

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 802 261**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2017 PCT/EP2017/065019**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017 WO17220534**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2017 E 17737217 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 3471879**

54 Título: **Concentración de células diana mejorada mediante dielectroforesis (DEP)**

30 Prioridad:

21.06.2016 GB 201610830
11.05.2017 GB 201707566

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.01.2021

73 Titular/es:

QUANTUMDX GROUP LIMITED (100.0%)
Lugano Building, 57 Melbourne Street
Newcastle upon Tyne NE1 2JQ, GB

72 Inventor/es:

O'HALLORAN, JONATHAN;
MURTON, HEATHER;
OSBORNE, STEPHEN;
BOADA, EDUARDO y
SALMON, JONATHAN

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 802 261 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

Concentración de células diana mejorada mediante dielectroforesis (DEP)

5 La presente invención se refiere a métodos y dispositivos para concentrar células diana usando dielectroforesis (DEP). En particular, el método permite un rendimiento relativamente alto de la muestra (preferiblemente usando volúmenes de muestra de hasta 100 ml, o hasta 10 ml, o hasta 1 ml) a través de un dispositivo microfluídico para permitir la
 10 captura rápida de células diana incluso cuando están presentes en bajas concentraciones dentro de la muestra. El método usa múltiples áreas o cámaras a través de las cuales fluirán las muestras, las áreas o cámaras se disponen de manera tal que la primera área de captura tenga un área más grande y una velocidad de flujo más rápida que una segunda cámara, la segunda cámara está colocada aguas abajo de la primera área de captura y es más pequeña con una velocidad de flujo más lenta para concentrar aún más el material capturado en la primera área de captura.

15 La detección temprana de patógenos es clave para un tratamiento eficaz y oportuno en muchos casos. Por ejemplo, la tuberculosis (TB) causa 2 millones de muertes por año, a pesar de que la mayoría de los casos son curables. Sin una vacuna eficaz disponible, el diagnóstico temprano y el tratamiento eficaz son cruciales para eliminar esta enfermedad. Se estima que el 60 % de los pacientes que requieren una prueba de TB se presentan en los centros de salud locales extrahospitalarios, sin embargo, las pruebas de diagnóstico para tuberculosis resistente a múltiples fármacos (MDR-TB, por sus siglas de inglés) requieren equipos de laboratorio costosos y complejos y personal altamente calificado que se encuentran en laboratorios de referencia o satélites. Los resultados, incluido un panel de marcadores de resistencia a los medicamentos, no pueden entregarse durante semanas, tiempo durante el cual la infección puede propagarse dentro de la comunidad.

20 Los avances en microfluídica son tales que los dispositivos de diagnóstico inmediato (POC, por sus siglas en inglés) se están acercando a convertirse en realidad. Sin embargo, todavía hay cuellos de botella significativos en los sistemas de POC propuestos, muchos de los cuales se relacionan con el preprocesamiento de muestras para pruebas donde las muestras con concentraciones potencialmente bajas de patógenos deben procesarse para proporcionar volúmenes más concentrados de material patógeno. También existen desafíos en el procesamiento de volúmenes relativamente
 25 grandes de muestra en marcos de tiempo aceptables para ser verdaderamente adecuados para la provisión de un diagnóstico inmediato.

La dielectroforesis (DEP) es donde se ejerce una fuerza sobre una partícula dieléctrica o polarizable, lo que hace que se mueva cuando se somete a un campo eléctrico espacialmente no uniforme. El movimiento de DEP puede ser inducido hacia una superficie de electrodo (DEP positiva) o lejos de una superficie de electrodo (DEP negativa).

30 La DEP puede usarse para el procesamiento de flujo continuo microfluídico de una muestra que potencialmente contiene células diana para concentrar las células diana. Un electrodo de DEP se sintoniza para atrapar selectivamente las células diana suspendidas en una corriente de muestra en el área designada dentro de un canal microfluídico, mientras que el flujo continúa atrayendo células y material no deseados a través del canal microfluídico. Esto requiere fuerzas de DEP específicas diana que sean lo suficientemente fuertes como para atrapar continuamente las células
 35 contra las fuerzas hidrodinámicas. La operación de DEP es eficaz para la separación y concentración celular basada en la captura porque las células diana pueden capturarse en las superficies del electrodo y después pueden liberarse apagando el campo eléctrico.

Si bien este enfoque puede ser útil, actualmente está limitado en un entorno clínico debido a la velocidad de procesamiento. Particularmente, en los casos en que el patógeno o la célula diana pueden estar presentes solo a concentraciones muy bajas en una muestra, es necesario que fluyan volúmenes relativamente altos de muestra a través del sistema microfluídico. Si la muestra fluye a través de un sistema microfluídico de DEP típico a una velocidad de flujo demasiado alta, la eficacia de captura de las células diana se reduce; sin querer limitarse a la teoría, se cree que la velocidad de flujo alta es perjudicial por las siguientes razones (i) algunas células escapan a la captura, ya que las que están más lejos de los electrodos están sujetas a menos fuerza y, por lo tanto, pueden ser superadas por las
 40 fuerzas hidrodinámicas, (ii) que con el tiempo elimina eficazmente las células atrapadas previamente. Por lo tanto, la captura de DEP debería ejecutarse lentamente, agregando un tiempo significativo al proceso de diagnóstico general de POC.

Un ejemplo de un dispositivo que tiene limitaciones en el flujo se puede ver en Shantanu Bhattacharya et al; PCR-based detection in a microfabricated platform; Lab On A Chip Vol 8; 1 de enero de 2008; págs. 1130-1136.

50 Otros dispositivos microfluídicos usados para realizar la concentración y separación de partículas por diferentes técnicas se conocen de la publicación internacional WO 2010/080978 A2 y la patente estadounidense US 2010/267162 A1.

La presente invención tiene como diana obviar o mitigar uno o más de los inconvenientes asociados a la técnica anterior.

