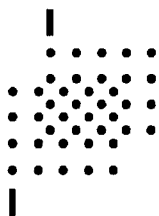


(19)



Lietuvos
Respublikos
valstybinis
patentų biuras

(10) **LT 6852 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(11) Patento numeris: **6852**

(51) Int. Cl. (2020.01): **B81B 7/00**

(21) Paraiškos numeris: **2020 006**

(22) Paraiškos padavimo data: **2020-01-27**

(41) Paraiškos paskelbimo data: **2021-08-10**

(45) Patento paskelbimo data: **2021-09-27**

(62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos numeris: —

(86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —

(85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —

(30) Prioritetas: —

(72) Išradėjas:

Daniel ZIMAREV, LT

(73) Patento savininkas:

Innovation Fort Ltd., Floor 1, Oliaji Trade Centre, Victoria, Mahe, SC-13, SC

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:

Daniel ZIMAREV, Paberžės g. 24-5, 07145 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:

Didelio lygiagretumo spartusis ląstelių skaitytuvas ir rūšiuklis

(57) Referatas:

Pristatomas dabartinis mikrofluidinio pumpavimo, pavienių ląstelių žymėjimo, maišymo, emulsifikacijos, inkubacijos, optinio sužadinimo, skaitymo ir rūšiavimo individualių komponentų technikos lygis. Toliau pateikiamas išradimo aprašymas parodo kaip šie komponentai apjungiami į vieną, keturių konfigūracijų sistemą, turinčią tris struktūrines ir funkcines inovacijas. Pirmą – intra ir inter lygiagrečią konstrukciją įgalinančią spartų ir plataus mastelio pavienių ląstelių skaitymą ir rūšiavimą. Antrą – dvigubos, lazerių dėka surinktos fluorescentinės-genetinės ir vizualinės-morfologinės informacijos sujungimą ir apdorojimą naudojant mašinų matymo ir mašinų mokymo algoritmus, ypač klasifikavimo ir sutelkimo. Trečią – inovatyvius maišymo, inkubavimo ir skaitymo-rūšiavimo komponentų konstrukcinius sprendimus.

TECHNIKOS LYGIS

Literatūroje minimos mažo pajėgumo ląstelių rūšiavimo sistemos. Taip pat yra informacijos apie individualias subsistemas: mikrofluidinio pumpavimo (P), ląstelių ir fluorescentinio žymeklio emulsifikacijos (E) bei skaitmeninės lazerinės spektroskopijos ir ląstelių rūšiavimo (R). Tačiau nėra precedento, integruotai intra- ir interlygiagrečiai, mašinų mokymo technologija pagrįstai pavienių ląstelių skaitymo ir rūšiavimo sistemai.

(P) US7842248B2, US7842248B2, EP1150013A2 apibūdina mikrofluidines pompas. Jos tinkamos nedidelio hidraulinio pasipriešinimo sistemoms pavieniuose lustuose, bet netinkamos kaip vienos įeigos pompos masyviai lygiagrečiom, aukšto hidraulinio pasipriešinimo, didelės našos sistemoms.

(E) Ląstelių genetinio kodo ženklimas yra standartinė procedūra. CN102344494B apibūdina fluorescentinę sistemą skirtą nikotinamidadenindinukleotido (NAD) fermentą koduojančių genų detekcijai. US9133499B2 apibūdina trijų mikrofluidinių kanalų (ląstelėms, žymekliui ir plovikliui) sąjungą skirtą ląstelių fluorescentiniam ženklinimui. US9689024B2 apibūdina DNR ženklavimo procedūrą šulinėliuose. US6608189B1 naudoja žalią fluorescentinį baltyminį dažą optiniam pH lygio matavimui skirtingose ląstelės dalyse. US20150154352A1 apibūdina karoliukų naudojimą DNR/RNR kodavimui. AU2011295722A1 kalba apie ląstelių DNR/RNR segmentų dažymą, siekiant spektroskopijos dėka atskirti vėžines ląsteles nuo sveikų.

