

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092390** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.14

(22) Дата подачи заявки
2019.04.04

(51) Int. Cl. **B01L 3/00** (2006.01)
A61B 17/00 (2006.01)
A61D 19/00 (2006.01)
A61D 19/02 (2006.01)
A61D 19/04 (2006.01)
C12M 3/00 (2006.01)

**(54) МИКРОФЛЮИДНЫЕ СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДЕНУДАЦИИ ООЦИТОВ
МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

(31) **62/652,648; 62/732,884**

(32) **2018.04.04; 2018.09.18**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/025895**

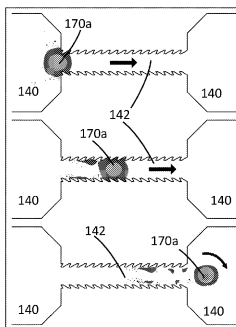
(87) **WO 2019/195620 2019.10.10**

(71) Заявитель:
**ДЗЕ ДЖЕНЕРАЛ ХОСПИТАЛ
КОРПОРЕЙШН (US)**

(72) Изобретатель:
**Вэн Линьдун, Ли Глория И., Тонер
Мехмет (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Микрофлюидные системы выполнены с возможностью обработки образцов жидкости, содержащих комплексы ооцит-кумюлюс (КОК), например, необработанную фолликулярную жидкость, в автоматизированном и непрерывном режиме, чтобы продуцировать ооциты, отделенные или "очищенные" от окружающих кумюлюсных клеток. Системы включают в себя субстрат и канал, который может иметь два или более подканалов. Каждый канал включает в себя входное отверстие, выходное отверстие, а также одно или более звеньев, расположенных последовательно. Каждое из звеньев включает в себя один или более расширительных блоков и один или более ограничительных блоков. По меньшей мере одно звено включает в себя ограничительные блоки, имеющие зубчатые внутренние поверхности, например зубцы, помогающие удалять кумюлюсные клетки из КОК.



A1

202092390

202092390

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565239ЕА/042

МИКРОФЛЮИДНЫЕ СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ ДЕНУДАЦИИ ООЦИТОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка имеет приоритет по предварительной заявке на патент США под порядковым номером 62/732,884, зарегистрированной 18 сентября 2018 г., и предварительной заявке на патент США под порядковым номером 62/652,648, зарегистрированной 4 апреля 2018 г. Полное содержание обеих предшествующих заявок включено в настоящее описание путем ссылки.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вспомогательная репродуктивная технология (ВРТ), такая как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО), может использоваться для лечения бесплодия или решения проблем наследственности, а также содействия в зачатии ребенка. В процессе ЭКО зрелые яйцеклетки (ооциты) могут извлекаться из яичников и оплодотворяться спермой в лабораторных условиях. Затем оплодотворенные яйцеклетки, известные как эмбрион, могут имплантироваться в матку. ЭКО содержит несколько этапов: стимуляцию овуляции, извлечение ооцитов, забор спермы, оплодотворение и перенос эмбриона. При проведении традиционного ЭКО яйцеклетки помещают в лабораторную чашку в культуральные среды вместе с приготовленной спермой, где позволяют яйцеклеткам спонтанно оплодотворяться в течение ночи.

Интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ) может отличаться от традиционного ЭКО тем, что в каждую яйцеклетку под микроскопом может отдельно вводиться единственный сперматозоид с помощью крошечной иглы. ИКСИ признана единственным способом лечения мужского бесплодия. Для эффективного проведения процедур ИКСИ денудация ооцитов перед микроинъекцией может оказаться важной, поскольку ооциты могут быть окружены несколькими слоями специализированных клеток гранулезы (кумулюсных клеток), образующих комплекс ооцит-кумулюс (КОК). При проведении обычных клинических манипуляций ооциты могут подвергаться денудации с использованием сочетания энзиматического (с применением гиалуронидазы) и механического (пипетирования вручную) способов, для выполнения которых может потребоваться квалифицированный персонал.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном раскрытии предложены микрофлюидные системы для очистки ооцитов от окружающих клеток кумулюса и короны с перспективой широкого применения в области вспомогательной репродукции человека. Системы включают в себя один или более каналов, имеющих повторяющиеся ограничительные блоки и расширительные блоки. Вообще, образцы, содержащие КОК, либо набор одних только КОК в буферной или иной жидкости, либо необработанную фолликулярную жидкость из организма пациента, содержащую КОК, сгустки крови и остатки тканей различных размеров,

вводятся во входной порт системы, причем когда образец поступает через канал или каналы системы, ограничительные блоки и расширительные блоки работают совместно, чтобы способствовать денудации ооцитов. Например, ограничительные блоки могут содержать особенности поверхности, например зубчатые или гладкие внутренние поверхности, для прикладывания механических напряжений к КОК. В некоторых вариантах реализации расширительные блоки способствуют переворотам КОК, когда они «пробираются» через систему. В некоторых вариантах осуществления системы выполнены таким образом, что достигается непрерывный поток КОК.

В одном аспекте в настоящем раскрытии предложены системы для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток. Системы включают в себя субстрат, а также канал либо два или более подканалов. Каждый канал включает в себя входное отверстие, выходное отверстие, а также одно или более звеньев, расположенных последовательно в канале. Каждое звено из одного или более звеньев сообщается по текучей среде с последующим звеном. Каждое из одного или более звеньев включает в себя один или более расширительных блоков и один или более ограничительных блоков. По меньшей мере, одно звено из одного или более звеньев включает в себя один или более ограничительных блоков, имеющих две противоположные стенки. Одна или каждая из противоположных стенок включает в себя зубчатую поверхность, обращенную внутрь канала. Зубчатая внутренняя поверхность включает в себя множество зубцов, расположенных так, что множество зубцов на первой противоположной стенке направлены к множеству зубцов на второй противоположной стенке. Кончики множества зубцов на первой противоположной стенке расположены на одинаковом расстоянии от кончиков множества зубцов на второй противоположной стенке, например, зубцы расположены параллельно.

В другом аспекте в раскрытии предложены системы для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток, которые включают в себя субстрат; а также канал, имеющий входное отверстие, выходное отверстие, а также одно или более звеньев, расположенных последовательно между входным отверстием и выходным отверстием, при этом каждое звено сообщается по текучей среде с последующим звеном, при этом включает в себя один или более расширительных блоков и один или более ограничительных блоков, при этом, по меньшей мере, одно из звеньев включает в себя один или более ограничительных блоков, каждый из которых имеет две противоположные стенки, при этом, по меньшей мере, одна из двух противоположных стенок содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов.

В некоторых вариантах осуществления каждая из двух противоположных стенок в каждом ограничительном блоке содержит множество зубцов, при этом множество зубцов на первой противоположной стенке направлены к множеству зубцов на второй противоположной стенке. Например, кончики множества зубцов на первой противоположной стенке и кончики множества зубцов на второй противоположной стенке могут располагаться параллельно, при этом расстояние между кончиками зубцов на

первой и второй противоположных стенках может составлять величину, примерно равную диаметру ооцита, подлежащего денудации.

В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, одно из звеньев включает в себя один или более расширительных блоков, чередующихся с одним или более ограничительными блоками.

В некоторых вариантах осуществления один или более из множества зубцов, например все зубцы, установлены под углом от около 30 градусов до около 90 градусов к направлению потока через канал.

В различных вариантах осуществления, по меньшей мере, одно звено из одного или более звеньев включает в себя один или более ограничительных блоков, имеющих гладкую внутреннюю поверхность. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один расширительный блок имеет ширину от около 250 до около 600 микрон и/или, по меньшей мере, один ограничительный блок имеет ширину от около 100 до около 350 микрон.

В другом аспекте в раскрытии предложены системы для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток, которые включают в себя субстрат и канал, который включает в себя входное отверстие, выходное отверстие, а также три звена, расположенных последовательно, при этом каждое звено сообщается по текучей среде со следующим звеном, при этом первое звено содержит группу первых расширительных блоков, чередующихся с первыми ограничительными блоками, при этом первые расширительные блоки имеют первую ширину, а первые ограничительные блоки имеют вторую ширину, а также гладкую внутреннюю поверхность; при этом второе звено содержит группу вторых расширительных блоков, чередующихся со вторыми ограничительными блоками, при этом вторые расширительные блоки имеют третью ширину, а вторые ограничительные блоки имеют четвертую ширину, а также гладкую внутреннюю поверхность; при этом третье звено содержит группу третьих расширительных блоков, чередующихся с третьими ограничительными блоками, при этом третьи расширительные блоки имеют пятую ширину, а третьи ограничительные блоки имеют шестую ширину, а также, по меньшей мере, две противоположные стенки, при этом каждая из двух противоположных стенок содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов, расположенных так, что множество зубцов на первой противоположной стенке третьих ограничительных блоков направлены к множеству зубцов на второй противоположной стенке третьих ограничительных блоков, при этом кончики множества зубцов на первой противоположной стенке и кончики множества зубцов на второй противоположной стенке расположены параллельно.

В определенных вариантах осуществления систем, представленных в настоящем описании, канал имеет высоту около 200-300 микрон. В некоторых вариантах осуществления зубцы установлены под углом от около 30 градусов до около 90 градусов к направлению потока через канал.

В определенных вариантах осуществления первая ширина может составлять от

около 250 до около 600 микрон, например 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 микрон. Первая ширина может составлять около 500 микрон. Вторая ширина может составлять от около 200 до около 350 микрон, например 200, 225, 250, 275, 300, 325 или 350 микрон. Вторая ширина может составлять около 230-260 микрон, например 235, 240, 245, 250, 255 или 260 микрон. Третья ширина может составлять от около 250 до около 600 микрон с возможными размерами, приведенными выше. Третья ширина может составлять около 500 микрон, например 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550 или 600 микрон. Четвертая ширина может составлять от около 100 до около 250 микрон, например 100, 125, 150, 175, 200, 225 или 250 микрон. Четвертая ширина может составлять от около 130 до около 160 микрон, например 130, 135, 140, 145, 150, 155 или 160 микрон. Пятая ширина может составлять от около 250 до около 600 микрон с возможными размерами, приведенными выше. Пятая ширина может составлять около 500 микрон, например 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550 или 600 микрон. Шестая ширина может составлять от около 70 до около 120 микрон, например 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 или 120 микрон. Шестая ширина может составлять от около 90 до около 120 микрон, например 95, 100, 105, 110, 115 или 120 микрон.

В определенных вариантах осуществления первая ширина составляет около 500 микрон, вторая ширина составляет около 230-260 микрон, третья ширина составляет около 500 микрон, четвертая ширина составляет от около 130 до около 160 микрон, пятая ширина составляет около 500 микрон, шестая ширина составляет от около 90 до около 120 микрон, а расстояние между кончиками зубцов составляет от около 90 до около 110 микрон.

В другом аспекте в данном раскрытии предложены системы для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток в жидком образце, которые включают в себя субстрат; а также канал, имеющий входное отверстие, выходное отверстие, а также одно или более звеньев, расположенных последовательно между входным отверстием и выходным отверстием, при этом каждое звено сообщается по текучей среде с последующим звеном, при этом каждое звено содержит один или более рядов из множества стоек, расположенных поперек канала, при этом стойки в заданном ряду разнесены от соседних стоек в этом ряду для образования подканала между каждой соседней парой стоек, при этом каждая из множества стоек, по меньшей мере, в одном звене включает в себя пару стенок, выполненных с возможностью быть обращенными либо к противоположной стенке соседней стойки в том же ряду, либо быть обращенными к внутренней стенке канала, при этом, по меньшей мере, одна из стенок на каждой из множества стоек содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов.

В некоторых вариантах осуществления каждая из противоположных стенок соседних стоек в ряду включает в себя множество зубцов, выполненных с возможностью быть направленными друг к другу. В различных вариантах осуществления, по меньшей мере, один подканал первого звена имеет ширину около 240-260 микрон, при этом первое

звено включает в себя ряды стоек, выполненных с возможностью отфильтровывать дебрис из образца текучей среды. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере, один подканал второго звена имеет ширину около 140-160 микрон, при этом второе звено включает в себя ряды стоек, выполненных с возможностью отфильтровывать дебрис из образца текучей среды. В определенных вариантах осуществления, по меньшей мере, один подканал в третьем звене имеет ширину около 90-110 микрон, при этом третье звено включает в себя ряды стоек, выполненных с возможностью денудации ооцитов, при этом одна или более стоек в каждом ряду включает в себя множество насеченных зубцов.

В некоторых вариантах осуществления все стойки в третьем звене включают в себя пару стенок, выполненных с возможностью быть обращенными либо к противоположной стенке соседней стойки в том же ряду, либо быть обращенными к внутренней стенке канала, при этом каждая из стенок на каждой из стоек в третьем звене включает в себя зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов.