55 Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para concentrar partículas diana en una muestra, que comprende las etapas de; proporcionar un dispositivo microfluídico, dicho dispositivo comprende;

- al menos una primera área de captura que comprende una pluralidad de electrodos que, cuando se activan, atrapan partículas diana en su superficie, para capturar de manera selectiva y liberable partículas diana, dicha pluralidad de electrodos se dispone de manera que una muestra que fluye a través de la primera área de captura fluirá sobre dicha pluralidad de electrodos, y al menos una entrada, en donde la al menos una entrada está dividida en múltiples canales, donde cada canal es de menor circunferencia que la al menos una entrada;
- 5 una segunda área aguas abajo de la primera área de captura y en comunicación fluida con la misma, la segunda área es de menor volumen que la primera área de captura y comprende una segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a'') que, cuando se activan, atrapan partículas diana en su superficie dispuestos de manera que una muestra que fluye a través de la segunda área fluirá sobre la segunda pluralidad de electrodos;
- 10 introducir una muestra en la primera área de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área de captura a una primera velocidad de flujo, y donde la primera pluralidad de electrodos es capaz de atrapar cualquier partícula diana;
- liberar partículas diana atrapadas de la primera pluralidad de electrodos para proporcionar una muestra enriquecida;
- 15 introducir la muestra enriquecida en la segunda área y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda área a una segunda velocidad de flujo que es más baja que la primera velocidad de flujo, y donde la segunda pluralidad de electrodos está dispuesta para atrapar partículas diana;
- llevar a cabo más etapas de procesamiento.
- Preferiblemente, las partículas diana son células diana.
- 20 Preferiblemente, los medios para capturar de manera selectiva y liberable las células diana son una pluralidad de electrodos que, cuando se activan, atrapan las células diana en su superficie. Preferiblemente, el segundo medio para capturar células diana es una pluralidad de electrodos que, cuando se activan, atrapan células diana en su superficie.
- Sorprendentemente, los inventores han descubierto que al hacer fluir una muestra a través de una primera área más grande, como una cámara, la cámara con electrodos de DEP a una velocidad de flujo relativamente alta permite una captura inicial rápida, las células capturadas se pueden liberar después y a continuación se puede hacer fluir el flujo enriquecido resultante a través de una segunda cámara más pequeña a una velocidad de flujo menor que en la primera área de captura. Esto permite que la célula diana se concentre de manera eficaz y rápida (particularmente en comparación con el método de simplemente hacer fluir a través de un canal con un electrodo de DEP). En particular, esto permite que se procese un volumen de muestra relativamente grande de manera eficaz en el tiempo, independientemente de si hay cantidades altas o bajas de diana presente. El sistema permite, de manera eficaz, que la muestra fluya con una velocidad media más alta a través de la primera área que la segunda área.
- 25
- 30
- Preferiblemente, la etapa de introducir una muestra en la primera área de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área de captura con una primera velocidad de flujo volumétrico a través de dicha área, y donde los primeros medios para capturar de manera selectiva y liberable células diana son capaces de atrapar cualquier célula diana, comprende introducir una muestra en la primera área de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área de captura a una primera velocidad de flujo, con los electrodos activados para atrapar cualquier célula diana. Los electrodos están dispuestos para usar DEP para atrapar selectivamente las células diana.
- 35
- Preferiblemente, la etapa de liberar células diana atrapadas de los primeros medios para capturar de manera selectiva y liberable células diana para proporcionar una muestra enriquecida comprende desactivar los electrodos en la primera área de captura después de un período de tiempo para liberar células diana atrapadas para proporcionar una muestra enriquecida.
- 40
- Preferiblemente, la etapa de introducir la muestra enriquecida en la segunda cámara y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda cámara a una segunda velocidad de flujo volumétrico a través de la segunda área que es más baja que la primera velocidad de flujo, y donde el segundo medio para capturar células diana que es capaz de atrapar células diana, comprende introducir la muestra enriquecida en la segunda cámara y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda cámara a una segunda velocidad de flujo que es inferior a la primera velocidad de flujo, y con los electrodos activados para atrapar células diana. Los electrodos están dispuestos para usar DEP para atrapar selectivamente las células diana.
- 45
- Preferiblemente, la al menos una primera área de captura comprende al menos una entrada y al menos una salida.
- 50 Preferiblemente, la segunda área comprende al menos una entrada y al menos una salida. Sin embargo, la entrada y la salida pueden formarse simplemente a partir de un área en un canal.
- Se entenderá que las referencias a una muestra enriquecida o a una muestra enriquecida adicionalmente solo incluirán células diana en ese caso en que dichas células estén presentes en la muestra original, es decir, si la muestra contiene patógeno.
- Opcionalmente, la primera área de captura es una cámara.

Opcionalmente, la segunda área es una cámara.

Preferiblemente, la al menos una entrada de la primera área de captura está dividida en múltiples canales, donde cada canal tiene una circunferencia menor que la al menos una entrada de la primera área de captura.

Preferiblemente, los canales múltiples son canales paralelos múltiples.

5 Ventajosamente, al dividir la primera área de captura en una pluralidad de canales de circunferencia más pequeña, preferiblemente paralelos, esto permite que fluya un volumen relativamente grande de muestra con las características de volúmenes más pequeños. Como la primera área de captura ahora es efectivamente un área de captura con una pluralidad de canales, los problemas a menudo asociados con las características de flujo laminar donde el centro del flujo es típicamente más rápido que los bordes se reducen. En particular, los problemas asociados al flujo en los bordes de los canales se mitigan y hay menos problemas con la caída de voltaje a través de los electrodos.

Preferiblemente, los canales múltiples se vuelven a unir en la salida de la al menos una primera área de captura.

Preferiblemente, la al menos una entrada de la primera área de captura está provista de al menos una bifurcación para dividirla en múltiples canales.

15 Preferiblemente, la al menos una salida de la primera área de captura está provista de al menos una bifurcación para volver a unirla en un solo canales.

Ventajosamente, el uso de bifurcaciones para dividir los canales de entrada o volver a unir los canales de salida proporciona una forma reproducible y manejable de aumentar o disminuir la presión.

Opcionalmente, el dispositivo microfluídico puede comprender una pluralidad de porciones separables.

20 Opcionalmente, antes de desactivar los electrodos en la primera área de captura, se hace fluir un tampón o medio fresco en la primera área de captura. Este tampón fresco podría ser agua. Cuando los electrodos se desactivan, las células diana se liberan en el tampón fresco para dar una muestra enriquecida con una mayor concentración de células diana.

Preferiblemente, la muestra es baja en sal o baja fuerza iónica.

25 Opcionalmente, las etapas de procesamiento adicionales pueden incluir la desactivación de los electrodos en la segunda cámara después de un período de tiempo para liberar las células diana atrapadas para proporcionar una muestra enriquecida adicionalmente. Opcionalmente, antes de desactivar los electrodos en la segunda cámara, un tampón o medio fresco se hace fluir por la primera área de captura. Este tampón fresco podría ser agua. Cuando los electrodos después se desactivan, las células diana se liberan en el tampón fresco para proporcionar una muestra enriquecida adicionalmente con una mayor concentración de células diana.

30 Opcionalmente, las etapas de procesamiento adicionales pueden incluir la lisis de las células *in situ* y opcionalmente realizar extracción y/o amplificación de ácido nucleico.

Opcionalmente, los anticuerpos contra las células diana pueden introducirse en la primera área de captura y/o la segunda cámara. Dichos anticuerpos pueden incluir fluoróforos.

35 Opcionalmente, se puede introducir una tinción biológica específica para las células diana en la primera área de captura y/o la segunda cámara.

Opcionalmente se proporciona un dispositivo de detección óptica.

Preferiblemente, dicho dispositivo de detección óptica está dispuesto para detectar señales de la segunda cámara. Preferiblemente, dicho dispositivo de detección óptica es capaz de detectar, y preferiblemente diferenciar o analizar, la fluorescencia. Opcionalmente, el dispositivo de detección óptica comprende una fuente de excitación y un detector.