Emulsijų (įskaitant ląstelių lašeliuose) mikrofluidinis formavimas taip pat yra standartinė, nors ir palyginti nauja, procedūra. US20100018584A1 ir JP2009536313A naudoja klasikinės + ir T formos mikrofluidines jungtis vandens-aliejuje lašelių generavimui. CN104321652A apibūdina trisluoksnį srautą ABA. Lazeris sukelia ertmės formavimąsi pirmajam sluoksnyje A. Ertmė išstumia lašelį iš antrojo sluoksnio B tiesiai į trečiąjį sluoksnį A. WO2014151658A1 apibūdina panašų principą, bet dvisluoksniame sraute. WO2015164212A1 kalba apie ląstelių genetinės informacijos ženklinimą ir apgaubimą lašeliuose. US20140113347A1 kalba apie biopolimerų naudojimą ląstelių apgaubimui.

Bendra ląstelių genetinės medžiagos ženklavimo ir apgaubimo lėtumo problema yra limituotas vieno nelygiagretaus kanalo naudojimas.

(R) CA2484336C kalba apie keturių skirtingų fluorescentinių dažų pritvirtinimą prie keturių skirtingų DNR bazių (A, C, G ir T), kurias vėliau galima atskirti optinio sensoriaus dėka po argono lazerio aktyvavimo; tokiu būdu kuriant geno variacijų biblioteką. EP3409791A1 ir US5595900A aptaria genų sekų bibliotekų paruošimą. Šios bibliotekos tampa naudingos ląstelių identifikacijai.

US7214298B2 pristato paprastą vieno mikrofluidinio lusto fluorescencijos detekcijos la-zeriu 2-takų ląstelių rūšiuklį. US20110065143 naudoja fluorescencijos detekcijos lazerį kamieninių ląstelių skaitymui, regeneratyvinės medicinos taikymams. US8936762B2 naudoja mikrofluidinį, vizualinį-morfologinį ląstelių skaitymą lazeriu. US9186643B2 naudoja mikrofluidinį lašelių rūšiavimą in vitro evoliucijai.

IŠRADIMO APRAŠYMAS

Pirmoji kartinė prietaiso inovacija – didelio intra- ir interlygiagretumo konstrukcija. Tai užtikrina greitą ląstelių skaitymą ir rūšiavimą – būtiną aspektą sėkmingam mikrofluidinės rūšiavimo technologijos komercializavimui.

Farmacinė antikūnių inžinerija ir atranka – viena iš prietaiso taikymo sričių. Analogiškai tranzistorių skaičiaus ploto vienetui augimui kompiuterių inžinerijoje, biomedicinos inžinerijoje pastebimas antikūnių testų laiko vienetui skaičiaus augimas. 90-taisiais rankiniu būdu buvo įmanoma padaryti 10^3 testų per savaitę. Robotikos taikymas padidino šį skaičių iki 10^7 . Išradime siūloma didelio lygiagretumo mikrofluidinė konstrukcija atveria duris tolimesniam testavimo greičio augimui.

Mikrofluidikos naudojimas taip pat sumažina reikalingą mėginių ir reagentų kiekį; klinikinėje aplinkoje tai reiškia mažesnį kraujo mėginių dydį.

Tradiciniuose FACS (angl. *fluorescence activated cell sorting*) ląstelių rūšiukliuose lašelius generuojantis purkštukas gali išskirti sveikatai pavojingus aerozolius. Šis išradimas naudoja alternatyvų, saugesnį, mikrofluidinį lašelių generacijos procesą.

Toliau apibūdinami individualūs prietaiso moduliai ir jų konfigūracijos: (P) pumpavimas, (E) emulsifikacija, (I) inkubacija ir (R) skaitymas-rūšiavimas.