В определенных вариантах осуществления все подканалы первого звена имеют первую ширину, а все подканалы второго звена имеют вторую ширину, которая меньше, чем первая ширина. В некоторых вариантах осуществления все подканалы третьего звена имеют третью ширину, которая меньше второй ширины.

В другом аспекте в раскрытии предложены способы удаления кумулюсных клеток с ооцитов в образце жидкости. Способы включают в себя получение образца жидкости, содержащего один или более ооцитов; введение образца жидкости во входное отверстие любой из систем, представленных в настоящем описании; создание потока образца жидкости через одно или более звеньев канала с некоторой скоростью течения; а также извлечение ооцитов из выходного отверстия.

В определенных вариантах осуществления этих способов образец жидкости может представлять собой или включать в себя фолликулярную жидкость, культуральную среду или буферную среду.

В некоторых вариантах осуществления скорость течения является приблизительно постоянной и составляет от около 0,5 до около 5,0 мл/минуту, например от около 1,0 мл/минуту до около 4,0 мл/минуту, например скорость течения может оставлять от около 0,5 до около 2,0 мл/минуту, например 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 мл/минуту. Скорость течения может составлять около 1,0 мл/минуту. Ооциты могут представлять собой ооциты млекопитающих, например ооциты человека. Ширина сужающих блоков третьего звена может составлять около 100-110 микрон, например, 100, 102, 104, 106, 108 или 110 микрон. В некоторых вариантах осуществления ооциты представляют собой ооциты человека, при этом расстояние между кончиками множества зубцов на противоположных стенках составляет около 100-110 микрон.

В различных вариантах осуществления, по меньшей мере, одно из одного или более звеньев включает в себя один или более расширительных блоков, чередующихся с одним или более ограничительными блоками. По меньшей мере, одно звено из одного или более звеньев может включать в себя один или более ограничительных блоков, имеющих

гладкую внутреннюю поверхность. По меньшей мере, один расширительный блок может иметь ширину от около 250 до около 600 микрон, например 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 или 600 микрон. По меньшей мере, один ограничительный блок может иметь ширину от около 200 до около 350 микрон, например 200, 225, 250, 275, 300, 325 или 350 микрон. По меньшей мере, один ограничительный блок может иметь ширину около 100-250 микрон, например 125, 150, 175, 200, 225 или 250 микрон или более.

В другом аспекте в настоящем раскрытии предложены системы, имеющие канал, включающий в себя множество подканалов для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток. Системы включают в себя субстрат и канал. Канал включает в себя входное отверстие, выходное отверстие, а также одно или более звеньев, расположенных последовательно в канале. Каждое звено из одного или более звеньев сообщается по текучей среде с последующим звеном. Каждое из одного или более звеньев включает в себя одну или более стоек, выстроенных в ряд, расположенный поперек канала, например, перпендикулярно каналу. Стойки могут быть овальными, квадратными, прямоугольными и т.п., при условии, что они имеют две удлиненные, например прямые, стенки, например, проходящие параллельно друг другу. Каждый из рядов включает в себя множество стоек, например, две или более, например 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более стоек. Каждая из стоек заданного ряда разнесена от соседней стойки в заданном ряду для образования подканала. Одна или более стоек в ряду включают в себя множество насеченных зубцов или другую неровность поверхности на удлиненных прямых стенках стоек, обращенных к стенке канала или обращенных к другой стойке в ряду.

По меньшей мере, один подканал может иметь ширину около 240 микрон, например 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 или 280 микрон. По меньшей мере, один подканал может иметь ширину около 140 микрон, например 120, 130, 140, 150 или 160 микрон. По меньшей мере, один подканал может иметь ширину около 90 микрон, например 80, 85, 90, 95, 100 или 105 микрон.

Все стойки могут включать в себя множество насеченных зубцов, например, вдоль прямой стенки стойки. Все подканалы первого звена могут иметь первую ширину, а все подканалы второго звена могут иметь вторую ширину, которая меньше первой ширины. Все подканалы третьего звена могут содержать третью ширину, которая меньше второй ширины.

Настоящее раскрытие касается систем и способов, нацеленных на устранение недостатков в данной области техники. По меньшей мере, одно преимущество систем, представленных в настоящем описании, заключается в том, что они предоставляют средство для денудации ооцитов с использованием непрерывного потока текучей среды. Другое преимущество настоящих систем заключается в том, что они позволяют использовать более простые, автоматизированные способы для денудации ооцитов. Кроме того, новые системы могут обращаться с необработанной фолликулярной жидкостью или образцами жидкости, которые содержат значительное количество дебриса в виде клеток

крови, сгустков крови, фрагментов тканей и т.д., обеспечивая при этом превосходный выход по денудированным ооцитам. Кроме того, по сравнению с другими устройствами, системами и традиционными ручными процедурами для денудации ооцитов, настоящие системы и способы уменьшают вероятность нарушения оплодотворения или снижения потенциала развития ооцита. Таким образом, новые системы и способы предоставляют продуктивный и эффективный способ обработки ооцитов человека автоматизированным, стандартизованным и непрерывным образом.

Если не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем описании, имеют такое же смысловое значение, которое хорошо понятно среднему специалисту в области техники, к которой относится изобретение. Ниже описываются пригодные способы и материалы, хотя при воплощении на практике и проверке настоящего изобретения могут использоваться способы и материалы, схожие или эквивалентные тем, что представлены в настоящем описании. Все публикации, заявки на патент, патенты и другие ссылки, упомянутые в настоящем описании, в полном объеме включены в него путем ссылки. В случае расхождений, приоритет имеет настоящее описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры носят лишь иллюстративный, но не ограничительный характер.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидны из нижеследующего подробного описания и из формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГ. 1 - иллюстративная общая схема способов для использования микрофлюидной системы согласно, по меньшей мере, одному примеру осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 2А- 2С - схематичные иллюстрации микрофлюидной системы, имеющей один канал для удаления кумулюсных клеток из комплексов ооцит-кумулюс (КОК) согласно настоящему изобретению.

ФИГ. 3А - схема, на которой показан вид в увеличенном масштабе гладкого ограничительного блока и проксимальных расширительных блоков, расположенных в первом звене канала в микрофлюидной системе согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения.

ФИГ. 3В - схема, на которой показан вид в увеличенном масштабе гладкого ограничительного блока и проксимальных расширительных блоков, расположенных во втором звене канала в микрофлюидной системе согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения.

ФИГ. 3С - схема, на которой показан вид в увеличенном масштабе зубчатого ограничительного блока и проксимальных расширительных блоков, расположенных в третьем звене канала в микрофлюидной системе согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения.

Фиг. 4А-4С - схематичные иллюстрации микрофлюидной системы, имеющей канал, включающий в себя множество подканалов, образованных рядами стоек в канале

для удаления кумулюсных клеток из КОК согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения.

ФИГ. 5 - блок схема алгоритма, демонстрирующая пример способа использования микрофлюидных систем, представленных в настоящем описании, согласно, по меньшей мере, одному варианту осуществления настоящего изобретения.

ФИГ. 6А - увеличенное изображение, демонстрирующее КОК, поступающий через три отдельных зубчатых ограничительных блока согласно, по меньшей мере, одному варианту осуществления настоящего изобретения.

ФИГ. 6В - схематичная иллюстрация, демонстрирующая КОК, поступающий через единственный зубчатый ограничительный блок согласно, по меньшей мере, одному варианту осуществления настоящего изобретения.

ФИГ. 7 - столбчатая диаграмма, демонстрирующая влияние ширины (W_3) ограничительного блока третьего звена на производительность и эффективность денудации для обработанных КОК.

ФИГ. 8А - иллюстрация четырех разных вариантов реализации ($\theta=0^\circ$, 39° , 90° и 141°) насеченных зубцов, наклоненных вдоль ограничительного блока в канале.

Фиг. 8В и 8С - диаграммы, демонстрирующие производительность и эффективность денудации микрофлюидной системы, имеющей различные углы θ наклона. Эффективность денудации является наивысшей при угле наклона 141° , образуемом против направления потока, показанного стрелкой.

ФИГ. 9 - увеличенное изображение, демонстрирующее дебрис, захваченный в подканале микрофлюидной системы, имеющей множество подканалов, образованных между овальными стойками, выстроенными в ряды.

ФИГ. 10 - таблица, демонстрирующая влияние скорости течения на производительность и эффективность денудации микрофлюидной системы, имеющей множество подканалов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Вспомогательные репродуктивные технологии (ВРТ), такие как экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) и интрацитоплазматическая инъекция сперматозоида (ИКСИ), становятся все более популярными способами лечения бесплодия. Однако обычные ВРТ-процедуры могут иметь ряд недостатков, например, быть дорогостоящими и требовать много времени. Обычные ВРТ-процедуры также всецело зависят от высококвалифицированных специалистов, таких как эмбриологи, что может привести к зависимости результатов от различий в действиях исполнителей и отсутствию стандартизации. Чтобы ИКСИ была эффективной, обычно важно денудировать ооциты перед проведением процедуры, чтобы способствовать инъекции сперматозоида в ооцит и позволить оценить морфологию ооцитов, в частности, стадию зрелости ядра.

В клинической практике ИКСИ эмбриологам сначала требуется собрать руками около дюжины комплексов ооцит-кумулюс (КОК) из приблизительно 150 мл фолликулярной жидкости под микроскопом. Ооциты, изначально извлеченные из

яичников, обычно окружены несколькими слоями специализированных гранулезных клеток (кумулюсных клеток), образующих упорядоченную структуру, именуемую «комплекс ооцит-кумулюс» (КОК). Образцы фолликулярной текучей среды обычно имеют объем от 20 до 200 мл и содержат некоторое количество дебриса, некоторые фрагменты тканей, коагулированные клетки крови, клеточные элементы крови и КОК. Затем эмбриологам требуется денудировать ооциты, используя сочетание энзиматического (например, с применением гиалуронидазы) и механического (пипетирования вручную) способов, перед проведением интрацитоплазматической инъекции сперматозоида.

Кумулюсные клетки, находящиеся в близком контакте с ооцитом, также именуемые «клетками короны», могут образовывать цитоплазматические проекции, пересекающие прозрачную зону и образующие щелевидные соединения с оолеммой. При проведении обычных процедур ооциты могут очищаться от клеточной массы кумулюса-короны посредством энзиматического действия гиалуронидазы и пипетирования вручную. Однако процедуры такого типа могут быть неэффективными, и их результат может зависеть от различий в действиях исполнителей. При проведении других процедур зиготы обрабатываются по очереди, при этом потоки текучей среды контролируются вручную, что занимает много времени и сопряжено с риском расхождений в действиях исполнителей. Новые способы и системы, представленные в настоящем описании, могут помочь избежать или преодолеть эти проблемы в ВРТ.

В данном раскрытии предложены микрофлюидные системы и способы для очистки ооцитов от окружающих клеток кумулюса и короны с перспективой широкого применения в области вспомогательной репродукции человека. В общем, системы включают в себя, по меньшей мере, один канал, имеющий одно или более звеньев, при этом каждое звено имеет повторяющиеся ограничительные блоки и расширительные блоки. Образец жидкости, например образец необработанной фолликулярной текучей среды, содержащий КОК, может вводиться во входное отверстие системы, например, при постоянной скорости течения. Подача заставляет КОК совершать движение через канал системы. Ограничительные блоки и расширительные блоки работают совместно, чтобы способствовать денудации ооцитов. Например, ограничительные блоки содержат особенности поверхности, например гладкие или зубчатые внутренние поверхности, для снятия или сдирания внешних клеток с КОК. Расширительные блоки способствуют переворачиванию КОК, когда они проходят через систему. Системы могут быть выполнены так, что достигается непрерывный поток КОК.

В других вариантах осуществления в раскрытии предложены микрофлюидные системы и способы для очищения ооцитов от окружающих кумулюсных клеток при извлечении КОК из больших объемов образцов жидкости, которые могут содержать дебрис различных размеров. В некоторых вариантах осуществления фермент, специфичный в отношении кумулюсных клеток, например, гиалуронидаза, добавляется в образец, например образец фолликулярной текучей среды, для ослабления КОК, но не

другого дебриса, после чего образец жидкости совершает течение через системы, представленные в настоящем описании. Крупный дебрис, коагулированная кровь и т.д. захватываются в каналах и/или фильтре грубой очистки ближе по ходу, в то время как КОК подвергаются очистке и проходят через каналы. Таким образом, устройство удаляет крупный дебрис, при этом очищая КОК, так что ооциты собираются на выходе систем. Новые системы решают следующие задачи: 1) автоматически очищают ооциты от окружающих кумулюсных клеток, обработанных ферментом, например гиалуронидазой, для освобождения кумулюсных клеток от ооцита; 2) обрабатывают большой объем текучей суспензии, такой как фолликулярная жидкость, за одну операцию без закупоривания; 3) селективно захватывают слишком большие сгустки крови и остатки тканей; а также 4) минимизируют интервенцию человека, уменьшая время обработки и совершенствуя стандартизацию. В частности, многоканальные системы захватывают крупный дебрис, коагулированную кровь и т.д. в фильтрах грубой очистки ближе по ходу и/или в каналах, в то время как КОК подвергаются очистке и могут проходить через каналы. Таким образом, новые системы удаляют крупный дебрис, при этом автоматически осуществляя очистку КОК для получения ооцитов на выходном отверстии.