40 Opcionalmente, el dispositivo está provisto de reguladores de flujo. Opcionalmente, los reguladores de flujo son bombas. El flujo puede regularse de varias maneras, como entendería fácilmente un experto en la técnica. Los cambios en el flujo se pueden lograr cambiando los contornos y tamaños de los canales y cámaras microfluídicos y/o usando medios adicionales como bombas.

45 Preferiblemente, cuando se activan los electrodos en la primera área de captura, la muestra fluye fuera del área de captura a un depósito de desechos. Preferiblemente, cuando los electrodos en la primera área de captura están desactivados, la muestra fluye fuera de la primera área de captura a la segunda cámara.

Preferiblemente, cuando se activan los electrodos en la segunda cámara, la muestra fluye fuera de la segunda cámara a un depósito de residuos.

50 Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo microfluídico para concentrar partículas diana, tales como células diana, en una muestra, que comprende;

- una primera área de captura, la primera área de captura comprende una primera pluralidad de electrodos que, cuando se activan, atrapan las células diana en su superficie para capturar partículas diana de manera selectiva y liberable, dicha primera pluralidad de electrodos se dispone de manera que una muestra que fluye a través de la primera área de captura fluirá sobre dicha primera pluralidad de electrodos, y al menos una entrada en donde dicha entrada está dividida en múltiples canales, donde cada canal es de menor circunferencia que la al menos una entrada de la primera área de captura;
- 5 una segunda área, aguas abajo de la primera área de captura y en comunicación fluida con esta, la segunda área es de menor volumen que la primera área de captura y comprende una segunda pluralidad de electrodos que, cuando se activan, atrapan las células diana en su superficie para capturar partículas diana, que se dispone de manera que una muestra que fluye a través de la segunda área fluirá sobre dicha segunda pluralidad de electrodos;
- 10 un módulo de control que controla la activación y desactivación de los electrodos;
- medios de control de flujo para permitir que la velocidad de flujo a través de la segunda cámara sea menor que la velocidad de flujo a través de la primera área de captura.
- Preferiblemente, los canales múltiples son canales paralelos múltiples.
- 15 Preferiblemente, los canales múltiples se vuelven a unir en la salida de la al menos una primera área de captura.
- Preferiblemente, la al menos una entrada de la primera área de captura está provista de al menos una bifurcación para dividirla en múltiples canales.
- Preferiblemente, la al menos una salida de la primera área de captura está provista de al menos una bifurcación para volver a unirla en un solo canales.
- 20 Opcionalmente, el dispositivo microfluídico puede comprender una pluralidad de porciones separables.
- Opcionalmente, el dispositivo comprende un depósito de tampón o medio fresco en comunicación fluida con la primera área de captura. Opcionalmente, el depósito de tampón o medio fresco está en comunicación fluida con la segunda cámara. Alternativamente, un segundo depósito de tampón o medio fresco está en comunicación fluida con la segunda cámara. Opcionalmente, el tampón o medio fresco es agua. El dispositivo puede comprender, además, un módulo de control que introduce el flujo de un tampón o medio fresco en la primera área de captura y/o la segunda cámara cuando los electrodos están desactivados.
- 25 Opcionalmente, el dispositivo comprende un depósito de anticuerpos contra las células diana. Opcionalmente, el reservorio de anticuerpos está en comunicación fluida
- Opcionalmente, se puede introducir una tinción biológica específica para las células diana en la primera área de captura y/o la segunda cámara.
- 30 Opcionalmente se proporciona un dispositivo de detección óptica.
- Preferiblemente, dicho dispositivo de detección óptica está dispuesto para detectar señales de la segunda cámara. Preferiblemente, dicho dispositivo de detección óptica es capaz de detectar, y preferiblemente diferenciar o analizar, la fluorescencia. Opcionalmente, el dispositivo de detección óptica comprende una fuente de excitación y un detector.
- 35 Opcionalmente, el dispositivo comprende módulos de preprocesamiento. Esto puede incluir cámaras adicionales en comunicación fluida con la primera área de captura para preprocesar la muestra. Esto podría incluir alterar la viscosidad de la muestra, el contenido de sal, etc.
- Opcionalmente, el dispositivo está provisto de reguladores de flujo. Opcionalmente, los reguladores de flujo son bombas.
- 40 Preferiblemente, el dispositivo está provisto de un depósito de residuos. Opcionalmente, el depósito de residuos está en comunicación fluida con la primera área de captura. Preferiblemente, el depósito de residuos está en comunicación fluida con la segunda cámara.
- Una variante preferida del primer aspecto de la invención es un método para concentrar células diana, que comprende las etapas de;
- 45 proporcionar un dispositivo microfluídico, dicho dispositivo comprende;
- una primera área de captura, la primera área de captura comprende una pluralidad de electrodos que, cuando se activan, atrapan las células diana en su superficie, dichos electrodos se disponen de manera que una muestra que fluye a través de la primera área de captura fluirá sobre ellos;
- 50 una segunda área de captura aguas abajo de la primera área de captura y en comunicación fluida con esta, la segunda área de captura es de menor volumen que la primera área de captura y comprende una pluralidad de electrodos que,

cuando se activan, atrapan células diana en su superficie, dichos electrodos se disponen de manera que una muestra que fluye a través de la primera área de captura fluirá sobre ellos;

introducir una muestra en la primera área de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área de captura a una primera velocidad de flujo, y con los electrodos activados para atrapar cualquier célula diana;

- 5 desactivar los electrodos en la primera área de captura después de un período de tiempo para liberar las células diana atrapadas para proporcionar una muestra enriquecida;

introduciendo la muestra enriquecida en la segunda cámara y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda área de captura a una segunda velocidad de flujo que es más baja que la primera velocidad de flujo, y con los electrodos activados para atrapar las células diana.

- 10 Con el fin de proporcionar una mejor comprensión de la presente invención, se describirán realizaciones, solo a modo de ejemplo, y con referencia a los siguientes dibujos;

La Figura 1 muestra una realización de un dispositivo microfluídico, o una porción de este;

La Figura 2 muestra otra realización de un dispositivo microfluídico o una porción de este;

- 15 La Figura 3a muestra una realización de un dispositivo según la presente invención con 3b que muestra una vista ampliada de la primera área de captura en dicho dispositivo que incluye canales bifurcados según la presente invención; y

La Figura 4 muestra otra realización del dispositivo con una variante adicional de la primera área de captura que tiene canales bifurcados donde el diseño es tal que de hecho hay múltiples primeras áreas de captura.