(P) Numatomi dviejų tipų pumpavimo moduliai: P_{k+1} ir $P_{k+1:n}$. Skirtingos pompos reikalingos skirtingoms prietaiso konfigūracijoms; P_{k+1} (dar žymima PM_{k+1} , kad pabrėžti mėginio buvimą) naudojama konf. A (pav. 2) ir C (pav 3), o $P_{k+1:n}$ – B

(pav. 2) ir D (pav. 3). k atspindi mėginių skaičių (tai ląstelės ir reagentai), kurie susimaišo emulsijos komponente (žiūrėti pav. 1, detales A1 ir A2); kiekvienam reagentui stumti reikalinga atskira pompa. "+1" atspindi faktą, kad (tolimesnėje "+" formos jungtyje) reikalingas nuolatinis aliejaus srautas atskirti ląsteles į individualius lašius (dar viena pompa). Matyti, kad minimalus pompų skaičius trys, bet, priklausomai nuo pasirinkto ląstelių žymėjimo protokolo, žymių skaičiaus, amplifikacijos protokolo ir plovimo buferio naudojimo, gali būti didesnis. $P_{k+1:n}$ modulis yra $(k + 1)$ viename tipo. Tai yra viename modulyje yra $k + 1$ būtinos pompos, o n nurodo inter-lygiagrečios modulio sekos numerį (čia apribojimų nėra; didesniame našumui pasiekti naudojama daugiau modulių). Raidė m žymi intralygiagretumo Nr. P_{k+1} tipo pompos yra galingesnės, nes turi dirbti su dideliu hidrauliniu pasipriešinimu visoje sistemoje (keliuose lygiagrečiuose moduluose). $P_{k+1:n}$ tipo pompos mažesnio galingumo, nes reikia įveikti tik hidraulinį pasipriešinimą viename modulyje. P_{k+1} – tai pavienis vieno švirkšto (vieno mėginio) arba dviejų švirkštų (nuolatiniam mėginio pumpavimui) modulis. $P_{k+1:n}$ vietos taupumo sumetimais alternatyviai naudojami m peristaltiniai, elektroosmotiniai, pulsuojuojantys arba centrifuginiai pumpavimo vienetai (pav. 2, detalė B1). Dėl mažesnio slėgio reikalavimo galima ir mikrofluidinė pompos versija.

Brėžiniuose taip pat naudojamos raidės M – tai mėginys (konfigūracijos B ir D) – ir J – jungtis (konfigūracijos A ir C).

(E) E_n – tai emulsifikacijos modulis, susidedantis iš smulkesnių m paralelių e_m funkcinių vietų. Pav. 1, detalė 1 nurodo įvesties kanalus su pasirenkamais mikrofluidiniais filtrais. Paprasčiausias konstrukcijos variantas naudoja tris įvestis ir vieną išvestį. Pirmos dvi įvestys – vienoje ląstelės, kitoje FISSEQ (angl. *fluorescent in situ sequencing*) reagentų kokteilis – keliauja iki pirmosios jungties. Susiformavęs mišinys tuomet juda iki antrosios jungties, kurioje aliejus iš trečiosios įvesties atskiria pavienius ląsteles apgaubiančius lašelius – procesas iliustruotas pav. 1, detalėje A1. Išvestis naudojama aliejaus pašalinimui. Bet tai tik minimalus pavyzdys – pav. 1, detalė A2 parodo, kad struktūriškai gali būti naudojama iki k įvesčių.

Lašeliai tuomet keliauja į gyvatinį inkubacinį modulį I_n , turintį m gyvatukų. Geometrija mechaniškai skatina maišymąsi (reagentų ir ląstelės sąveiką lašelio viduje) ir leidžia inkubacijos laiko kontrolę, o Peltier plokštė – termoelektrinę reakcijos temperatūros kontrolę, ir tokiu būdu – reakcijos greitį.

Skaitymo-rūšiavimo modulyje R_n tęstinės bangos lazeris (pav. 1 detalė B, žymė 3) sužadina fluorescentinį mitochondrijos COI (angl. *cytochrome oxidase subunit 1*) geno dažą. Sužadinimas sukelia specifinio bangos ilgio šviesą, kurią pagauna optinis sensorius (pav. 1, detalė B, žymė 4). Surinkta informacija atspindi unikalią seką susidedančią iš pasikartojančių A,C,G arba T bazių. Duomenų apdorojimo blokas (DAB) šią seką patikrina tarp jau egzistuojančių duomenų bazėje; procesą palengvina mašinų mokymo klasifikacijos algoritmas. Titano safyro pulsuojančio lazerio (pav. 1 detalė B, žymė 5) sugeneruotas ir toliau modifikuotas šviesos pluoštas pereina per ląstelę pagaudamas jos individualią vizualinę-morfologinę informaciją. Ši informacija pasiekia detektorių (pav. 1, detalė B, žymė 6), kur toliau DAB apdorojama mašinų matymo ir mašinų mokymo giliųjų tinklų algoritmais.

