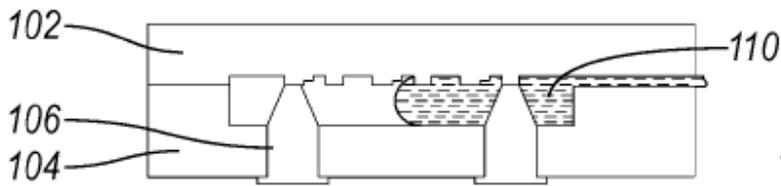


FIG. 12C

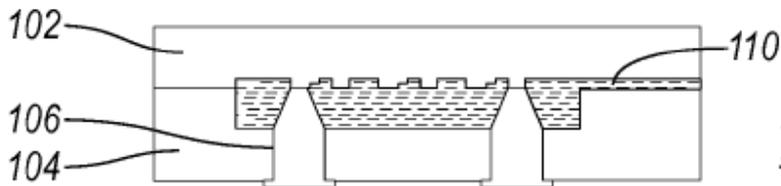


FIG. 12D

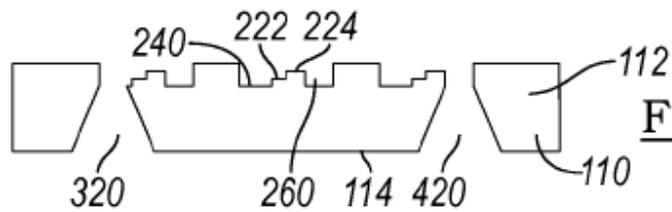


FIG. 12E

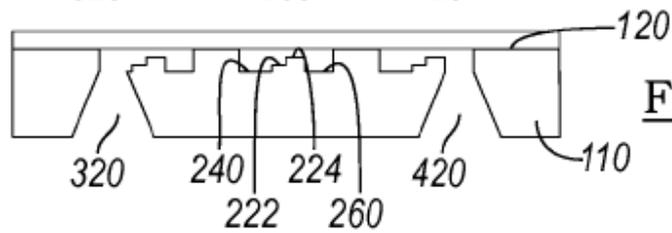


FIG. 12F

ETAPA #	SECCIÓN TRANSVERSAL	DESCRIPCIÓN DEL PROCESO
1.		1. Oxidación de oblea de silicio
2.		1. Fotolitografía de resistencia positiva estándar 2. Grabado de óxido de silicio
3.		1. Elimina fotorresistencia 2. Fotolitografía de resistencia positiva estándar
4.		1. Grabado de silicio (30-40 μm)
5.		1. Elimina fotorresistencia 2. Grabado de silicio (8-10 micras) 3 Corte en cubitos de dispositivos individuales
6.		1. Unión anódica de dispositivo con piezas de vidrio (con agujeros pretaladrados)