- 20 Un dispositivo 1 microfluídico (o una porción de este) se representa generalmente en la Figura 1. El dispositivo comprende una primera área 2 de captura en forma de una cámara con una primera entrada 3 a través de la cual el fluido puede fluir hacia la primera área 2 de captura, y una primera salida 4 a través de la cual el fluido puede salir de la primera área 2 de captura. La primera área de captura comprende una pluralidad de electrodos 5 dispuestos de manera que la muestra fluya sobre ellos o entre en contacto con ellos cuando el dispositivo esté en uso. Los electrodos 5 se sintonizan apropiadamente, como entendería un experto en la técnica, para atrapar células diana usando DEP cuando los electrodos se activan. Por ejemplo, en algunos casos, los electrodos pueden usar 10MHz, 5V para *M. Smegmatis*, pero en realidad pueden funcionar en un rango completo de frecuencias y voltajes dependiendo de las velocidades de flujo y las geometrías de los electrodos.

- 25 El dispositivo también comprende una segunda cámara 6, que está tanto aguas abajo como en comunicación fluida con la primera área 2 de captura. Hay una segunda entrada de cámara 7 a través de la cual el fluido puede fluir hacia la segunda cámara 6, y una segunda salida de la cámara 8 a través de la cual el fluido puede salir de la segunda cámara 6. La segunda cámara comprende una pluralidad de electrodos 5a dispuestos de manera que la muestra fluya sobre ellos o entre en contacto con ellos cuando el dispositivo esté en uso. Los electrodos 5a se sintonizan apropiadamente, como entendería un experto en la técnica, para atrapar células diana usando DEP cuando se activan los electrodos.

- 30 Durante el uso, se introduce una muestra en la primera área 2 de captura con una primera velocidad de flujo. La velocidad de flujo está regulada por una bomba (no se muestra). Los electrodos 5 se activan y, como tal, las células diana (p. ej., células de *M. tuberculosis* o células de *Mycobacterium smegmatis*) en la muestra quedan atrapadas por las fuerzas DEP al menos parte de la superficie de los electrodos 5. La muestra continúa fluyendo a través de la cámara de tal manera que las células diana continúan siendo capturadas mientras que el eluato de muestra restante del que se han eliminado las células diana viaja a un depósito 9 de residuos u otra área. Después de un período de tiempo, que puede ser un período de tiempo predeterminado, los electrodos 5 se desactivan y las células diana atrapadas se liberan de la superficie de los electrodos. Esto da como resultado que los medios a través de la primera área 2 de captura se enriquezcan con células diana (siempre que, por supuesto, dichas células diana estén presentes en la muestra original). Esto se denomina en el presente documento muestra enriquecida.

- 35 La muestra enriquecida se hace fluir a través de un canal, en este ejemplo un canal microfluídico, hacia la segunda cámara 6. El flujo a través de la segunda cámara 6 es a una segunda velocidad de flujo que es más baja que la velocidad de flujo de la muestra a través de la primera área 2 de captura. Los electrodos 5a en la segunda cámara 6 se activan y, como tal, las células diana (p. ej., células de *M. tuberculosis* M. o células de *Mycobacterium smegmatis*) en la muestra quedan nuevamente atrapadas por las fuerzas DEP al menos parte de la superficie de los electrodos 5a. Como la muestra enriquecida ya contendrá volúmenes más concentrados de células diana, la captura o apresamiento de las células diana es altamente eficaz.

- 40 También se proporciona un depósito 9 de residuos que podría ser externo al dispositivo en forma de una botella de residuos. La primera área 2 de captura y la segunda cámara 6 están ambas en comunicación fluida con un depósito 9 de residuos para permitir que se extraiga la muestra de la que se han eliminado las células, o el flujo no deseado. Sin embargo, un experto en la técnica apreciaría que esta conformación no es esencial para la invención.

Un experto en la técnica entenderá que se pueden incluir varias etapas y módulos de preprocesamiento antes de que la muestra se introduzca en la primera área de captura.

5 Un experto en la técnica también entenderá que se pueden incluir varias etapas y módulos de postprocesamiento después de que las células diana se atrapen o capturen de la muestra enriquecida en la segunda cámara. Por ejemplo, se podrían lisar las células *in situ* y después extraer los ácidos nucleicos, enriquecidos o amplificados. Además, se podrían desactivar los electrodos en la segunda cámara podrían y liberar las células diana para dar una muestra concentrada adicionalmente.

10 Un experto en la técnica entenderá que, aunque se describen una primera área de captura y una segunda cámara; también se podrían incluir cámaras de concentración adicionales. Mientras que la primera y la segunda cámara están en comunicación fluida, otros módulos, depósitos y estructuras microfluidicas podrían incluirse entre las cámaras.

15 Como se muestra mejor en la Figura 2, se puede incluir un depósito 10 de anticuerpos, los anticuerpos se seleccionan para unirse a las células de interés y se proporcionan o pueden asociarse con un fluoróforo u otro marcador. Un experto en la técnica apreciaría que el depósito 10 de anticuerpos podría reemplazarse con un tinte, una mancha u otro producto biológico que permitiría la identificación de células diana durante el procesamiento posterior. Un sistema de válvulas 11 puede usarse para introducir el anticuerpo en la primera área 2' de captura o la segunda cámara 6' según se requiera.

20 La segunda cámara 6' está provista de una superficie superior abierta o visualmente transparente. Esto es para que, durante el uso, la segunda cámara 6' pueda asociarse o verse usando un dispositivo de detección óptica (no se muestra) que está dispuesto para detectar señales desde la segunda cámara. Preferiblemente, dicho dispositivo de detección óptica es capaz de detectar, y preferiblemente diferenciar o analizar, la fluorescencia. En este caso, el dispositivo de detección óptica comprendería una fuente de excitación y un detector.

Además, las realizaciones según la invención se muestran en las Figuras 3 y 4.

25 En cada una de estas realizaciones se proporciona un dispositivo 1', 1" de casete que tiene una primera área 2', 2" de captura colocada aguas arriba de una segunda área 6', 6" de captura. El casete está formado sobre un sustrato de vidrio (aunque se apreciará que también podrían usarse otros materiales).

30 En la Figura 3a, la primera área de captura comprende una pluralidad de electrodos 5' dispuestos de manera que la muestra fluya sobre ellos o entre en contacto con ellos cuando el dispositivo esté en uso (como se muestra más claramente en la Figura 3b ampliada). Los electrodos 5' se sintonizan apropiadamente, como entendería un experto en la técnica, para atrapar células diana usando DEP cuando los electrodos se activan. Por ejemplo, en algunos casos, los electrodos pueden usar 10MHz, 5V para *M. Smegmatis* pero en realidad pueden funcionar en un rango completo de frecuencias y voltajes dependiendo de las velocidades de flujo y las geometrías de los electrodos.