Vartotojas turi galimybę iš anksto nustatyti kokio tipo ląsteles nori pagauti. Taip pat galimas ir laisvas režimas, kurio metu sistema nuskanuoja ir surenka informaciją apie potencialiai tūkstančius mėginyje esančių ląstelių tipų. DAB tuomet jas sugrupuoja pagal panašumą į kategorijas. Šiam ląstelių grupavimui pagal panašumą taikomi inovatyvūs mašinų mokymo laisvo ir specifikuoto sutelkimo metodai. Taip galima kurti naujas tipų bibliotekas; arba tiesiog fiziškai rūšiuoti ląsteles.

Šie trys pilioriai: (i) fluorescentinės-genetinės informacijos surinkimas, (ii) vizualinės-morfologinės informacijos surinkimas ir (iii) surinktos informacijos apdorojimas mašinų mo-kymo algoritmais – antroji kartinė prietaiso inovacija.

Rūšiavimas vyksta asimetrinėje "žuvies kaulo" formos mikrofluidinėje-dielektroforezinėje (pav. 1, detalė C1) arba mikrofluidinėje-optoelektroninėje (pav. 1, detalė C2) komponento konstrukcijoje. Pavienė ląstelė sužadinama lazerio, jos skleidžiamos šviesos bangų informacija, apdorota anksčiau paminėtais metodais, atskleidžia jos tipą. Ji keliauja "stuburo" kanalėliu ir priklausomai nuo tipo yra nukreipiama į vieną iš atšakų. Nukreipimas vyksta vienu iš dviejų mechanizmų. Pirmajame po kiekvieną iš atšakų yra du elektrodai išlendantys iki pat stuburo kanalo išorinės sienos. Juos aktyvavus, elektrinio lauko dėka ląstelė nukreipiama į atšakos kanalą. Antrasis mechanizmas naudoja lazerį, kuris sukuria nuožulnų "/" formos optinį barjerą stuburo kanale ir nukreipia ją į atšakos kanalą.

Galiausiai surūšiuotos ląstelės per išvestis (pav. 1, pažymėtos 2-etu) keliauja

iš R_n modulių į vieną apjungiantį surinkimo modulį S su šulinėlių plokšte (žiūrėti pav. 2 ir pav. 3). Surinkimo modulis turi keletą konfigūracijų: gali turėti standartinę 98-ių šulinėlių plokštę, mažesnio šulinėlių skaičiaus plokštę didelio tūrio mažos variacijos surinkimui, arba didesnio skaičiaus – mažo tūrio didelės variacijos surinkimui. Jeigu taikymo procesas ciklinis, pvz., kaip nukreipta evoliucija, atrinktos naudingos ląstelės gali būti atgal nukreipiamos į skaitymo ir rūšiavimo modulį.

Prietaisas turi keturias konfigūracijas. Pirmojoje (pav. 2, A1 ir A2) $k+1$ didelio galingumo pompos su mėginiais (k ląstelėms ir ženklavimo reagentams – dažniausiai dvi arba trys – ir 1-na aliejui) įsistato iš kairės pusės į jungtį J . Iš dešinės jungties pusės įsistato n (priklausomai nuo našos reikalavimo) lygiagrečių integruotų mikrofluidinių emulsijos-inkubacijos-rūšiavimo EIR modulių. Galiausiai modulius apjungia ląstelių surinkėjas S . Antroji (pav. 2, B1 ir B2) konfigūracija prasideda nuo mėginio modulio į kurį įsistato (pagal našos reikalavimą) n mažesnio galingumo integruotų ($k + 1$ viename) pompų. Prie kiekvienos iš jų prisijungia po vieną integruotą EIR modulį. Kaip ir pirmojoje konfigūracijoje, juos apjungia surinkėjas S su šulinėlių plokšte. Trečioji (pav. 3, C1 ir C2) ir ketvirtoji (pav. 3, D1 ir D2) konfigūracijos tokios pats kaip pirmoji ir antroji, išskyrus tai, kad vietoje vieno integruoto lusto, egzistuoja trys savarankiški mikrofluidiniai emulsijos, inkubacijos ir rūšiavimo komponentai.