На ФИГ. 1 показана общая схема способов, предназначенных для использования микрофлюидной системы 100 согласно, по меньшей мере, одному варианту осуществления настоящего изобретения. Микрофлюидная система 100 может очищать ооциты от окружающего их кумулюсного матрикса автоматизированным и стандартизованным образом. Вообще, суспензия комплексов ооцит-кумулюс (КОК) 170a может смешиваться с буферной или культуральной средой. Среда важна для сохранения ооцитов живыми и жизнеспособными. Вообще, суспензия может иметь объем, составляющий около 10-50 микролитров. Смесь может содержать общий объем около 500 микролитров. Вообще, смесь приготавливается путем добавления КОК-суспензии в контейнер (например, трубку), заполненный культуральной средой (например, имеющей объем до около 500 микролитров). Полученная жидкость вводится в микрофлюидную систему 100 с помощью, например, насоса. Полученная жидкость вводится в микрофлюидную систему 100, например, при постоянной скорости течения. В различных вариантах осуществления насос может представлять собой механизированную систему, такую как шприцевой насос или насос с управлением по давлению. В некоторых вариантах осуществления в выходном отверстии может создаваться разрежение, чтобы обеспечить требуемую скорость течения.

В некоторых вариантах реализации суспензия включает в себя дебрис различных размеров. Например, суспензия может включать в себя дебрис, который больше, чем КОК, и/или меньше, чем КОК. В некоторых вариантах реализации суспензия преинкубируется с ферментом, таким как гиалуронидаза, прежде чем она вводится в микрофлюидную систему 100. Например, суспензия может преинкубироваться с 0,3 мг/мл гиалуронидазы.

Тщательный выбор постоянной скорости течения важен для конечного результата. Например, слишком низкая скорость течения может затруднить движение смеси через

микрофлюидную систему 100 и может сделать устройство неэффективным в отношении денудации ооцитов. С другой стороны, слишком высокая скорость течения может привести к тому, что система 100 повредит ооциты. Согласно настоящему описанию оптимальная скорость течения составляет от около 0,5 до около 2,0 мл/минуту (0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9 или 2,0 мл/минуту) и/или от около 3,0 мл/минуту до около 5,0 мл/минуту (3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,4, 4,6, 4,8 или 5,0 мл/минуту) в зависимости от конкретной конфигурации используемой микрофлюидной системы. По мере того как КОК 170а проходят через микрофлюидную систему 100, элементы микрофлюидной системы 100 прикладывают механические силы к КОК 170, способствуя очищению КОК 170а от кумулюсных клеток. Когда КОК 170а достигают конечной точки микрофлюидной системы 100, они становятся частично или полностью денудированными ооцитами 170b. Денудированные ооциты 170b собираются в резервуаре выходного отверстия микрофлюидного устройства 100.

Общая схема системы

Фиг. 2А-2С - схематичные иллюстрации микрофлюидной системы 100 для удаления кумулюсных клеток с ооцитов согласно настоящему изобретению. На ФИГ. 2А показана общая схема системы, а на Фиг. 2В и 2С показаны виды в увеличенном масштабе нескольких частей микрофлюидной системы 100. Как показано на ФИГ. 2А, микрофлюидная система 100 включает в себя входное отверстие 101, выходное отверстие 102, первое звено 110, второе звено 120 и третье звено 130. Совместно первое звено 110, второе звено 120 и третье звено 130 образуют длинный извилистый канал. Входное отверстие 101 выполнено с возможностью приема КОК 170а и направления КОК 170а в первое звено 110. КОК 170а могут быть в состоянии суспензии и/или смешаны с буферной или культуральной средой. На данной иллюстрации длинный извилистый канал включает в себя три “ряда”. Первый (т.е. верхний) ряд включает в себя первое звено 110 и второе звено 120, в то время как второй и третий (т.е. нижний) ряды включают в себя третье звено 130. Хотя канал показан в виде серпантина, канал может также быть прямым, кольцевым или иметь различные другие формы. Канал может также включать в себя больше или меньше рядов, в зависимости от требуемого применения микрофлюидной системы 100.

Извилистый канал разделен на ряд повторяющихся расширительных блоков 140, чередующихся с гладкими ограничительными блоками 141 и/или зубчатыми ограничительными блоками 142. Форма и размеры этих блоков 140, 141, 142 могут изменяться по длине канала. Например, на данной конкретной иллюстрации первое звено 110 имеет квадратные расширительные блоки 140, а второе звено 120 и третье звено 130 имеют восьмиугольные расширительные блоки 140. Однако каждое звено может включать в себя любое количество различных форм расширительных блоков 140, включая квадратные, восьмиугольные и/или круглые. В показанном варианте осуществления первое звено 110 включает в себя двадцать пять расширительных блоков 140 и двадцать пять гладких ограничительных блоков 141. Второе звено 120 включает в себя двадцать

пять расширительных блоков 140 и двадцать пять гладких ограничительных блоков 141. Третье звено 130 включает в себя сто расширительных блоков 140 и сто зубчатых ограничительных блоков 142.

Кроме того, в показанном варианте осуществления первое звено 110 и второе звено 120 имеют одинаковую длину. Однако первое звено 110 и второе звено 120 могут иметь разные длины. В одном варианте осуществления длина первого и второго звеньев 110, 120 составляет около 10-50 мм, в зависимости от числа расширительных и ограничительных блоков 140, 141. Третье звено 130 может быть длиннее первых двух звеньев 110, 120. В показанном варианте осуществления третье звено 130 приблизительно в четыре раза длиннее первого или второго звена 110, 120. В показанном варианте осуществления третье звено 130 имеет длину около 40-200 мм.

Хотя на ФИГ. 2А показано, что каждое звено имеет определенную схему расположения расширительных блоков 140, гладких ограничительных блоков 141 и зубчатых ограничительных блоков 142, микрофлюидная система 100 может включать в себя любое количество звеньев, содержащих различные комбинации этих блоков 140, 141, 142. Например, второе звено 120 может также включать в себя некоторое число зубчатых ограничительных блоков 142. Третье звено 130 может включать в себя некоторое число гладких ограничительных блоков 141, которые могут чередоваться или могут не чередоваться между зубчатыми ограничительными блоками 142. Число и положение этих блоков 140, 141, 142 могут оптимизироваться в зависимости от конкретного применения микрофлюидной системы 100. Конкретная конструкция звеньев 110, 120, 130 может основываться на требуемой функции звеньев 110, 120, 130. Например, в проиллюстрированном варианте осуществления конфигурация первого и второго звеньев 110, 120 способствует удалению крупных, слабо присоединенных кумулюсных клеток КОК 170а. Кроме того, в проиллюстрированном варианте осуществления конфигурация третьего звена 130 способствует удалению лучистой короны КОК 170а, относящейся к самому внутреннему слою клеток, непосредственно примыкающему к прозрачной зоне.

Расширительные блоки 140, гладкие ограничительные блоки 141 и зубчатые ограничительные блоки 142 могут иметь различную высоту. Согласно настоящему описанию понятие высоты относится к расстоянию между “верхней” и “нижней” внутренними поверхностями блоков 140, 141 и 142 согласно тому, как блоки ориентированы в данный момент времени (понимая при этом, что “верх” может также рассматриваться как “низ”, опять же в зависимости от того, как блок ориентирован в пространстве в данный момент времени). Таким образом, например, высота может представлять собой сечение (например, для квадратных или восьмиугольных блоков) или диаметр (например, для круглых блоков). В некоторых вариантах осуществления расширительные блоки 140, гладкие ограничительные блоки 141 и зубчатые ограничительные блоки 142 имеют высоту 150-500 микрон. В некоторых вариантах осуществления высота всех расширительных блоков 140, гладких ограничительных блоков 141 и зубчатых ограничительных блоков 142 является постоянной. В некоторых

вариантах осуществления расширительные блоки 140, гладкие ограничительные блоки 141 и зубчатые ограничительные блоки 142 выполнены с возможностью иметь достаточно большую высоту, чтобы они могли соответствовать размеру КОК, не вызывая существенного закупоривания канала. Блоки 140, 141, 142 могут быть выполнены с возможностью иметь некоторый диапазон величин ширины. Например, в определенных вариантах осуществления расширительные блоки 140 имеют ширину 250-600 или более микрон. Вообще, ширина расширительных блоков 140 может выбираться так, чтобы заставить КОК 170а переворачиваться таким образом, чтобы вся поверхность КОК соприкасалась с внутренними стенками последующих ограничительных блоков 141, 142. В некоторых вариантах осуществления гладкие ограничительные блоки 141 выполнены с возможностью обладать шириной 100-300 микрон, а зубчатые ограничительные блоки 142 выполнены с возможностью обладать шириной 90-130 микрон. Блоки 140, 141, 142 также могут быть выполнены с возможностью иметь некоторый диапазон величин длины. Например, в определенных вариантах осуществления расширительные блоки 140 имеют длину 400-600 микрон, а гладкие и зубчатые ограничительные блоки 141, 142 имеют длину 550-750 микрон.

На ФИГ. 2В показан вид в увеличенном масштабе кривой 150, которая осуществляет переход второго звена 120 в третье звено 130, образующее вторые два ряда длинного извилистого канала в данном примере. Кривая 150 также осуществляет переход второго ряда в третий ряд, как показано на ФИГ. 2А.

На ФИГ. 2С показан вид в увеличенном масштабе зубчатого ограничительного блока 142, расположенного в третьем звене 130. Зубчатые ограничительные блоки 142 включают в себя несколько насеченных зубцов 142а. Как поясняется ниже со ссылкой на ФИГ. 8А, насеченные зубцы 142а могут устанавливаться под одним или более разными углами либо в направлении потока, либо против направления потока через канал. Например, в некоторых вариантах осуществления насеченные зубцы 142а установлены под углом от около 30 градусов до около 90 градусов (например, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или 85 градусов) против направления потока через канал. В других вариантах осуществления насеченные зубцы 142а установлены под углом от около 40 градусов до около 150 градусов против направления потока через канал.

Расстояние между кончиками насеченных зубцов 142а также может варьироваться. Вообще, расстояние между кончиками насеченных зубцов 142а выбирается на основе среднего диаметра ооцита человека (или другого животного, например млекопитающего) (например, 100 микрон), а потому задается так, чтобы составлять около 80-110 микрон. Расстояние между кончиками насеченных зубцов 142а может составлять различные величины, однако предпочтительно устанавливать расстояние между кончиками зубцов 142а так, чтобы они могли способствовать денудации, не причиняя чрезмерных повреждений ооциту. Например, если расстояние между кончиками зубцов 142а слишком мало, ооцит может не иметь возможности «протиснуться» между ними, не получив повреждения. Если расстояние между кончиками зубцов 142а слишком велико, зубцы

142а могут не иметь возможности удалить кумулюсные клетки из КОК 170а. Расстояние между кончиками зубцов 142а может, по меньшей мере, частично определяться длиной зубцов 142а. Следовательно, каждый из насеченных зубцов 142а может быть выполнен с возможностью иметь одну из нескольких длин. Например, в некоторых вариантах осуществления насеченные зубцы 142а имеют длину около 0,5-20 микрон (например, длину 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 микрон).

Микрофлюидная система 100 может быть выполнена из субстрат полидиметилсилоксана (ПДМС) или другого твердого инертного пластика или иного материала, при этом субстрат, после того как протравлен или обработан резанием с использованием стандартных технологий для образования канала в субстрате, соединяется с покрытием, например предметным стеклом, для обеспечения водонепроницаемого уплотнения. При выборе материалов субстрата и покрытия важно, чтобы они были совместимы и биологически инертны, чтобы не причинить вреда ооцитам, проходящим через канал.

Ограничительные и расширительные блоки

На ФИГ. 3А показан вид в увеличенном масштабе гладкого ограничительного блока 141 и проксимальных расширительных блоков 140, расположенных в первом звене 110 микрофлюидной системы 100 согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения. На ФИГ. 3В показан вид в увеличенном масштабе гладкого ограничительного блока 141 и проксимальных расширительных блоков 140, расположенных во втором звене 120 микрофлюидной системы 100 согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения. На ФИГ. 3С показан вид в увеличенном масштабе зубчатого ограничительного блока 142 и проксимальных расширительных блоков 140, расположенных в третьем звене 130 микрофлюидной системы 100 согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения.