FIG. 13

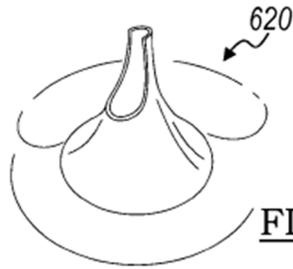


FIG. 14A

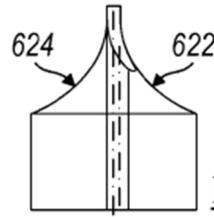


FIG. 14B

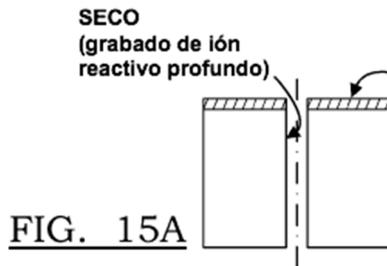


FIG. 15A

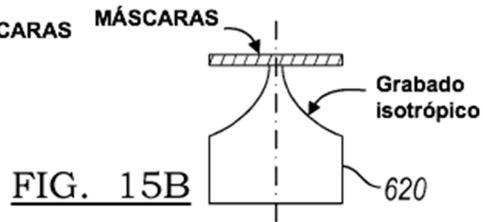


FIG. 15B

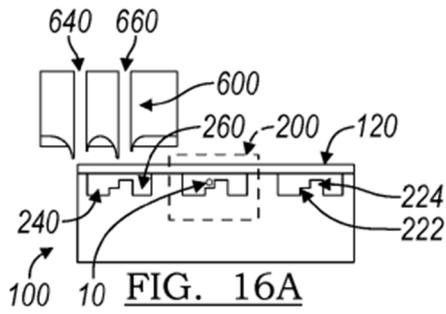


FIG. 16A

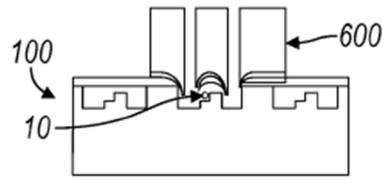


FIG. 16C

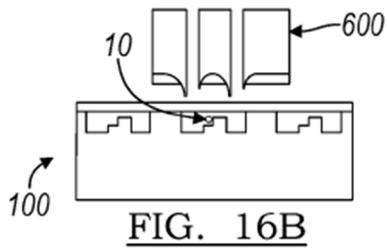


FIG. 16B

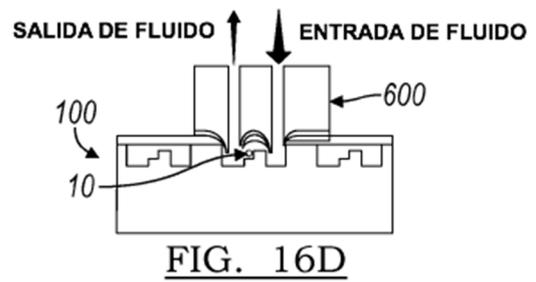