35 La primera entrada 3' conduce a la primera área de captura. En la realización mostrada en la Figura 3, el canal que fluye desde la entrada 3' está provisto de bifurcaciones 13', cada canal bifurcado se proporciona luego con bifurcaciones adicionales de modo que la entrada conduzca eficazmente a una pluralidad de canales 14' paralelos de circunferencia menor que el canal inicial. El número de bifurcaciones se puede seleccionar dependiendo del flujo de fluido requerido. La pluralidad de canales 14' paralelos fluyen cada uno a través de la cámara y los electrodos 5' en esta. Eficazmente, en esta realización, la cámara es, de hecho, una pluralidad de canales 14' que permiten que el fluido fluya a través de los electrodos, en lugar de una única cámara abierta. Esto permite gestionar el flujo de fluido. Los canales 14' luego fluyen a través de una versión inversa de las bifurcaciones para finalmente volver a unirse. Cada bifurcación en el extremo de entrada reduce la altura, el ancho o la circunferencia del canal que conduce a él, lo que permite que se introduzca una muestra de gran volumen a través de la entrada 3' y que fluya a través de la primera área 2' de captura con características de flujo manejables. Por el contrario, cada bifurcación en el extremo de salida puede aumentar en altura y ancho, o circunferencia, en comparación con los canales individuales que conducen a ella.

45 La inmovilización dielectroforética eficaz de las secuencias diana requirió una interacción sintonizada con el campo. Las perturbaciones en la velocidad del flujo pueden alterar la respuesta de la diana al campo y, como tal, la velocidad del flujo debe controlarse cuidadosamente. Para garantizar una velocidad de flujo constante y controlada mientras se mantienen volúmenes de alto rendimiento, se requieren cámaras paralelas estrechas para reducir el efecto de las velocidades variables y la posible formación de burbujas. Dentro de canales más grandes, la velocidad de flujo en las regiones centrales es significativamente más rápida y, como tal, la captura no se puede optimizar en todo el dispositivo. El uso de la bifurcación para dividir equitativamente el flujo en múltiples canales más pequeños permite un mayor control de las velocidades de flujo para una captura por DEP optimizada.

55 En la realización mostrada en la Figura 4, el concepto de canal paralelo se ha desarrollado aún más para permitir un flujo relativamente rápido de la muestra en una huella relativamente pequeña. En esta realización, el sustrato es de vidrio y hay una pluralidad de capas intercaladas entre sí para formar el dispositivo 1" deslizante o de casete. Proporcionar el sustrato como una pluralidad de capas permite que se formen canales en las capas a diferentes profundidades que pueden ser particularmente útiles al diseñar el sustrato ya que permite una fabricación más fácil. Algunos canales se pueden crear al menos parcialmente en más de una capa. Esto se puede ver en la Figura 4, donde

el flujo desde la entrada 3" se muestra como un color blanco de bloque y se crea en una capa superior que luego se alimenta a los canales en una capa inferior (indicado en la Figura 4 con líneas paralelas) en la primera bifurcación (en la Figura 4 debe entenderse que la primera bifurcación sí permite el flujo de fluido y la línea continua que se muestra en la figura es simplemente indicativa de un cambio en las diferentes capas). La entrada 3" está nuevamente configurada para tener bifurcaciones 13" que dividen el canal en dos canales y luego otras bifurcaciones resultan en una pluralidad de canales 14". El canal que está inmediatamente aguas abajo de la entrada 3" es un canal relativamente profundo que se extiende a través de una pluralidad de capas del sustrato (o a través de una capa del sustrato hasta una profundidad X), sin embargo, después de la bifurcación inicial, resultan otras bifurcaciones de canal en los canales cada vez más pequeños, y estos canales más pequeños se forman en un número menor de capas de sustrato (o a través de una capa diferente del sustrato hasta una profundidad >X), típicamente en la capa media del sustrato.

En esta realización, el posicionamiento de los canales es tal que inicialmente no todos corren paralelos sino que conducen a una pluralidad de grupos de canales 14" paralelos de circunferencia más pequeña aguas abajo de la entrada 3". De nuevo, la pluralidad de canales 14" paralelos cada uno fluye a través de los electrodos en el mismo. El flujo puede dirigirse al configurar los canales de modo que pueda fluir a través de múltiples primeras áreas 2" de captura como se muestra aquí. Además, el dispositivo 1" puede tener varias capas de modo que la profundidad del canal se pueda configurar fácilmente. Una configuración de canal multicapa permite diferentes profundidades de canales que conducen a la zona de bifurcación. También puede permitir una huella más pequeña ya que los canales pueden extenderse en diferentes planos. De esta manera, la presión se reduce y minimiza constantemente dentro de los canales de captura principales.

El dispositivo también comprende una segunda área 6", que está aguas abajo y en comunicación fluida con las primeras áreas 2" de captura (o cámara(s) 2"). Puede haber una salida de desechos provista entre la primera área 2" y la segunda área 6" que puede estar provista de una válvula, de modo que cuando la válvula esté en una primera posición, p. ej., abierta, el flujo se dirige a través de una salida de desechos 12" a una cámara o área de desechos, y cuando está en una segunda posición, p. ej., cerrada, el flujo no sale a través de la salida de desechos y en su lugar se dirige a la segunda área.

Puede haber una entrada de la segunda cámara a través de la cual el fluido (que es la muestra enriquecida de bajo volumen) puede fluir hacia la segunda cámara 6" o simplemente puede ser que la segunda área se coloca aguas abajo y en el canal de flujo de fluido. También puede haber una salida de la segunda cámara 8" a través del cual el fluido puede salir de la segunda área 6". La segunda área comprende una pluralidad de electrodos 5a" dispuestos de manera que la muestra enriquecida fluya sobre ellos o entre en contacto con ellos cuando el dispositivo esté en uso. Los electrodos 5a se sintonizan apropiadamente, como entendería un experto en la técnica, para atrapar células diana usando DEP cuando se activan los electrodos.

Durante el uso, se introduce una muestra en la primera área 2" de captura a una primera velocidad de flujo. La velocidad de flujo se regula mediante una bomba (no se muestra). Los electrodos 5" se activan y, como tal, las células diana (p. ej., células de *M. Tuberculosis* o células de *Mycobacterium smegmatis*) en la muestra quedan atrapadas por las fuerzas de DEP al menos parte de la superficie de los electrodos 5". La muestra continúa fluyendo a través de la cámara 2" de manera que las células diana continúan siendo capturadas mientras que el eluato de muestra restante de la cual se eliminaron las células diana se desplaza a través de la salida de residuos 12" a un depósito de residuos u otra área. Después de un período de tiempo, que puede ser un período predeterminado, los electrodos 5" se desactivan y las células diana atrapadas se liberan de la superficie de los electrodos". Esto da como resultado que los medios en la primera área 2" de captura se enriquezcan con células diana (siempre que, por supuesto, dichas células diana estuviesen de hecho presentes en la muestra original). Esto se denomina en el presente documento muestra enriquecida.

La muestra enriquecida no fluye hacia la cámara de desechos sino que después fluye a través de un canal, en este ejemplo, un canal microfluídico, hacia la segunda cámara o área 6". El flujo a través de la segunda cámara 6" es a una segunda velocidad de flujo que es menor que la velocidad de flujo de la muestra a través de la primera área 2" de captura.