Šalia greičio ir aukštos duomenų kokybės komercinei sėkmei taip pat svarbus paprastas naudojimo protokolas, todėl konfigūracijose A ir B (pav. 2) E_n , I_n ir R_n apjungti į vieną EIR_n modulį. Išmanesniems vartotojams skirtos antrinės konfigūracijos C ir D (pav. 3), kuriose moduliai atskiri, leidžiantys individualaus pritaikymo laipsnį.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Didelio lygiagretumo spartusis pavienių ląstelių skaitymo ir rūšiavimo prietaisas, charakterizuojamas tuo, kad turi keturias skirtingas konstrukcijas, susidedančias iš pumpavimo bei mikrofluidinių emulsifikacijos, inkubacijos ir skaitymo-rūšiavimo komponentų sąjungos.

2. Prietaiso pagal 1 punktą vienas iš kertinių atributų – komponentų vidinis ir išorinis lygiagretumas.

3. Prietaiso pagal 1 punktą, mikrofluidiniai komponentai gaminami ne tik iš tradicinio polidimetilsiloksano, bet ir patvaresnių borosilikato stiklo, arba kvarco; medžiagos nėra maišomos.

4. Prietaiso pagal 1 punktą emulsifikacijos komponente pavienės ląstelės patalpinamos į lašelius ir taikomas jų fluorescentinis ženklavimas.

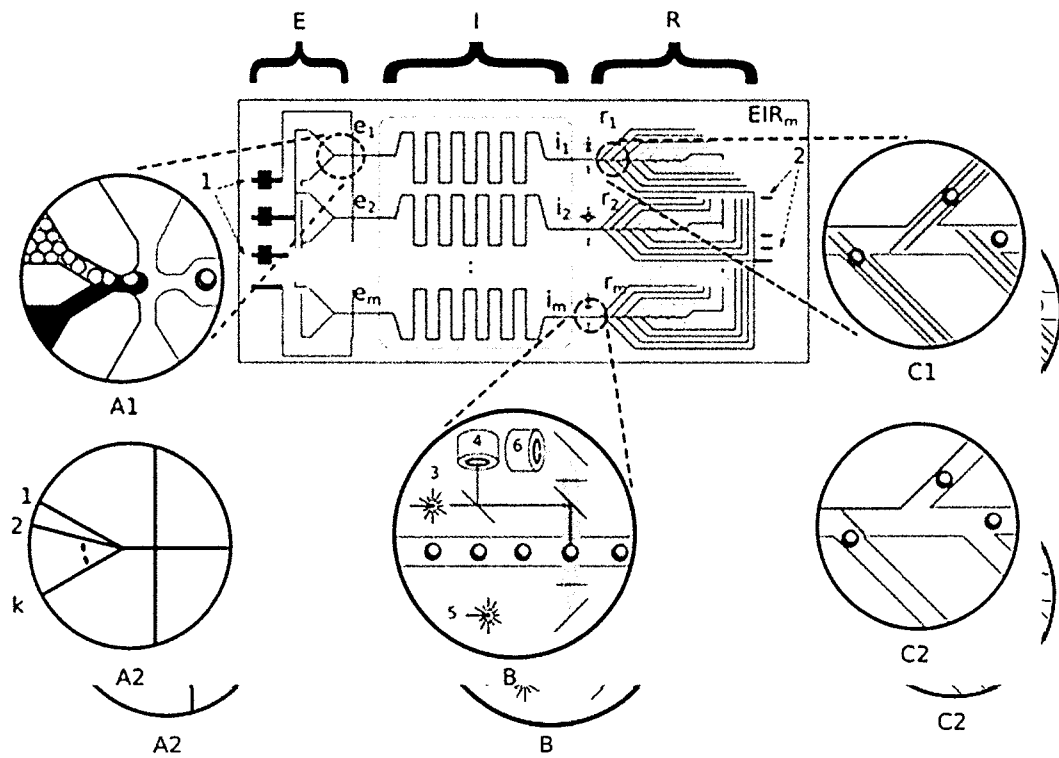
5. Prietaiso pagal 1 punktą, tiek integruota, tiek atskira, mikrofluidinė-termoelektroninė inkubatoriaus komponento konstrukcija, susidedanti iš lygiagrečių serpentino kanalų, ir po jais esančios termoelektrinės plokštės.