FIG. 16D

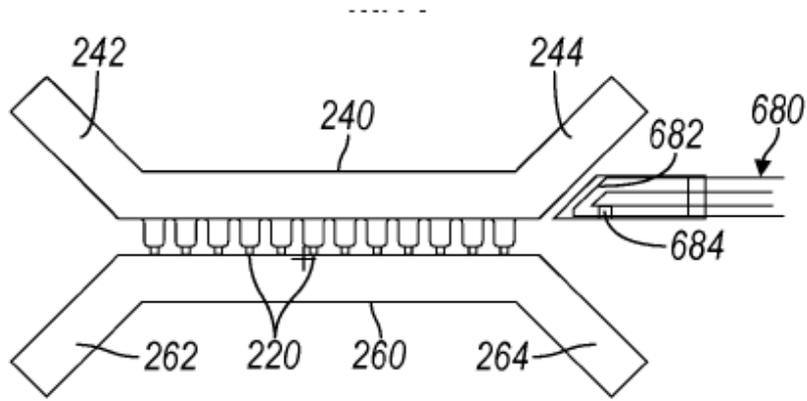


FIG. 17A

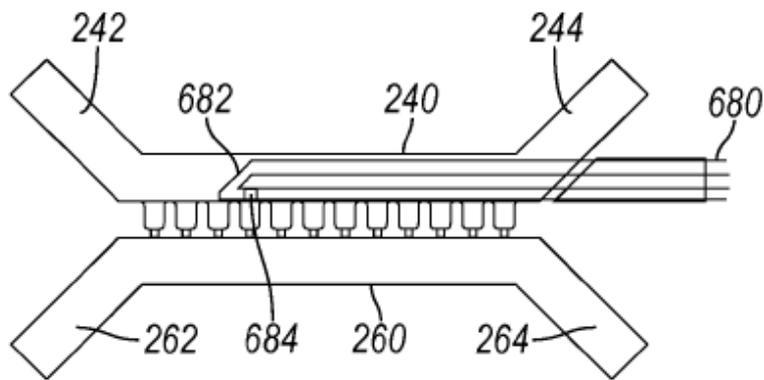


FIG. 17B

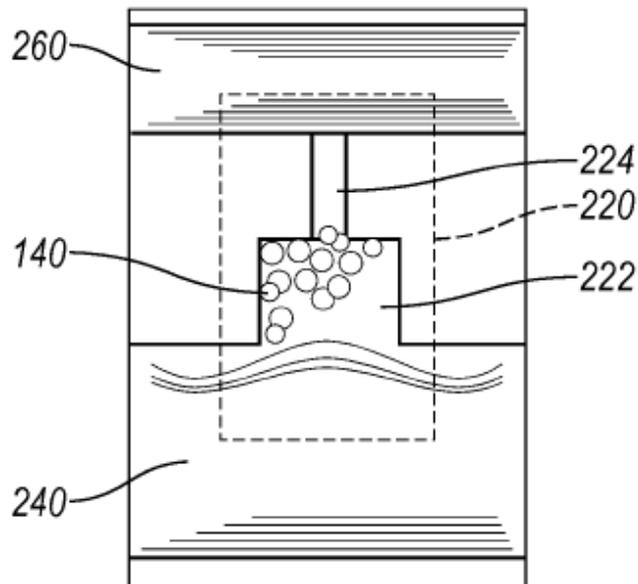


FIG. 18

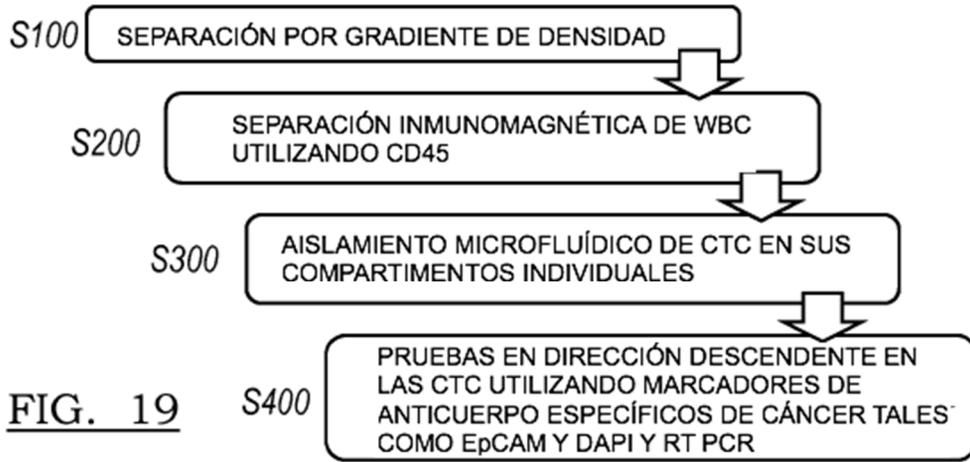


FIG. 19

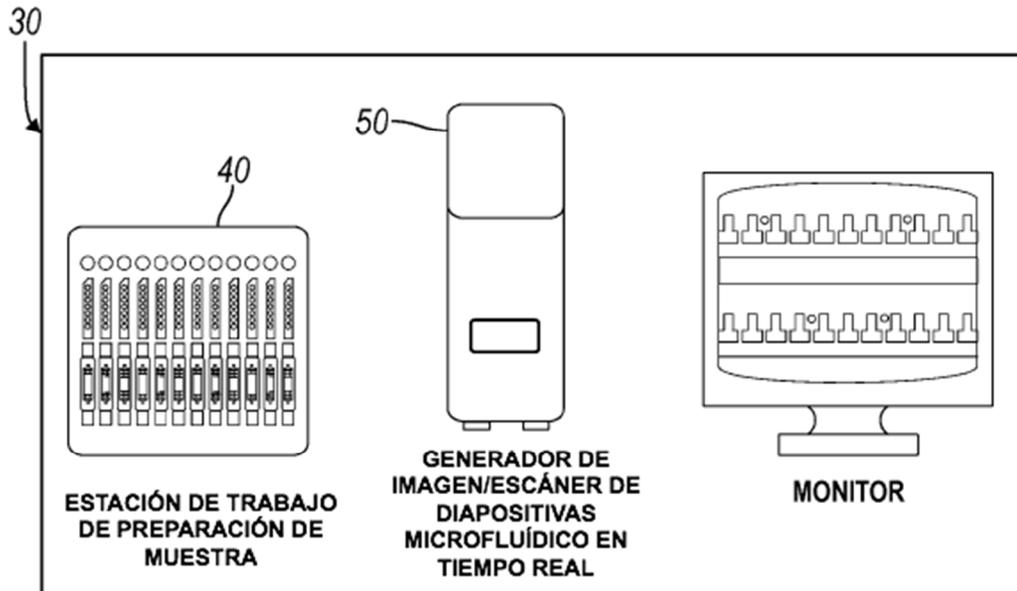


FIG. 20

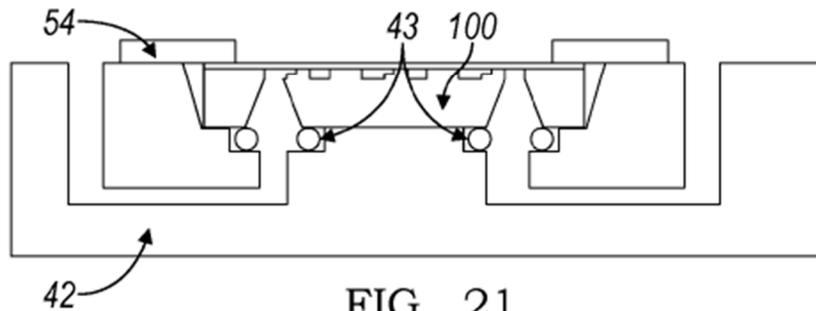
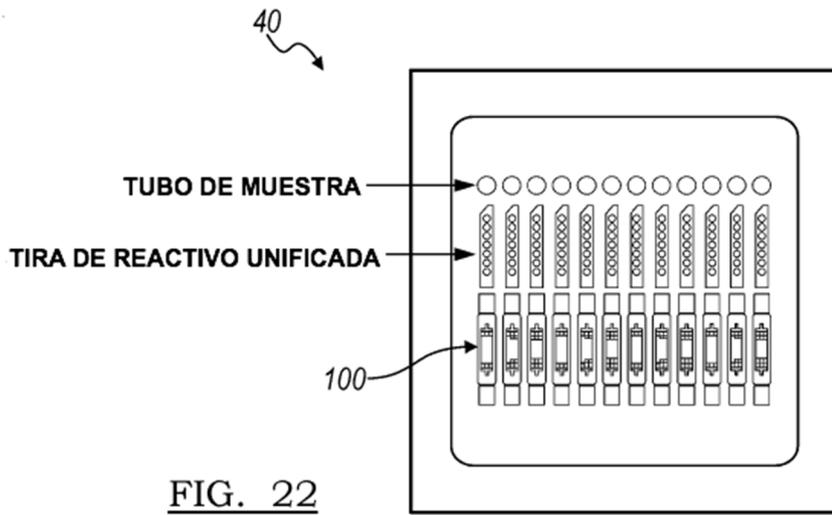


FIG. 21



SECCIÓN VERTICAL QUE TIENE EL MÁS ALTO CONTRASTE