Как показано на ФИГ. 3А, перед гладким ограничительным блоком 141 и за ним располагаются расширительные блоки 140. В данном варианте осуществления расширительные блоки 140 первого звена 110 имеют прямоугольную форму и обладают шириной W_0 . В данном варианте осуществления ширина W_0 составляет около 500 микрон, однако ширина W_0 может иметь один из нескольких других размеров, как говорилось ранее со ссылкой на Фиг. 2А-2С. Во всех трех звеньях 110, 120, 130 расширительные блоки 140 могут способствовать переворачиванию КОК, так что по существу вся поверхность КОК может взаимодействовать с внутренними поверхностями последующих гладких ограничительных блоков 141 или зубчатых ограничительных блоков 142. Гладкий ограничительный блок 140 содержит гладкие внутренние поверхности, которые, в общем, относятся к поверхностям, на которых отсутствуют насеченные зубцы и другие неровности или выступы, которые могли бы вводиться в слои кумулюса, окружающие ооциты. Гладкий ограничительный блок 141 первого звена 110 имеет также ширину W_1 . В данном иллюстративном варианте осуществления ширина W_1 составляет около 240 микрон, что может способствовать удалению крупных, слабо присоединенных кластеров

кумулясных клеток, присутствующих в КОК. Однако ширина W_1 может иметь один из нескольких других размеров, как говорилось ранее со ссылкой на Фиг. 2А-2С. Кроме того, как указывалось ранее со ссылкой на Фиг. 2А-2С, первое звено 110 может включать в себя один или более зубчатых ограничительных блоков 142 в дополнение к гладким ограничительным блокам 141 или вместо них.

Как показано на ФИГ. 3В, гладкий ограничительный блок 141 второго звена 120 имеет ширину W_2 . Гладкий ограничительный блок 141 второго звена 120 может иметь ширину W_2 , которая меньше ширины W_1 гладкого ограничительного блока 141 первого звена 110. Однако ширина W_2 гладкого ограничительного блока 141 второго звена 120 может превышать или быть равной ширине W_1 гладких ограничительных блоков 141 первого звена 110. В некоторых вариантах осуществления ширина W_2 выбирается так, чтобы способствовать удалению кластеров кумулясных клеток промежуточного размера, которые могли быть не удалены гладкими ограничительными блоками 141 первого звена 110. В данном иллюстративном варианте осуществления ширина W_2 составляет около 140 микрон, а значит, меньше ширины W_1 гладких ограничительных блоков 141 первого звена 110. Однако ширина W_2 может иметь один из нескольких других размеров, как говорилось ранее со ссылкой на Фиг. 2А-2С. Гладкий ограничительный блок 141 второго звена 120 также имеет гладкие внутренние поверхности. Перед гладким ограничительным блоком 141 и за ним располагаются расширительные блоки 140.

Расширительные блоки 140 второго звена 120 имеют форму восьмиугольника. Однако расширительные блоки 140 второго звена 120 могут также иметь квадратную форму или круглую форму. Расширительные блоки 140 восьмиугольной и/или круглой формы могут предотвратить образование завихрений, которые можно видеть в четырех углах расширительных блоков 140 квадратной формы. Расширительные блоки 140 второго звена 120 также имеют ширину W_0 500 микрон. Однако расширительные блоки 140 второго звена 120 могут иметь ширину, которая больше или меньше ширины W_0 расширительных блоков 140 первого звена 110. Например, в одном варианте осуществления расширительные блоки 140 второго звена 120 имеют ширину, превышающую ширину W_0 расширительных блоков 140 первого звена 110. В настоящем варианте осуществления расширительные блоки 140 второго звена 120 имеют ширину, которая меньше ширины W_0 расширительных блоков 140 первого звена 110, но больше ширины W_2 гладких ограничительных блоков 141 второго звена 120.

Как показано на ФИГ. 3С, зубчатый ограничительный блок 142 третьего звена 130 имеет ширину W_3 . Ширина W_3 зубчатого ограничительного блока 142 обычно меньше ширины W_2 гладкого ограничительного блока 141 второго звена 120. Например, в данном иллюстративном варианте осуществления зубчатый ограничительный блок 142 имеет максимальную ширину W_3 , составляющую 130 микрон. Однако ширина W_3 может иметь один из нескольких других размеров, как говорилось ранее со ссылкой на Фиг. 2А-2С. Зубчатый ограничительный блок 142 включает в себя множество насеченных зубцов 142а. Множество насеченных зубцов 142а расположены в ряд в направлении непрерывного

потока (обозначенного жирной стрелкой, направленной вправо) извилистого канала. Перед зубчатым ограничительным блоком 142 и после него расположены расширительные блоки 140. Расширительные блоки 140 третьего звена 130 также имеют ширину W_0 , которая равна ширине расширительных блоков 140 в других звеньях. Однако аналогично расширительным блокам 140 второго звена 120, расширительные блоки 140 третьего звена 130 могут иметь ширину, которая меньше или больше ширины W_0 расширительных блоков 140 других звеньев 110, 120. В вариантах осуществления, проиллюстрированных на Фиг. 2В, 2С и 3А-3С, ширина ограничительных блоков 141, 142 уменьшается на каждом последующем звене. Например, гладкие ограничительные блоки 141 первого звена имеют ширину W_1 , которая больше ширины W_2 гладких и/или зубчатых ограничительных блоков во втором звене 120, которые, в свою очередь, обладают шириной (W_2), превышающей ширину W_3 зубчатых ограничительных блоков 142 третьего звена 130. Это может способствовать постепенному удалению слоев кумюлюса из КОК. Обеспечив более «плавное» удаление кумюлюсного слоя, схема проиллюстрированного варианта осуществления может предотвратить закупоривание между звеньями, уменьшая при этом рабочую нагрузку для каждого последующего звена.

В некоторых вариантах реализации микрофлюидная система 100 включает в себя множество каналов, расположенных, например, параллельно (например, каждый канал содержит первое звено 110, второе звено 120 и третье звено 130 для очищения КОК 170а), так что образец жидкости, содержащий несколько КОК 170а, может совершать течение через множество каналов. Множество каналов могут быть образованы на одном и том же или разных субстратах, и могут соединяться параллельно, например, с помощью трубопроводов или магистралей, которые соединяют различные входные отверстия одновременно с основным входным отверстием и различные выходные отверстия одновременно с основным выходным отверстием системы. Параллельное соединение множества каналов может способствовать непрерывному потоку КОК 170а, если один канал выйдет из строя или закупорится.

Микрофлюидные системы, имеющие канал с множеством подканалов

Фиг. 4А-4С - схематичные иллюстрации микрофлюидной системы 600, имеющей канал с множеством подканалов для удаления кумюлюсных клеток из КОК согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения. Микрофлюидная система 600, имеющая множество подканалов, может использоваться, например, когда образец жидкости, содержащий КОК, может также содержать дополнительный дебрис, который может заблокировать или закупорить единственный канал. Различные подканалы могут создавать различные пути для КОК для их сквозного прохождения, если один путь становится заблокированным или закупоренным.

На ФИГ. 4А показана общая схема системы, а на Фиг. 4В и 4С показаны виды в увеличенном масштабе нескольких частей микрофлюидной системы 600. Как показано на ФИГ. 4А, микрофлюидная система 600 включает в себя входное отверстие 601, выходное отверстие 602, первое звено 610, второе звено 620 и третье звено 630. Совместно первое

звено 610, второе звено 620 и третье звено 630 образуют длинный извилистый канал. На данной иллюстрации длинный извилистый канал включает в себя три секции. Первая (т.е. верхняя) секция включает в себя первое звено 610 и второе звено 620, представляющие собой фильтрующие звенья, которые помогают удалить дебрис из образца жидкости, в то время как вторая и третья (т.е. нижняя) секции включают в себя третье звено 630, обеспечивающее эффект денудации. Хотя канал представлен в виде серпантина, канал может также быть прямым, кольцевым или иметь различные другие формы. Канал может также включать в себя больше или меньше секций, в зависимости от требуемой длины и/или применения микрофлюидной системы 600.

Извилистый канал включает в себя множество рядов 640 стоек 640а. Каждый ряд 640 включает в себя множество стоек 640а. Форма и размеры этих стоек 640а могут оставаться неизменными или изменяться по длине канала. Например, на данной конкретной иллюстрации первое звено 610, второе звено 620 и третье звено 630 содержат стойки 640а овальной формы. Однако каждое звено может включать в себя любое количество различных форм стоек 640а, в том числе квадратные, прямоугольные и/или восьмиугольные стойки. Каждое звено может также включать в себя любое количество рядов 640 стоек 640а, а каждый ряд 640 может иметь любое количество стоек 640а. В показанном варианте осуществления первое звено 610 включает в себя несколько рядов 640, которые имеют семь стоек 640а, и несколько рядов 640, которые имеют шесть стоек 640а. Второе звено 620 включает в себя несколько рядов 640, каждый из которых имеет шесть стоек 640а, и несколько рядов 640, каждый из которых имеет пять стоек 640а. Третье звено 630 включает в себя несколько рядов, каждый из которых имеет шесть стоек 640а, и несколько рядов 640, каждый из которых имеет пять стоек 640а. Во всех вариантах осуществления ряды стоек расположены поперек канала, например, перпендикулярно продольной оси канала или под некоторым углом, например небольшим углом, к продольной оси канала.

Первое звено 610, второе звено 620 и третье звено 630 могут иметь одинаковую длину или разные длины. В некоторых вариантах реализации длина первого и второго звеньев 610, 620 составляет около 10-50 мм, в зависимости от числа рядов 640 стоек. Третье звено 630 может быть длиннее первых двух звеньев 610, 620. В показанном варианте осуществления третье звено 630 приблизительно в четыре раза длиннее первого или второго звена 610, 620. В различных вариантах осуществления третье звено 630 может иметь длину около 40-200 мм. В одном варианте осуществления каждая стойка может иметь длину около 800 микрон, при этом система может включать в себя около 100 этих стоек в третьем звене, чтобы достичь эффективной денудации. Горизонтальное расстояние между рядами стоек может составлять около 400 микрон, однако данное расстояние не является критическим и может изменяться при условии, что КОК имеют достаточно пространства и времени между рядами стоек, чтобы переворачиваться или совершать вращение. Например, в данном варианте осуществления полная длина третьего звена может составлять 120 мм.

Важным параметром является полная длина зубчатой поверхности, если считать все стойки вдоль подканала, и в вышеприведенном варианте осуществления она составляет около 80 мм. Длина зубчатой поверхности для каждой стойки может быть меньшей, но тогда в третьем звене потребуется больше стоек. В качестве альтернативы можно создать длину зубчатой поверхности большего размера для каждой стойки и содержать меньшее количество стоек в третьем звене. Однако полная длина зубчатой поверхности в третьем звене должна быть более чем 80 мм. Полная длина зубчатой поверхности может также превышать, например, 100 мм, 120 мм или 1500 мм, но если полная длина зубчатой поверхности слишком велика, ооциты могут получить слишком большие повреждения.

На ФИГ. 4В показан вид в увеличенном масштабе ряда 640 стоек, расположенного в третьем звене 630. Каждая стойка 640а в заданном ряду 640 разнесена от соседней стойки 640а для образования подканала 640b, имеющего ширину (W). Стойки 640а на концах ряда 640 разнесены от стенок канала для образования дополнительных подканалов 640b. Ширина этих подканалов может составлять около 80-110 микрон, например, 80, 85, 90, 95, 100, 105 или 110 микрон, что зависит обычно от диаметра ооцитов, подлежащих денудации.

Первое звено 610, второе звено 620 и третье звено 630 могут включать в себя ряды 640 стоек, имеющие подканалы 640b одинаковой ширины (W) или варьiruемой ширины (W). В показанном варианте осуществления каждый подканал 640b в первом звене 610 имеет ширину (W) 240 микрон, каждый подканал 640b во втором звене 620 имеет ширину (W) 140 микрон, а каждый подканал 640b в третьем звене 630 имеет ширину (W) 90 микрон.

На ФИГ. 4С показан вид в увеличенном масштабе нескольких стоек 640а, расположенных в третьем звене 630. Каждая стойка 640а включает в себя множество насеченных зубцов 640с вдоль удлиненной стенки стойки. Насеченные зубцы 640с могут устанавливаться под одним или более из нескольких различных углов наклона либо в направлении потока через подканал, либо предпочтительно против него. Например, в некоторых вариантах осуществления насеченные зубцы 640с установлены под углом от около 30 градусов до менее 90 градусов против направления потока через канал. Расстояние между кончиками насеченных зубцов 640с также может варьироваться, однако, в общем, расстояние между кончиками насеченных зубцов 640с выбирается на основе среднего диаметра ооцита человека (или другого животного, например млекопитающего) (например, 100 микрон), а потому задается так, чтобы составлять около 80-110 микрон.