Se apreciará que las características de una realización pueden incorporarse apropiadamente en otra realización a menos que sea técnicamente inviable hacerlo. Con respecto al uso de sustancialmente cualquier término plural y/o singular en el presente documento, los expertos en la técnica pueden traducir del plural al singular y/o del singular al plural según sea apropiado para el contexto y/o la aplicación. Las diversas permutaciones en singular/plural pueden establecerse expresamente en este documento en aras de la claridad.

Los expertos en la técnica entenderán que, en general, los términos utilizados en el presente documento, y especialmente en las reivindicaciones adjuntas, generalmente se consideran términos "abiertos" (p. ej., el término "que incluye" debe interpretarse como "que incluye, pero no se limita a", el término "que tiene" debe interpretarse como "que tiene al menos", el término "incluye" debe interpretarse como "incluye, pero no se limita a", etc.). Los expertos en la técnica entenderán además que, si se designa un número específico de una recitación de reivindicación introducida, dicha designación se mencionará explícitamente en la reivindicación, y en ausencia de dicha recitación no existe tal

designación. Por ejemplo, como ayuda para la comprensión, las siguientes reivindicaciones adjuntas pueden contener el uso de las frases introductorias "al menos una/o" y "una/o o más" para introducir recitaciones de reivindicación.

Se apreciará que varias realizaciones de la presente divulgación se han descrito en el presente documento con fines ilustrativos, y que se pueden realizar diversas modificaciones sin apartarse del alcance indicado por las siguientes reivindicaciones.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método para concentrar partículas diana en una muestra, que comprende las etapas de;
 - proporcionar un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico, comprendiendo dicho dispositivo;
 - al menos una primera área (2, 2', 2'') de captura que comprende una pluralidad de electrodos (5, 5') que, cuando se activan, atrapan partículas diana en su superficie, para capturar de manera selectiva y liberable partículas diana, dicha pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') se dispone de manera que una muestra que fluye a través de la primera área (2, 2', 2'') de captura fluiría sobre dicha pluralidad de electrodos (5, 5', 5''), y al menos una entrada (3, 3', 3''), en donde la al menos una entrada (3, 3', 3'') se divide en múltiples canales (14', 14''), donde cada canal (14', 14'') es de menor circunferencia que la al menos una entrada (3, 3', 3'');
 - una segunda área (6, 6', 6'') aguas abajo de la primera área (2, 2', 2'') de captura y en comunicación fluida con esta, siendo la segunda área (6, 6', 6'') de menor volumen que la primera área de captura y comprendiendo una segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a''), que, cuando se activan, atrapan partículas diana en su superficie para capturar partículas diana, dispuesta de manera que una muestra que fluye a través de la segunda área (6, 6', 6'') fluiría sobre la segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a'');
 - introducir una muestra en la primera área (2, 2', 2'') de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área (2, 2', 2'') de captura a una primera velocidad de flujo y con la primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') dispuesta para atrapar cualquier partícula diana;
 - liberar partículas diana atrapadas de la primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') para proporcionar una muestra enriquecida;
 - introducir la muestra enriquecida en la segunda área (6, 6', 6'') y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda área (6, 6', 6'') a una segunda velocidad de flujo que es inferior a la primera velocidad de flujo, y con la segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a'') dispuesta para atrapar partículas diana;
 - llevar a cabo más etapas de procesamiento.
2. Un método para concentrar partículas diana como en la reivindicación 1, en donde la etapa de introducir una muestra en la primera área (2, 2', 2'') de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área (2, 2', 2'') de captura en una primera velocidad de flujo con la primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') dispuesta para capturar dichas partículas, comprende introducir una muestra en la primera área (2, 2', 2'') de captura y hacer fluir la muestra a través de la primera área (2, 2', 2'') de captura a una primera velocidad de flujo y con los electrodos (5, 5', 5'') activados para atrapar las partículas diana y la etapa de liberar partículas diana atrapadas de la primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') para proporcionar una muestra enriquecida comprende desactivar los electrodos (5, 5', 5'') en la primera área (2, 2', 2'') de captura después de un período de tiempo para liberar las partículas diana atrapadas para proporcionar una muestra enriquecida y la etapa de introducir la muestra enriquecida en la segunda área (6, 6', 6'') y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda área (6, 6', 6'') a una segunda velocidad de flujo que es inferior a la primera velocidad de flujo, con la segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a'') capaces de atrapar partículas diana, comprende introducir la muestra enriquecida en la segunda área (6, 6', 6'') y hacer fluir la muestra enriquecida a través de la segunda área (6, 6', 6'') a una segunda velocidad de flujo que es inferior a la primera velocidad de flujo y con los electrodos (5a, 5a', 5a'') activados para atrapar partículas diana.
3. Un método para concentrar partículas diana como en la reivindicación 1 en donde los canales múltiples (14', 14'') son canales paralelos múltiples.
4. Un método para concentrar partículas diana como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde los canales múltiples (14', 14'') se unen en una salida (4, 4', 4'') de la al menos una primera área (2, 2', 2'') de captura.
5. Un método para concentrar partículas diana como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la al menos una entrada (3, 3', 3'') de la primera área (2, 2', 2'') de captura está provista de al menos una bifurcación (13', 13'') para dividirla en múltiples canales (14', 14'').
6. Un método para concentrar partículas diana como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, antes de liberar las partículas diana atrapadas en la primera área (2, 2', 2'') de captura, se hace fluir un tampón o medio fresco hacia la primera área (2, 2', 2'') de captura.
7. Un método para concentrar partículas diana como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores

en donde el procesamiento adicional incluye la desactivación de los electrodos (5a, 5a', 5a'') en la segunda área (6, 6', 6'') después de un período de tiempo para liberar células diana atrapadas para proporcionar una muestra enriquecida adicionalmente y llevar a cabo la extracción y/o amplificación del ácido nucleico.

8. Un método para concentrar partículas diana como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores

5 en donde los anticuerpos contra las partículas diana se introducen en la primera área (2, 2', 2'') de captura y/o la segunda área (6, 6', 6'').

9. Un método para concentrar células diana como en cualquiera de las reivindicaciones anteriores

en donde un dispositivo de detección óptica se dispone para detectar señales de la segunda área, y las partículas diana se visualizan usando la misma.