6. Prietaiso pagal 1 punktą skaitymo-rūšiavimo komponentas apima : (i) tęstinės bangos lazerį ir individualių ląstelių fluorescentinės genetinės sekos detektorius, (ii) titano-safyro pulsuojantį lazerį ir individualių ląstelių vizualinės-morfologinės informacijos detektorius, (iii) informacijos apdorojimo bloką, pagrįstą mašinų matymo giliųjų tinklų technologija, klasifikavimo technologija ir laisvojo ir specifikuoto sutelkimo technologija.

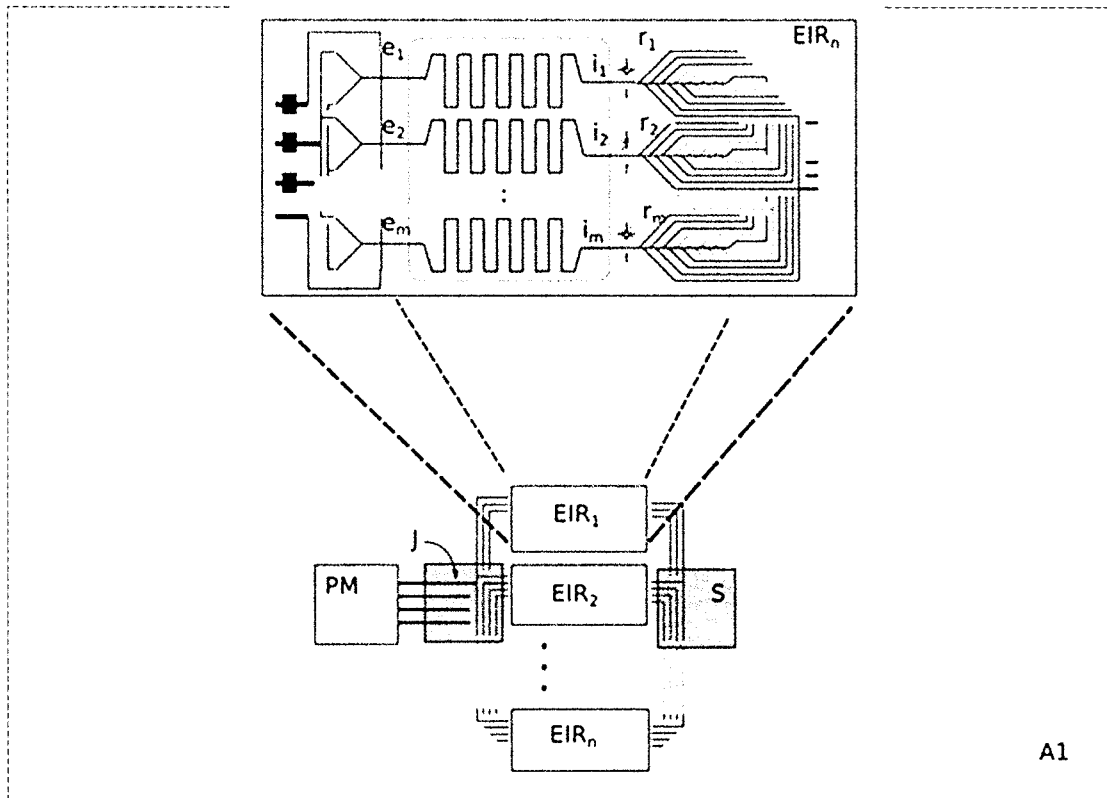
7. Komponento pagal 6 punktą paskutinis subkomponentas (iv) apdorotos informacijos taikymas asimetrinėje "žuvies kaulo" formos mikrofluidinėje-

dielektroforetinėje ir mikrofluidinėje-optoelektroninėje konstrukcijoje, įgalinančioje daugiakelinį ląstelių rūšiavimą.