Расстояние между кончиками насеченных зубцов 640с может составлять ряд различных величин; однако предпочтительно устанавливать расстояние между кончиками зубцов 640с так, чтобы они могли способствовать денудации, не причиняя чрезмерных повреждений ооциту. Например, если расстояние между кончиками зубцов 640с слишком мало, ооцит может не иметь возможности «протиснуться» между ними, не получив

повреждения. Если расстояние между кончиками зубцов 640с слишком велико, зубцы 640с могут не иметь возможности удалить кумулюсные клетки из КОК. Расстояние между кончиками зубцов 640с может, по меньшей мере, частично определяться длиной зубцов 640с. Следовательно, каждый из насеченных зубцов 640с может быть выполнен с возможностью иметь одну из нескольких длин. Например, в некоторых вариантах осуществления насеченные зубцы 640с имеют длину около 0,5-20 микрон (например, длину 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 или 20 микрон).

В варианте осуществления, показанном на Фиг. 4А-4С, каждая стойка 640а во всех звеньях 610, 620, 630 включает в себя насеченные зубцы 640с. Однако любое из звеньев может дополнительно или в качестве альтернативы включать в себя любое количество гладких стоек 640а. Помимо этого, насеченные зубцы 640с каждой стойки 640а в каждом звене могут иметь различную длину и расстояние между кончиками. Кроме того, хотя стенки извилистого канала являются гладкими в данном варианте осуществления, любое или все звенья 610, 620, 630 могут включать в себя стенки, которые также имеют насеченные зубцы 640с.

Конкретная конструкция звеньев 610, 620, 630 может основываться на требуемой функции звеньев 610, 620, 630. Например, в проиллюстрированном варианте осуществления конфигурация рядов 640 стоек первого и второго звеньев 610, 620 способствует удалению крупных, слабо присоединенных кумулюсных клеток КОК, поступающих через подканалы 640b, с захватом при этом крупного дебриса, содержащегося в образце жидкости. Кроме того, в показанном варианте осуществления конфигурация третьего звена 630 способствует удалению лучистой короны КОК, поступающих через канал, с захватом при этом более мелкого дебриса, содержащегося в образце жидкости.

Хотя каждое звено показанного варианта осуществления включает в себя несколько рядов 640 стоек, любое или каждое из звеньев может включать в себя только один ряд стоек, имеющий несколько удлиненных стоек 640а. Однако наличие множества рядов 640 с некоторым расстоянием между каждым рядом 640 может способствовать более эффективной денудации, поскольку пространства между рядами стоек способствуют вращению КОК, поступающих через канал.

ФИГ. 9 - увеличенное изображение, демонстрирующее дебрис, захваченный подканалом микрофлюидной системы. Как показано, различные подканалы 640с микрофлюидного устройства 600 могут захватывать дебрис, который может содержаться в образце жидкости, при этом КОК образца могут поступать через другие подканалы 640 для денудации.

Способы применения

На ФИГ. 5 показана блок-схема, демонстрирующая способ применения микрофлюидной системы 100 согласно, по меньшей мере, одному варианту осуществления настоящего изобретения. В целях иллюстрации способ будет описан на примере применения с микрофлюидной системой 100, рассмотренной ранее со ссылкой на

Фиг 2А-2С. Однако этот способ может использоваться с другими микрофлюидными системами, например микрофлюидной системой 600, имеющей множество подканалов, рассмотренной ранее со ссылкой на Фиг. 4А-4С. Способ включает в себя генерирование образца жидкости (блок 510), введение образца жидкости в микрофлюидную систему 100 (блок 520), создание потока образца жидкости через микрофлюидную систему 100 (блок 530) и извлечение денудированного ооцита (блок 540).

В блоке 510 суспензия, содержащая КОК 170а, загружается в трубку, которая может быть предварительно заполнена культуральной средой. В некоторых вариантах осуществления трубка предварительно заполняется буфером. Суспензия КОК 170а смешивается с культуральной/буферной средой для генерирования образца жидкости. Образец жидкости может иметь общий объем около 300-700 микролитров. В некоторых вариантах осуществления образец жидкости содержит общий объем, составляющий около 500 микролитров. В некоторых вариантах осуществления суспензия включает в себя дебрис различных размеров. Например, суспензия может включать в себя дебрис, который больше, чем КОК, и/или меньше, чем КОК. В некоторых вариантах реализации суспензия преинкубируется с использованием гиалуронидазы, прежде чем она вводится в микрофлюидную систему. Например, суспензия может преинкубироваться с использованием 0,3 мг/мл гиалуронидазы. Инкубирование суспензии с применением гиалуронидазы может способствовать удалению кумулюсных клеток путем ослабления связей между кумулюсными клетками КОК.

В блоке 520 трубка соединяется с насосом, например, шприцем, управляемым насосом, например, иглой. Шприц устанавливается на насосе, который может придавать постоянную скорость течения. Другой конец трубки вставляется во входное отверстие 101 микрофлюидной системы 100. Образец жидкости, содержащий КОК 170а, далее вводится во входное отверстие 101 микрофлюидной системы 100 при постоянной скорости течения. Постоянная скорость течения может составлять 0,1-2,0 мл/мин. В некоторых вариантах осуществления постоянная скорость течения составляет 0,5 мл/мин. В других вариантах осуществления постоянная скорость течения составляет 0,75 мл/мин или 1 мл/мин.

При использовании микрофлюидной системы 600, имеющей множество подканалов, как рассматривалось в настоящем описании со ссылкой на Фиг 4А-4С, может использоваться более высокая постоянная скорость течения благодаря наличию множества подканалов. В некоторых вариантах осуществления постоянная скорость течения составляет от 3 мл/мин до 5 мл/мин.

В блоке 530 нагнетательное действие насоса заставляет образец жидкости совершать течение через микрофлюидную систему 100. По мере того как образец жидкости поступает через микрофлюидную систему 100, КОК проходят через несколько расширительных блоков 140, гладких ограничительных блоков 141 и зубчатых ограничительных блоков 142 микрофлюидной системы 100. Вообще, расширительные блоки 140 выполнены с возможностью вызывать перевероты КОК 170а, что помогает как можно большей поверхности КОК соприкасаться с внутренними стенками последующих

ограничительных каналов 141, 142. Вообще, гладкие ограничительные блоки 141 способствуют удалению крупных, слабо присоединенных кумулюсных клеток КОК 170а, а зубчатые ограничительные блоки 142 способствуют удалению лучистой короны КОК 170а.

Например, на ФИГ. 6В показан КОК 170а, поступающий через зубчатый ограничительный блок 142. Ограничительный блок включает в себя насеченные зубцы, расположенные под углом к потоку КОК 170а, сам же поток обозначен жирными стрелками, направленными вправо. Когда КОК 170а проходит через зубчатый ограничительный блок 170а, насеченные зубцы прикладывают сдвиговые напряжения к КОК 170а, способствуя денудации ооцита в КОК 170а. По мере того как КОК 170а «пробираются» через микрофлюидную систему 100, КОК 170а становятся все более и более очищенными. Например, на ФИГ. 6А показан КОК 170а, поступающий через три отдельных зубчатых ограничительных блока 142 под номерами 3, 25 и 97 соответственно. Верхний зубчатый ограничительный блок 142 представляет третий зубчатый ограничительный блок 142 в третьем звене 130 микрофлюидной системы 100. Средний зубчатый ограничительный блок 142 представляет двадцать пятый зубчатый ограничительный блок 142 в третьем звене 130 микрофлюидной системы 100. Нижний зубчатый ограничительный блок 142 представляет девяносто седьмой зубчатый ограничительный блок 142 в третьем звене 130 микрофлюидной системы 100. Как показано, КОК 170а становится все более и более очищенным, по мере того как он проходит через каждый зубчатый ограничительный блок 142. Когда КОК 170а проходит через последнюю группу зубчатых ограничительных блоков 142, ооцит становится наиболее или полностью очищенным.

Возвращаясь к ФИГ. 5, при использовании микрофлюидной системы 600, имеющей множество подканалов, как рассматривалось ранее со ссылкой на Фиг 4А-4С, КОК могут проходить через множество подканалов 640с рядов 640 стоек. Подканалы 640с выполнены с возможностью удаления кумулюсных клеток КОК по аналогии с ограничительными блоками 142 (например, прикладывая механическую силу к кумулюсным клеткам).

В блоке 540, после того как КОК 170а прошли обработку в группе блоков 140, 141, 142, КОК 170а становятся полностью денудированными ооцитами 170b. Однако КОК 170а могут стать лишь частично денудированными ооцитами 170b в зависимости от конкретной конструкции и предполагаемого применения микрофлюидной системы 100. Частично/полностью денудированные ооциты 170b собираются на выходном отверстии 102 (т.е. в резервуаре 102 выходного отверстия) микрофлюидной системы 100.

ПРИМЕРЫ

Изобретение дополнительно описывается в нижеследующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, определяемый формулой изобретения.

Пример 1 - работа микрофлюидной системы денудации ооцитов

Суспензию объемом 10 мкл, содержащую около 7-12 КОК мышей, преинкубированных с использованием 0,3 мг/мл гиалуронидазы, переносили в трубку

Tygon®, предварительно заполненную 0,5 мл культуральной среды. Трубка имела внутренний диаметр около 1,27 мм. Один конец трубки соединяли со шприцевым насосом посредством тупоконечной иглы диаметром 15 гейдж. Насос придавал постоянную скорость течения 1 мл/мин. Другой конец трубки вводили во входное отверстие микрофлюидной системы. Образец затем вводили в микрофлюидную систему согласно настоящему описанию. Микрофлюидную систему прикрепляли к одиночному предметному стеклу 75 мм x 25 мм. Микрофлюидная система имела три звена, причем ширина ограничительных блоков третьего звена составляла либо 80, 90, 100, 110, 120, 130, либо 140 мкм. В течение 30 секунд обработанные ооциты собирали в резервуар выходного отверстия. Выход рассчитывали как количество обработанных ооцитов из общего количества КОК, перенесенных в трубку. Эффективность рассчитывали как долю денудированных ооцитов из общего количества обработанных ооцитов, собранных в резервуаре выходного отверстия.

ФИГ. 7 - столбчатая диаграмма, демонстрирующая влияние ширины (W_3) ограничительных блоков третьего звена на производительность и эффективность денудации для обработанных КОК. Как показано, эффективность денудации составляла 100% или около этого значения для величин ширины 90 и 100 микрон, но резко падала при ширине более 100 микрон. Хотя и не показано, эффективность составляла также 100% для ширины 80 микрон, однако обычный ооцит мыши имеет диаметр около 90 микрон, при этом важно, чтобы расстояние между кончиками зубцов в ограничительных блоках третьего звена было не менее приблизительно ширины ооцита, чтобы избежать повреждения ооцитов. Таким образом, эффективное расстояние между кончиками зубцов в ограничительных блоках третьего звена для ооцитов мыши составляет около 90-100 микрон в этой системе. Ооциты человека обычно имеют ширину около 100 микрон, а значит, эффективное расстояние между кончиками зубцов в ограничительных блоках третьего звена для ооцита человека в микрофлюидной системе составляет около 100-110 микрон.

Пример 2 - выбор геометрии и параметров потока

В устройствах для денудации использовали ооциты на стадии зародышевого пузырька (GV) и соответствующие им КОК. КОК на GV-стадии отличаются нерасширенной, компактной клеточной массой кумлюса-короны, в то время как КОК на стадии метафазы II (МП) имеют расширенную, менее компактную клеточную массу кумлюса-короны с клетками короны, расходящимися от прозрачной зоны. КОК мыши на стадии МП обычно образует большой кластер. Оптимизированные параметры, полученные с использованием КОК на GV-стадии, использовали на зрелых КОК, находящихся на стадии МП, для экспериментов по экстракорпоральному оплодотворению.

Используя КОК на GV-стадии, отрегулировали три основных параметра, чтобы достичь полной денудации ооцитов на GV-стадии. Этими тремя основными параметрами были: ширина (W_3) ограничительных блоков с зубчатой поверхностью, общее число (N)

ограничительных и расширительных блоков в третьей секции, а также скорость (Q) течения, которую придавал шприцевой насос. Производительность рассчитывали как процентное содержание полностью или не полностью денудированных ооцитов, извлеченных в резервуаре выходного отверстия микрофлюидной системы. Эффективность денудации рассчитывали как процентное содержание полностью денудированных ооцитов из общего числа ооцитов, извлеченных в резервуаре выходного отверстия. Практически 100% ооцитов из КОК, поступивших в устройство, были извлечены в резервуаре выходного отверстия, вне зависимости от W_3 , N и Q . Возможно некоторые ооциты или КОК могли прилипнуть к гидрофильной внутренней поверхности трубки. При $N=100$ и $Q=1$ мл/мин средняя эффективность денудации снижалась от 98,6% до 26,7% с увеличением W_3 от 90 до 130 мкм.