10 10. Un dispositivo microfluídico (1, 1', 1'') para concentrar partículas diana, tales como células diana, en una muestra, que comprende;

una primera área (2, 2', 2'') de captura, la primera área de captura comprende una primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') que, cuando se activan, atrapan partículas diana en su superficie para capturar partículas diana de forma selectiva y liberable, dicha primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5'') se dispone de manera que una muestra que fluye a través de la primera área (2, 2', 2'') de captura fluirá sobre dicha primera pluralidad de electrodos (5, 5', 5''), y al menos una entrada (3, 3', 3'') en donde dicha entrada (3, 3', 3'') está dividida en múltiples canales (14', 14''), donde cada canal es de menor circunferencia que la al menos una entrada (3, 3', 3'') de la primera área (2, 2', 2'') de captura;

una segunda área (6, 6', 6''), aguas abajo de la primera área de captura y en comunicación fluida con esta, la segunda área es de menor volumen que la primera área de captura y comprende una segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a'') que, cuando se activan, atrapan células diana en su superficie para capturar partículas diana, dispuesta de manera que una muestra que fluye a través de la segunda área (6, 6', 6'') fluirá sobre dicha segunda pluralidad de electrodos (5a, 5a', 5a'');

un módulo de control configurado para controlar la activación y desactivación de los electrodos;

25 medio de control de flujo para permitir que la velocidad de flujo a través de la segunda área (6, 6', 6'') sea menor que la velocidad de flujo a través de la primera área (2, 2', 2'') de captura.

11. Un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico como en la reivindicación 10 en donde los múltiples canales (14', 14'') son múltiples canales paralelos.

12. Un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico como en cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11 en donde los canales (14', 14'') múltiples se unen en la salida (4, 4', 4'') de la primera área (2, 2', 2'') de captura.

30 13. Un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico como en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 en donde la entrada (3, 3', 3'') de la primera área (2, 2', 2'') de captura está provista de al menos una bifurcación (13', 13'') para dividirla en múltiples canales (14', 14'').

14. Un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico como en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13 en donde el dispositivo (1, 1', 1'') comprende un módulo de control que está configurado para introducir flujo de tampón o medios frescos en la primera área (2, 2', 2'') de captura y/o segunda área (6, 6', 6'') cuando los electrodos en dicha primera área (2, 2', 2'') de captura o segunda área (6, 6', 6'') están desactivados.

15. Un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico como en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14 que comprende un dispositivo de detección óptica dispuesto para detectar señales de la segunda área (6, 6', 6''), en donde dicho dispositivo de detección óptica es capaz de detectar, y preferiblemente diferenciar o analizar, fluorescencia o en donde el dispositivo de detección óptico comprende una fuente de excitación y un detector.

16. Un dispositivo (1, 1', 1'') microfluídico como en cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15 en donde el dispositivo está provisto de un depósito de desechos (9) en comunicación fluida con la primera área (2, 2', 2'') de captura y/o la segunda área (6, 6', 6'').