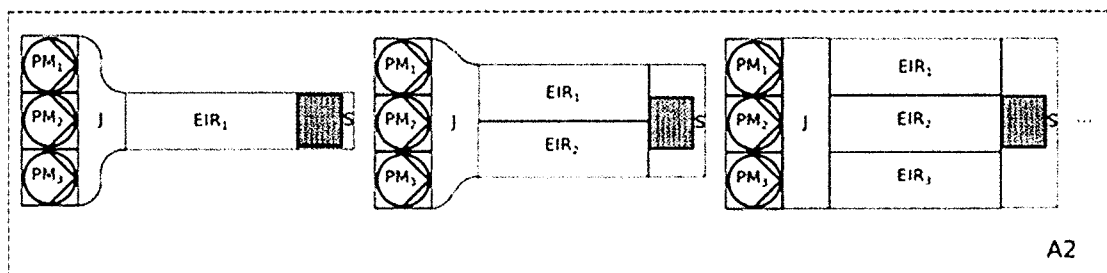
8. Prietaisas pagal 2, 6 ir 7 punktus naudojamas greitam, didelio pajėgumo ir tiksliam pavienių ląstelių esančių ląstelių skaitymui ir rūšiavimui farmacinėje antikūnių atrankoje, antikūnių taikančių vėžines ląsteles atrankoje, vėžinių ląstelių rūšiavime, retų ląstelių izoliacijoje, vėžiui atsparių ląstelių detekcijoje, kamieninių ir progenitorinių ląstelių izoliacijoje, ląstelių rūšiavime pagal genotipą ir pagal fenotipą, genotipo-fenotipo ryšio nustatyme, tipų bibliotekų kūrimo ir nukreipto fermentų evoliucijoje.



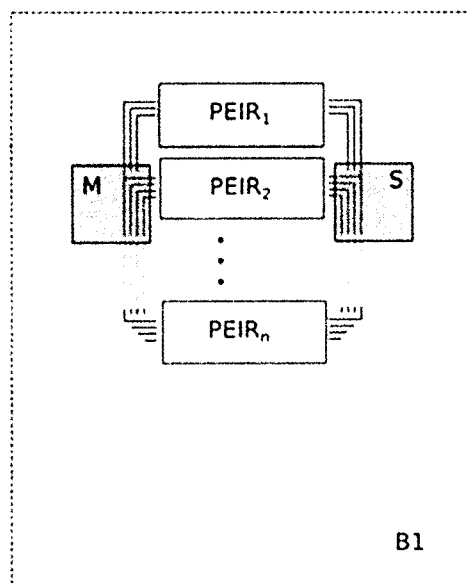
Pav. 1



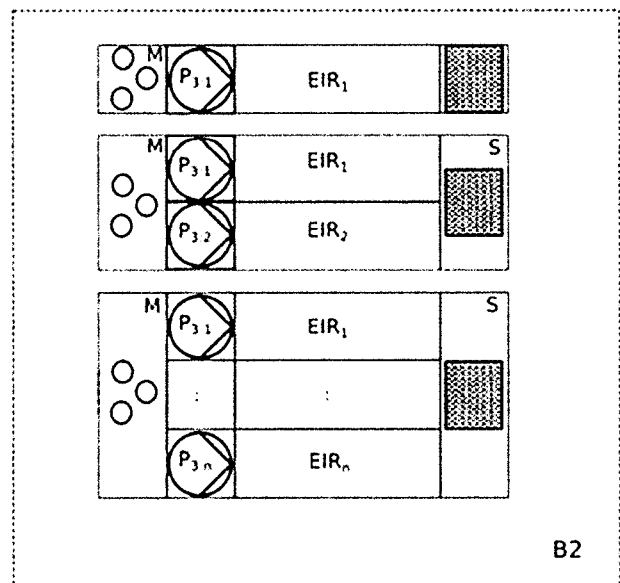
A1



A2



B1



B2