Данные результаты показывают важность того, чтобы наименьшая ограничительная ширина (W_3) была близка к среднему размеру ооцита, свободного от кумулюса (т.е. ~90 мкм в диаметре), для осуществления денудации, что подчеркивает существенную важность физического контакта между КОК и внутренней стенкой.

В дополнение к ширине W_3 контролировали также влияние величин N и Q . В случае $W_3=90$ мкм и $Q=1$ мл/мин, эффективность денудации резко снижалась до 28,3%, когда число ограничительных и расширительных блоков в третьей секции (N) уменьшалось до 50. Данные результаты подразумевают, что создание в микрофлюидной системе подходящих ограничительных и расширительных блоков, так чтобы вся поверхность конкретного КОК имела шанс соприкоснуться с внутренней стенкой ограничительного канала, является важным для полной денудации ооцитов.

Хотя контакт КОК с внутренней стенкой блока с зубчатой поверхностью является важным, один он не может гарантировать полную денудацию ооцитов. Когда скорость течения снижалась до 0,5 мл/мин, эффективность денудации составляла 22,2%. Даже скорость течения, составляющая 0,75 мл/мин, приводила к более низкой эффективности денудации (86,2%), чем скорость течения, равная 1 мл/мин (98,6%). Таким образом, в дополнение к достаточному физическому контакту, важно, чтобы сдвиговые напряжения непосредственно коррелировали со скоростью течения, чтобы быть достаточно большими для соскабливания клеточной массы кумулюса-короны. Для исследования влияния сдвиговых напряжений проводили компьютерное моделирование динамики текучей среды (CFD) для потока текучей среды в устройстве или через кончик капилляра в процессе пипетирования вручную. Максимальные сдвиговые напряжения напрямую коррелировали со скоростью течения.

При потоке текучей среды через повторяющиеся ограничительные и расширительные блоки, с одной стороны, максимальный сдвиг ($\tau_{\max}$) увеличивался от 64,1 до 163,5 Па с увеличением скорости течения от 0,5 до 1 мл/мин. Максимальный сдвиг происходил на первой пере зубцов после поступления в ограничительный канал с зубчатой поверхностью. С другой стороны, $\tau_{\max}$ увеличивался от 149,8 до 392,0 Па с

увеличением скорости течения, генерируемой пипетированием вручную, от 0,5 до 1 мл/мин. При пипетировании вручную максимальный сдвиг происходил на внутреннем кольце кончика капилляра. Стекланный капилляр, используемый для денудации, может иметь наружный диаметр 200 мкм и внутренний диаметр 125 мкм. Обычная скорость течения, придаваемая многими эмбриологами, может лежать в диапазоне от 500 до 750 мкл/мин по результатам оценки, полученной из видеозаписи со скоростью 60 кадров в секунду. Пипетирование вручную может прикладывать разные сдвиговые напряжения в каждом возвратно-поступательном цикле вследствие изменения скорости течения, что может создавать различие в максимальных сдвиговых напряжениях до 250 Па в диапазоне 0,5-1 мл/мин. Однако микрофлюидное устройство было в состоянии сохранять сдвиговые напряжения постоянными благодаря придаваемой постоянной скорости течения. Максимальное различие в сдвиговых напряжениях при денудации в автоматическом и ручном режимах может достигать 230 Па при скорости течения 1 мл/мин.

Для подтверждения правильности результатов CFD-моделирования теоретически оценивали сдвиговые напряжения, действующие на внутреннюю стенку стекланный капилляра при полностью стабилизированном потоке. Сдвиговые напряжения, действующие на внутреннюю стенку в точке, расположенной аксиально на расстоянии 2,500 мкм от кончика капилляра, составляли 44,9, 65,5 и 82,5 Па при скорости течения 0,5, 0,75 и 1 мл/мин соответственно. Сдвиговые напряжения (τ) в этой точке можно также рассчитать теоретически на основе закона Пуазейля, $\tau = 4\mu Q/\pi r^2$, где μ - коэффициент динамической вязкости текучей среды (т.е. воды), Q - скорость течения, а r - внутренний радиус капилляра. Теоретический расчет позволил получить значения сдвиговых напряжений 38,7, 58,0 и 77,4 Па при скорости течения 0,5, 0,75 и 1 мл/мин соответственно. Данный результат хорошо согласуется с результатами CFD-моделирования, что показывает точность имитационных моделей.

Когда происходит овуляция КОК мышей на стадии МП, они образуют единый плотный кластер в маточной трубе. Кластер может ослабнуть через 5 минут инкубации с использованием 0,3 мг/мл гиалуронидазы при 37°C. Для оценки поведения микрофлюидной системы в условиях, близких к обычным условиям проведения клинических ВРТ-процедур, проводили эксперименты по денудации на КОК мышей на стадии МП. Денудированные ооциты затем использовали в экспериментах по ЭКО и ИКСИ для изучения их потенциала оплодотворения и развития. Микрофлюидная система, обладающая $W_3=90$ мкм и $N=100$, была достаточной, чтобы достичь полной денудации, когда обработанный гиалуронидазой кластер КОК на стадии МП проходил через систему при скорости течения 1 мл/мин. Средняя производительность составляла 98,9%, а эффективность денудации в среднем составляла 93,7%. Отмечено, что поскольку плотно упакованные кластеры КОК на стадии МП были ослаблены в различной степени после инкубации с использованием гиалуронидазы, необходимость в разделении кластеров на отдельные КОК может снизить эффективность денудации по сравнению с очищением КОК на GV-стадии, которые обычно могут представлять собой изолированные

комплексы. Следует отметить, что обычные клинические образцы, относящиеся к человеку, могут не иметь таких кластеров, даже на стадии МП.

Пример 3 - выбор угла наклона насеченных зубцов

Чтобы исследовать, как особенности поверхности ограничительных блоков влияют на характеристики денудации, в систему вводили различные углы Θ наклона. “Углом наклона” именуется угол между направлением потока КОК и срединной линией насеченных зубцов ограничительных блоков. ФИГ. 8А - иллюстрация четырех разных углов наклона насеченных зубцов, наклоненных вдоль ограничительного канала. Как показано на Фиг. 8А, по мере увеличения Θ от 0° до 141° зубцы внутренней стенки зубчатой поверхности изменяли наклон от наклона в направлении вдоль потока КОК до наклона против направления потока КОК. На Фиг. 7В и 7С показаны производительность и эффективность денудации микрофлюидной системы, имеющей различные углы Θ наклона.

Как показано, оказалось, что производительность не зависит от угла Θ наклона. Однако выяснилось, что насеченные зубцы, имеющие угол Θ наклона $> 90^\circ$, могут иметь возможность полностью “сбривать” клетки короны. Таким образом, на основе этих результатов наиболее эффективный диапазон угла Θ составляет $90^\circ < \Theta < 180^\circ$, что подразумевает диапазон, в котором зубцы наклонены против направления потока КОК. Следует отметить, что скорость течения составляла 1 мл/мин, при этом микрофлюидная система имела 100 повторяющихся ограничительных и расширительных блоков в третьей секции при ширине W_3 ограничительных блоков, равной 90 мкм. Также было замечено, что влияние угла Θ наклона может быть не связано со сдвиговыми напряжениями. По оценкам CFD-моделирования максимальные сдвиговые напряжения составляли 145,3 и 163,5 Па для $\Theta=39^\circ$ и 141° соответственно. В обоих случаях максимальные сдвиговые напряжения воздействовали на первый зубец при входе в ограничительные блоки. Может также существовать минимальное различие в сдвиговых напряжениях при углах наклона от $\Theta=39^\circ$ до 141° для остальных зубцов вдоль ограничительного блока. Сдвиговые напряжения составляли 84,1 Па для зубцов со второго по последний при угле Θ наклона, равном 39° , и 94,7 Па при угле Θ наклона, равном 141° . Следовательно, сдвиговые напряжения могут не быть ответственными за различие в эффективности денудации. Таким образом, для эффективности денудации может быть более важным, чтобы зубцы имели наклон против направления потока КОК (например, $\Theta=141^\circ$), так чтобы насеченные зубцы могли сдирать, счищать или как-то иначе «сбривать» кумулюсные клетки, когда слои кумулюса заполняют пространство между зубцами.

Чтобы дополнительно исследовать роль расширительных блоков в денудации ооцитов, была сконструирована микрофлюидная система, в которой 100 ограничительных каналов в третьей секции были соединены впритык, не имея между собой никаких расширительных каналов. Эта микрофлюидная система имела те же первую и вторую секции, что и рассмотренные ранее со ссылкой на Фиг 2А-2С. Хотя производительность была близка к 100%, эффективность денудации в отсутствие повторяющихся

расширительных блоков стала менее 20%. Таким образом, расширительные блоки, способствующие переворачиванию КОК, являются важными в отношении эффективности денудации. Кроме того, КОК, обработанные этой микрофлюидной системой, обычно имеют внешний вид, характеризующийся обнаженной прозрачной зоной на одной или двух сторонах и клетками кумюлюса- короны, остающимися нетронутыми на других сторонах на двумерном изображении. Это может говорить о том, что в отсутствие расширительных блоков только определенные части поверхности КОК вступают в физическое взаимодействие с внутренней стенкой, а не вся поверхность.

Пример 4- использование множества подканалов

Микрофлюидную систему, имеющую множество подканалов, аналогично микрофлюидной системе 600, рассмотренной выше со ссылкой на Фиг. 4А-4С, использовали для очищения КОК, находящихся во взвешенном состоянии в образце жидкости. Суспензия содержала КОК и дебрис различных размеров. Суспензия была преинкубированная с использованием 0,3 мг/мл гиалуронидазы для освобождения кумюлюсных клеток от ооцитов. Вызывали поступление суспензии через микрофлюидную систему при скоростях течения 3 мл/мин - 5 мл/мин. Первое звено системы включало в себя подканалы шириной 240 микрон. Второе звено системы включало в себя подканалы шириной 140 микрон. Третье звено системы включало в себя подканалы шириной 90 микрон. Каждое звено включало в себя стойки, имеющие насеченные зубцы, наклоненные против направления потока текущей среды.

На ФИГ. 10 показана таблица, демонстрирующая влияние скорости течения на производительность и эффективность денудации микрофлюидной системы, имеющей множество подканалов. Как показано, скорость течения 5 мл/мин приводила к наивысшей производительности (т.е. числу ооцитов, собранных на выходном отверстии, приходящихся на число ооцитов, поступивших во входное отверстие) и эффективности денудации (т.е. числу благополучно денудированных ооцитов, приходящихся на число ооцитов, собранных на выходном отверстии).

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Следует понимать, что хотя изобретение было представлено в соответствии с его подробным описанием, вышеизложенное описание направлено на пояснение, но не ограничение объема изобретения, определяемого объемом притязаний прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем притязаний нижеследующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Система для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток, содержащая:

субстрат; и

канал, содержащий входное отверстие, выходное отверстие, и одно или более звеньев, расположенных последовательно между входным отверстием и выходным отверстием,

при этом каждое звено сообщается по текучей среде с последующим звеном,

при этом каждое звено содержит один или более расширительных блоков и один или более ограничительных блоков,

при этом, по меньшей мере, одно из звеньев содержит один или более ограничительных блоков, каждый из которых имеет две противоположные стенки, при этом, по меньшей мере, одна из двух противоположных стенок содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов.

2. Система по п.1, в которой каждая из двух противоположных стенок в каждом ограничительном блоке содержит множество зубцов, при этом множество зубцов на первой противоположной стенке направлены к множеству зубцов на второй противоположной стенке.

3. Система по п.2, в которой кончики множества зубцов на первой противоположной стенке и кончики множества зубцов на второй противоположной стенке расположены параллельно.

4. Система по любому из пп.2 или 3, в которой расстояние между кончиками зубцов на первой и второй противоположных стенках составляет около диаметра ооцита, подлежащего денудации.

5. Система по п.1, в которой, по меньшей мере, одно из звеньев содержит один или более расширительных блоков, чередующихся с одним или более ограничительными блоками.

6. Система по любому из пп.1-5, в которой один или более из множества зубцов установлены под углом от около 30 градусов до около 90 градусов против направления потока через канал.

7. Система по любому из пп.1-6, в которой, по меньшей мере, одно звено из одного или более звеньев содержит один или более ограничительных блоков, имеющих гладкую внутреннюю поверхность.