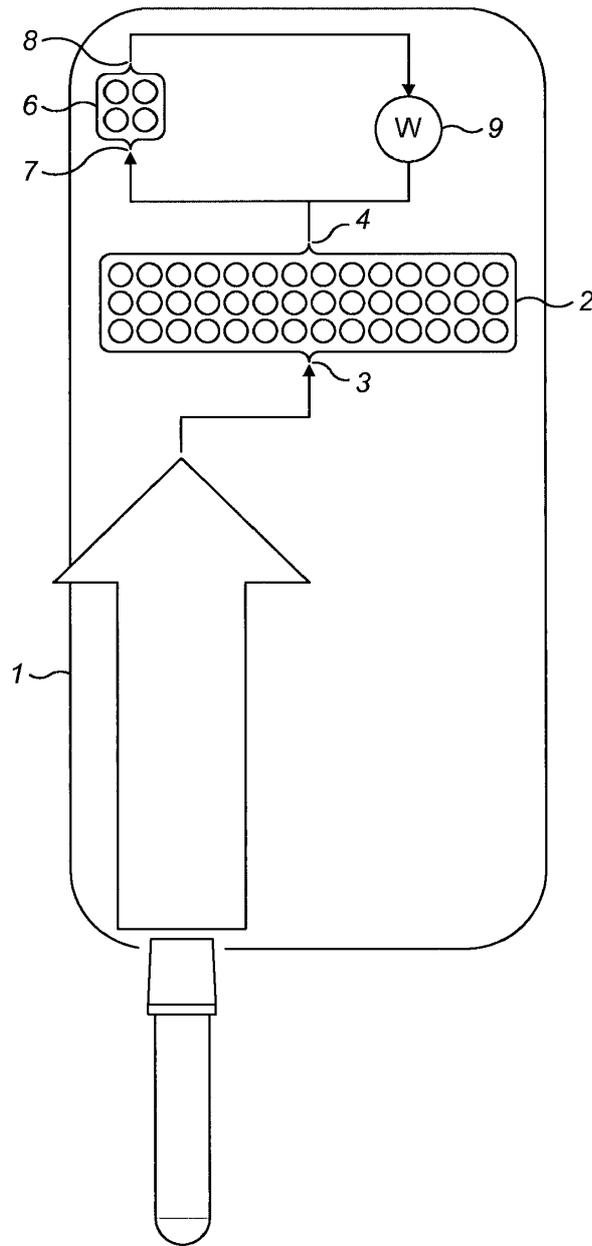


FIG. 1

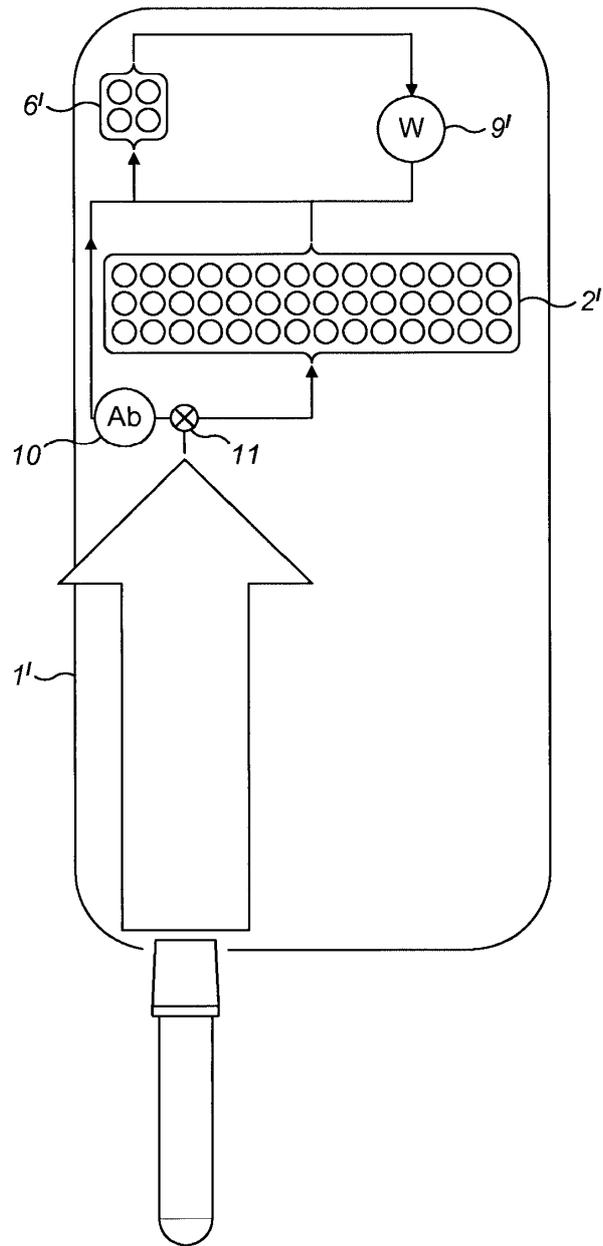


FIG. 2

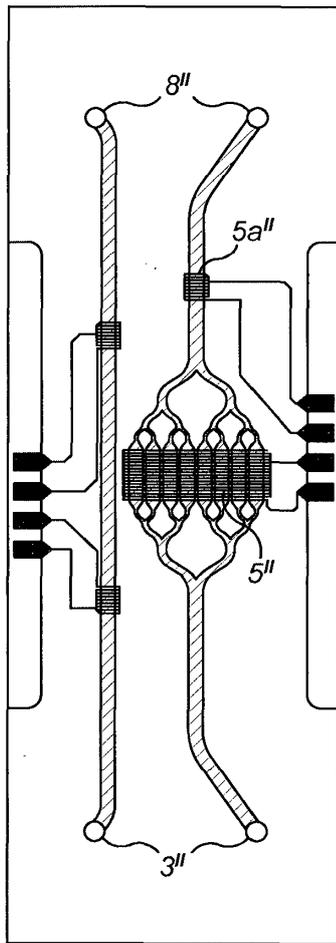


FIG. 3a

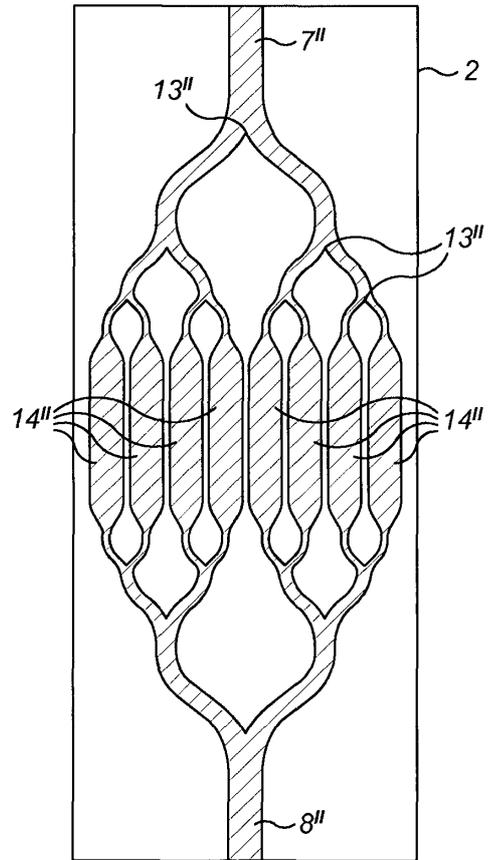


FIG. 3b

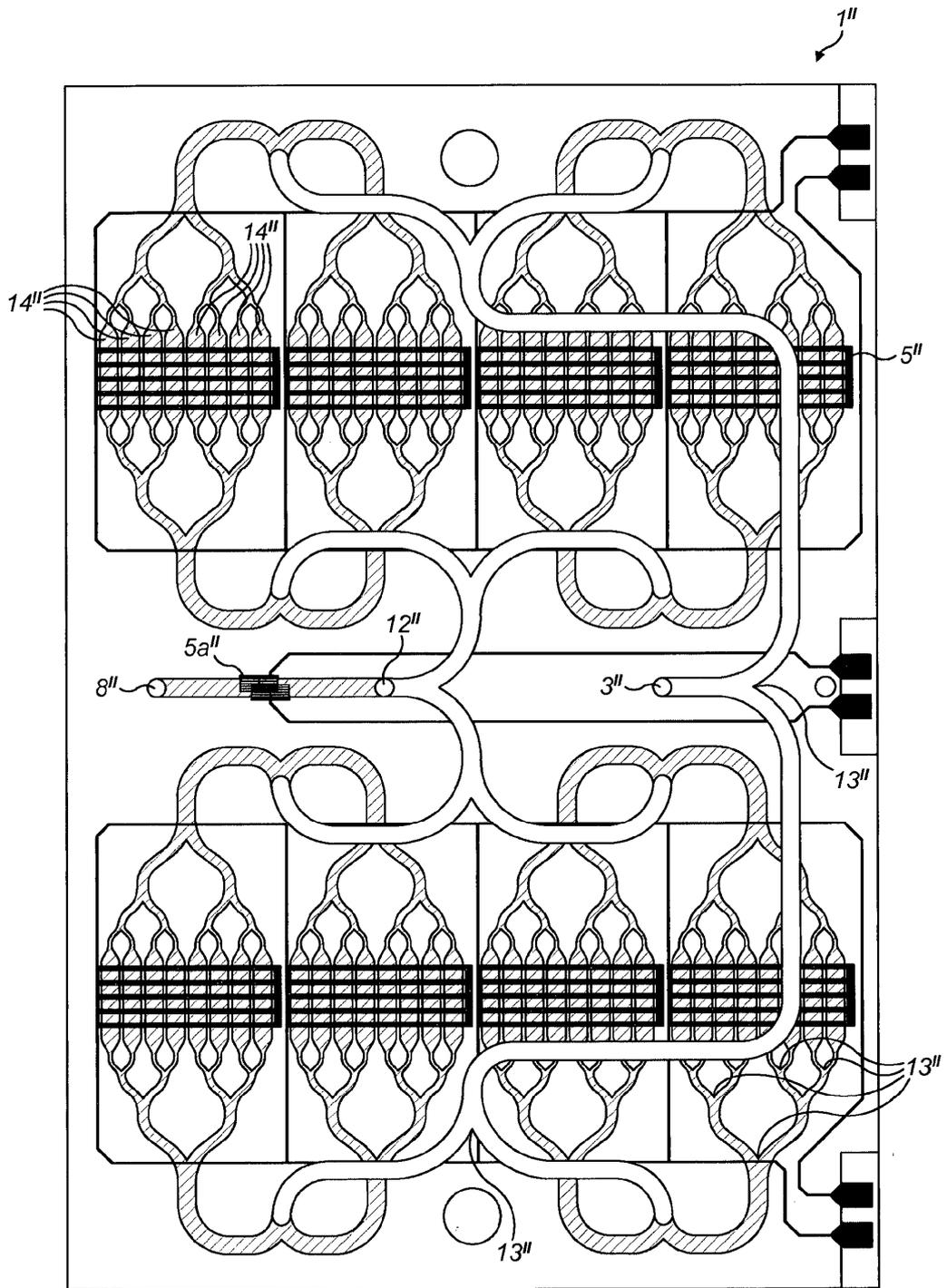


FIG. 4