8. Система по любому из пп.1-7, в которой, по меньшей мере, один расширительный блок имеет ширину от около 250 до около 600 микрон.

9. Система по любому из пп.1-8, в которой, по меньшей мере, один ограничительный блок имеет ширину от около 100 до около 350 микрон.

10. Система для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток, содержащая

субстрат; и

канал, содержащий входное отверстие, выходное отверстие, и три звена, расположенных последовательно, при этом каждое звено сообщается по текучей среде со следующим звеном,

при этом первое звено содержит группу первых расширительных блоков, чередующихся с первыми ограничительными блоками, при этом первые расширительные блоки имеют первую ширину, а первые ограничительные блоки имеют вторую ширину, и гладкую внутреннюю поверхность;

при этом второе звено содержит группу вторых расширительных блоков, чередующихся со вторыми ограничительными блоками, при этом вторые расширительные блоки имеют третью ширину, а вторые ограничительные блоки имеют четвертую ширину, и гладкую внутреннюю поверхность;

при этом третье звено содержит группу третьих расширительных блоков, чередующихся с третьими ограничительными блоками, при этом третьи расширительные блоки имеют пятую ширину, а третьи ограничительные блоки имеют шестую ширину, и по меньшей мере, две противоположные стенки,

при этом каждая из двух противоположных стенок содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов, расположенных так, что множество зубцов на первой противоположной стенке третьих ограничительных блоков направлены к множеству зубцов на второй противоположной стенке третьих ограничительных блоков, при этом кончики множества зубцов на первой противоположной стенке и кончики множества зубцов на второй противоположной стенке расположены параллельно.

11. Система по любому из пп.1-10, в которой канал имеет высоту около 200-300 микрон.

12. Система по любому из пп.10 и 11, в которой зубцы установлены под углом от около 30 градусов до около 90 градусов против направления потока через канал.

13. Система по любому из пп.10-12, в которой первая ширина составляет от около 250 до около 600 микрон, при этом вторая ширина составляет от около 200 до около 350 микрон.

14. Система по любому из пп.10-13, в которой третья ширина составляет от около 250 до около 600 микрон, при этом четвертая ширина составляет от около 100 до около 250 микрон, а пятая ширина составляет от около 250 до около 600 микрон.

15. Система по любому из пп.10-14, в которой шестая ширина составляет от около 70 до около 120 микрон.

16. Система по любому из пп.10-15, в которой расстояние между кончиками зубцов составляет около 80-110 микрон.

17. Система по п.10, в которой первая ширина составляет около 500 микрон, вторая ширина составляет около 230-260 микрон, третья ширина составляет около 500 микрон, четвертая ширина составляет от около 130 до около 160 микрон, пятая ширина составляет около 500 микрон, шестая ширина составляет от около 90 до около 120 микрон, при этом

расстояние между кончиками зубцов составляет от около 90 до около 110 микрон.

18. Система для очистки ооцитов от присоединенных кумулюсных клеток в образце жидкости, содержащая:

субстрат; и

канал, содержащий входное отверстие, выходное отверстие, и одно или более звеньев, расположенных последовательно между входным отверстием и выходным отверстием,

при этом каждое звено сообщается по текучей среде с последующим звеном,

при этом каждое звено содержит один или более рядов из множества стоек, расположенных поперек канала, при этом стойки в заданном ряду разнесены от соседних стоек в этом ряду для образования подканала между каждой соседней парой стоек,

при этом каждая из множества стоек, по меньшей мере, в одном звене включает в себя пару стенок, выполненных с возможностью быть обращенными либо к противоположной стенке соседней стойки в том же ряду, либо быть обращенными к внутренней стенке канала, при этом, по меньшей мере, одна из стенок на каждой из множества стоек содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов.

19. Система по п.18, в которой каждая из противоположных стенок соседних стоек в ряду содержит множество зубцов, выполненных с возможностью быть направленными друг к другу.

20. Система по п.18 или п.19, в которой, по меньшей мере, один подканал первого звена имеет ширину около 240-260 микрон, при этом первое звено содержит ряды стоек, выполненных с возможностью отфильтровывать дебрис из образца текучей среды.

21. Система по любому из пп.18-20, в которой, по меньшей мере, один подканал второго звена имеет ширину около 140-160 микрон, при этом второе звено содержит ряды стоек, выполненных с возможностью отфильтровывать дебрис из образца текучей среды.

22. Система по любому из пп.18-21, в которой, по меньшей мере, один подканал в третьем звене имеет ширину около 90-110 микрон, при этом третье звено содержит ряды стоек, выполненных с возможностью денудации ооцитов, при этом одна или более стоек в каждом ряду содержит множество насеченных зубцов.

23. Система по п.22, в которой все стойки в третьем звене включают в себя пару стенок, выполненных с возможностью быть обращенными либо к противоположной стенке соседней стойки в том же ряду, либо быть обращенными к внутренней стенке канала, при этом каждая из стенок на каждой из стоек в третьем звене содержит зубчатую внутреннюю поверхность, содержащую множество зубцов.

24. Система по любому из пп.19-23, в которой все подканалы первого звена имеют первую ширину, а все подканалы второго звена имеют вторую ширину, которая меньше, чем первая ширина.

25. Система по любому из пп.18-25, в которой один или более рядов из множества стоек расположены перпендикулярно продольной оси канала.

26. Способ удаления кумулюсных клеток с ооцитов в образце жидкости, при этом способ содержит:

- получение образца жидкости, содержащего один или более ооцитов;
- введение образца жидкости во входное отверстие системы по любому из пп.1-25;
- прохождение потока образца жидкости через одно или более звеньев канала со скоростью течения; и
- извлечение ооцитов из выходного отверстия.

27. Способ по п.26, в котором образец жидкости содержит фолликулярную жидкость.

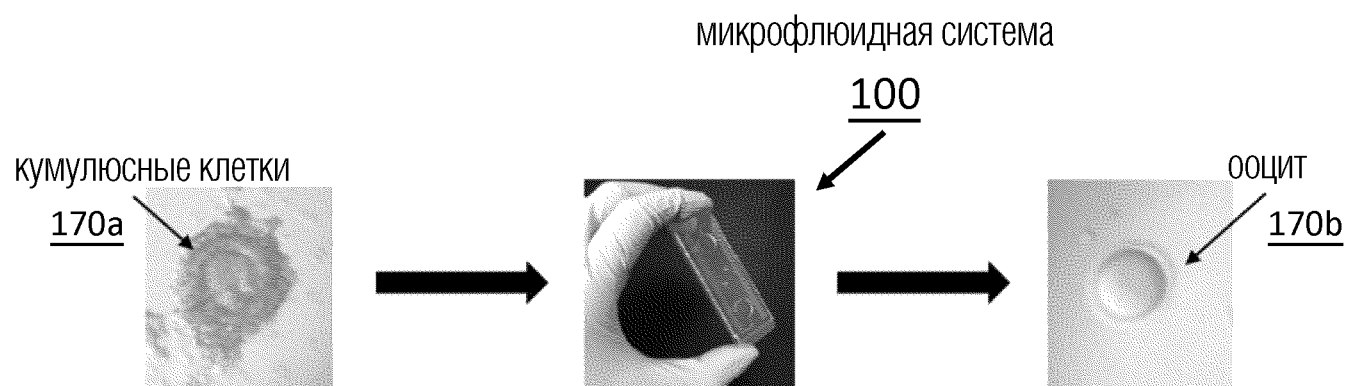
28. Способ по п.26, в котором образец жидкости содержит культуральную среду или буферную среду.

29. Способ по любому из пп.25-28, в котором скорость течения является приблизительно постоянной и составляет от около 0,5 до около 5,0 мл/минуту.

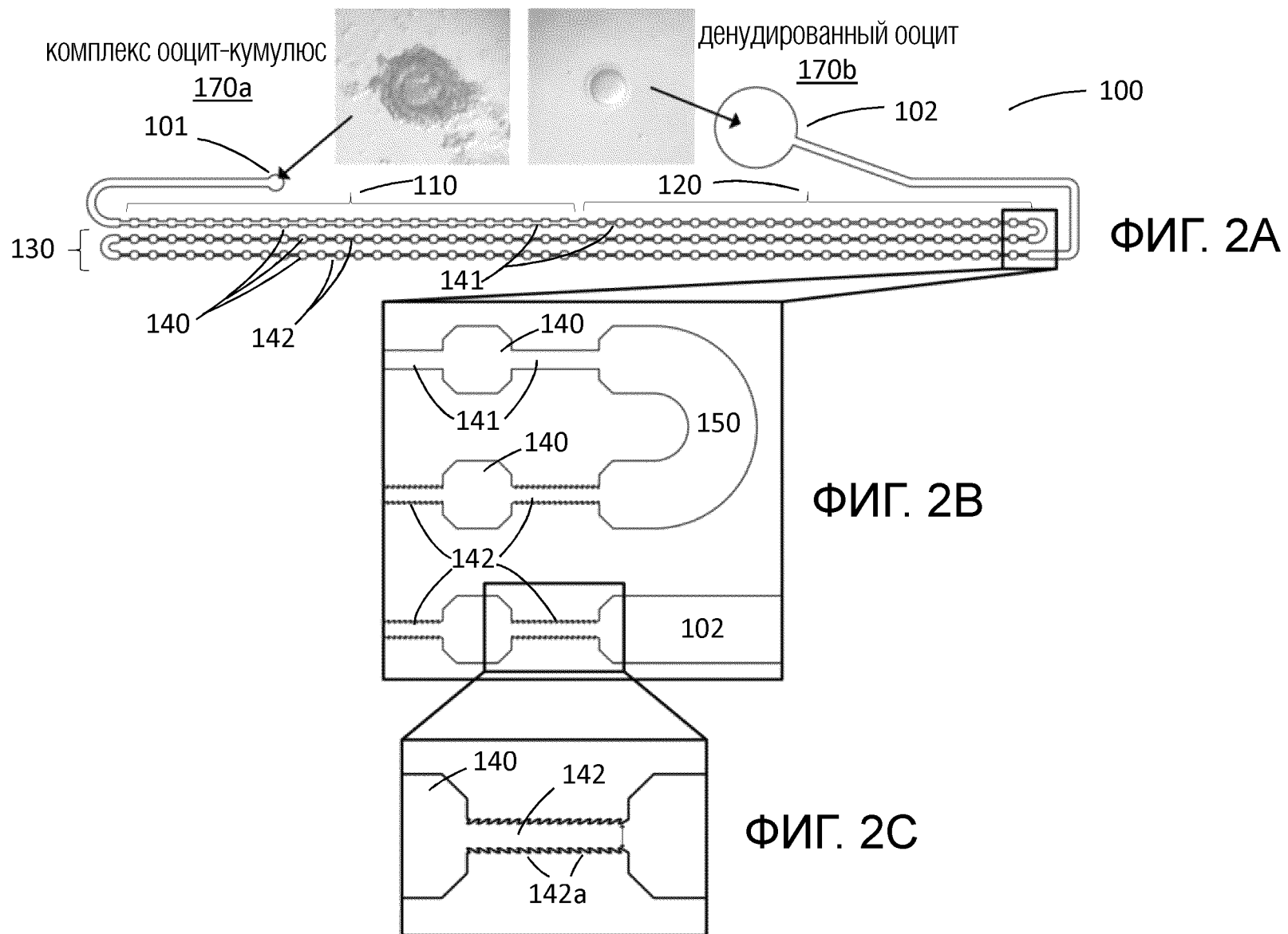
30. Способ по п.29, в котором скорость течения составляет от около 1,0 мл/минуту до около 4,0 мл/минуту.

31. Способ по любому из пп.25-30, в котором ооциты представляют собой ооциты человека, при этом расстояние между кончиками множества зубцов на противоположных стенках составляет около 100-110 микрон.

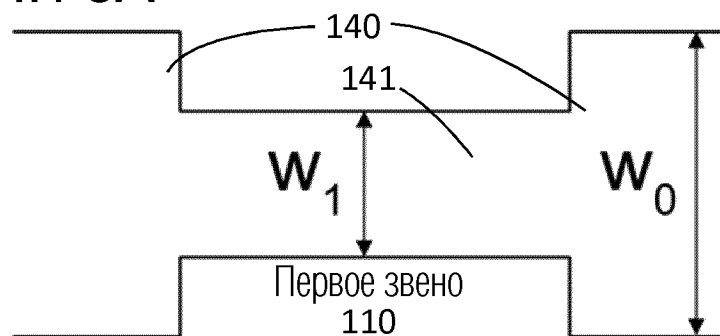
По доверенности



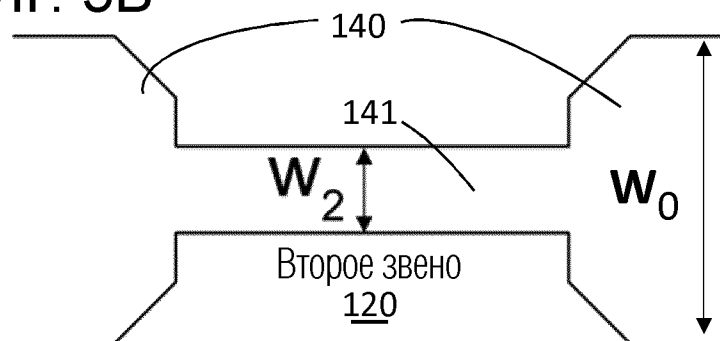
ФИГ. 1



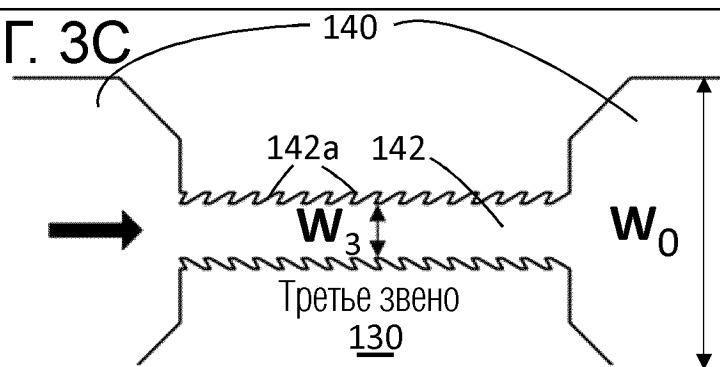
ФИГ. 3А

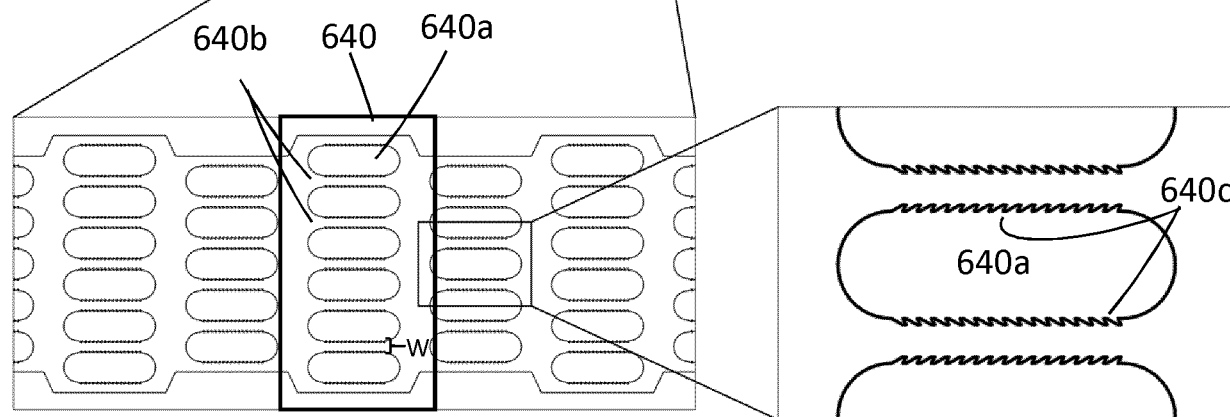
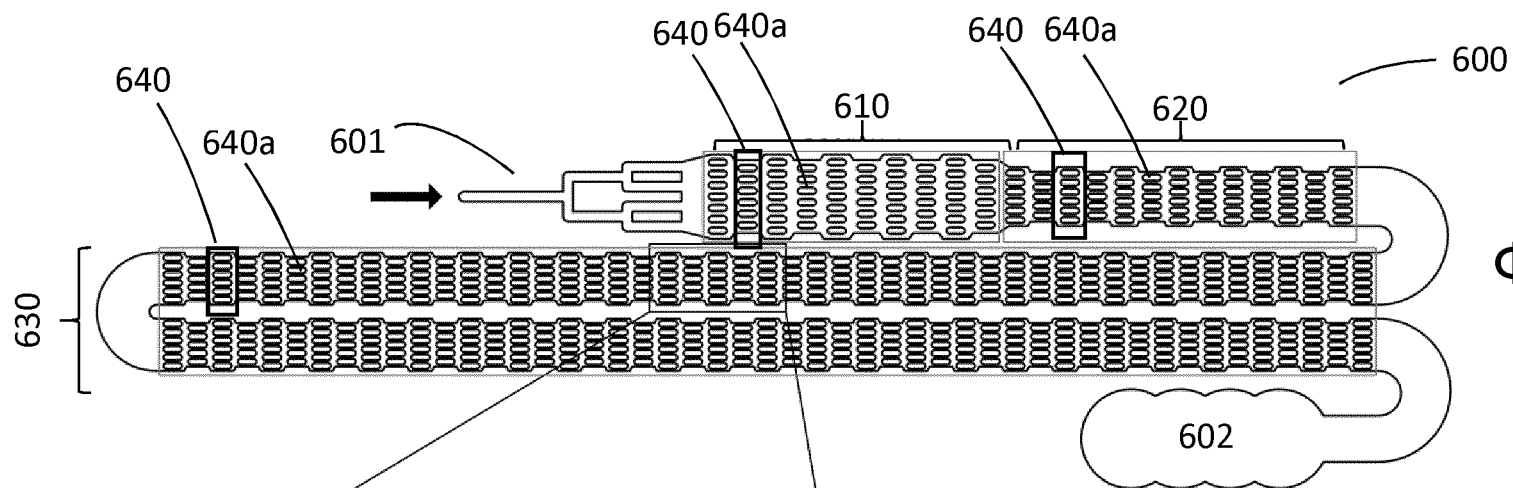


ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

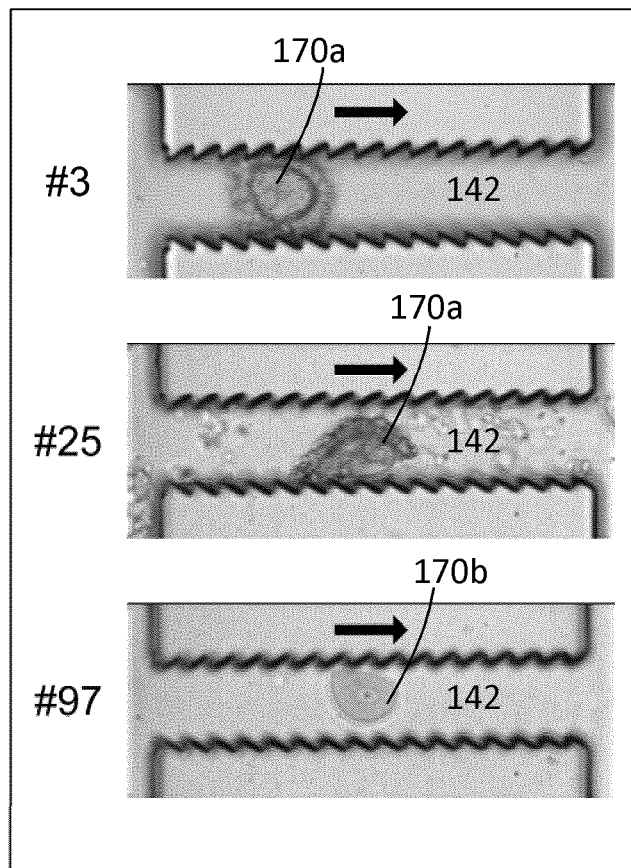




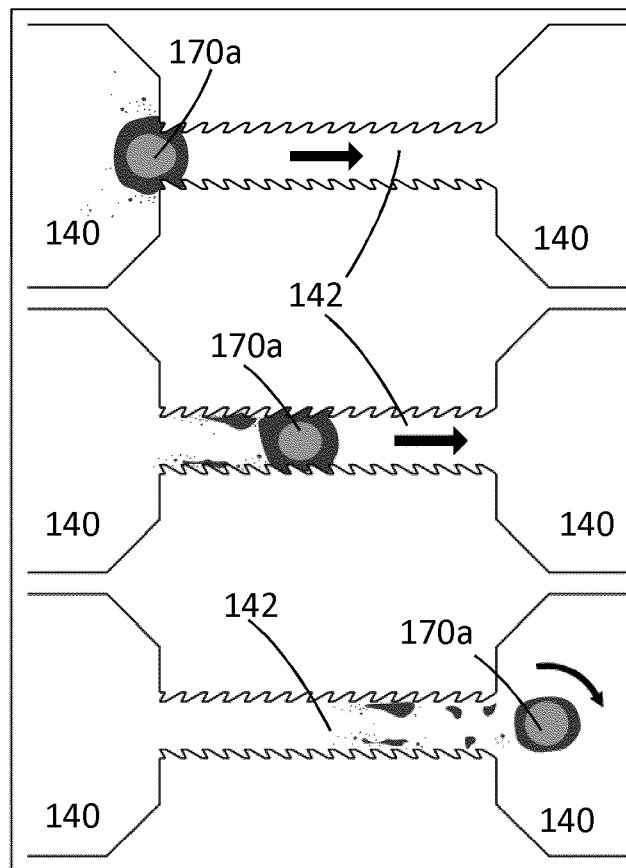
5/10



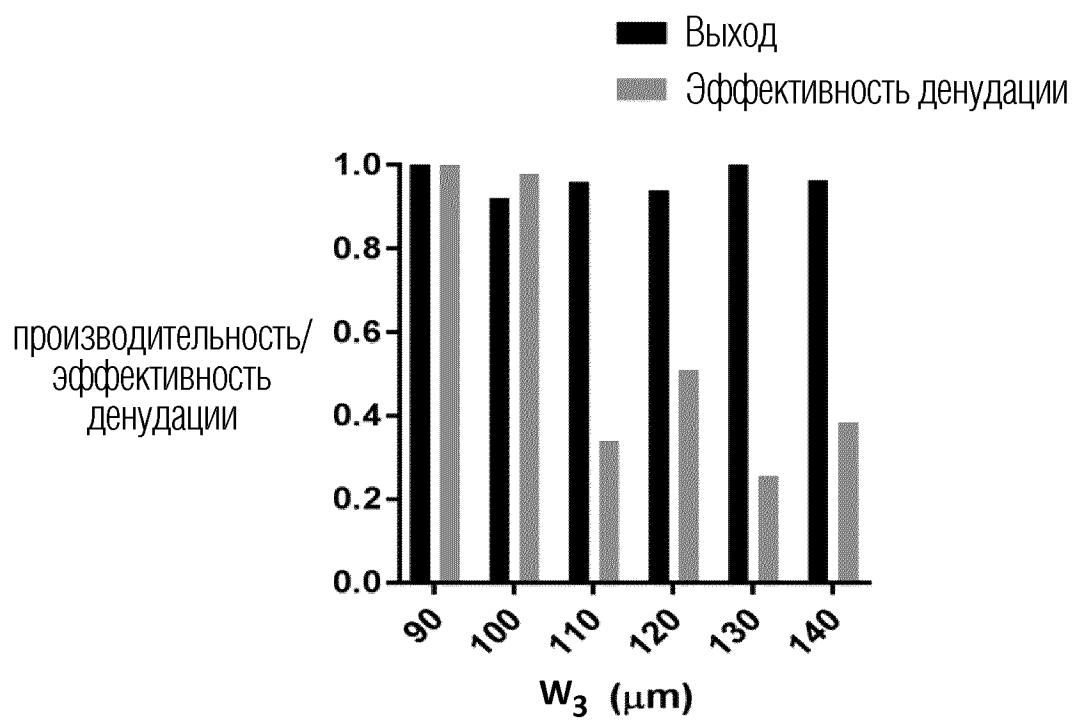
ФИГ. 5



ФИГ. 6А

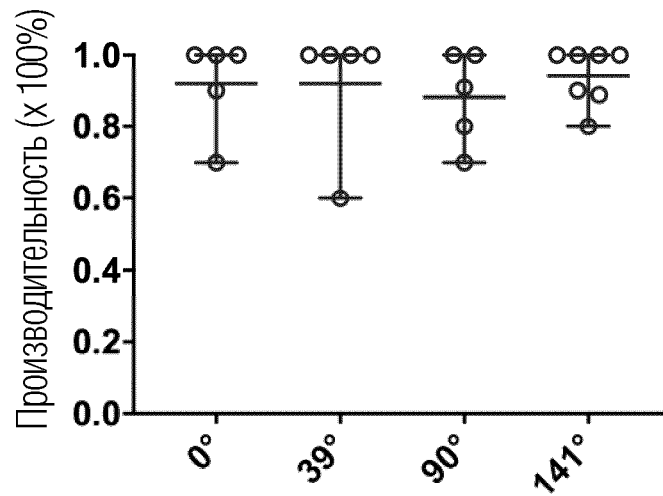
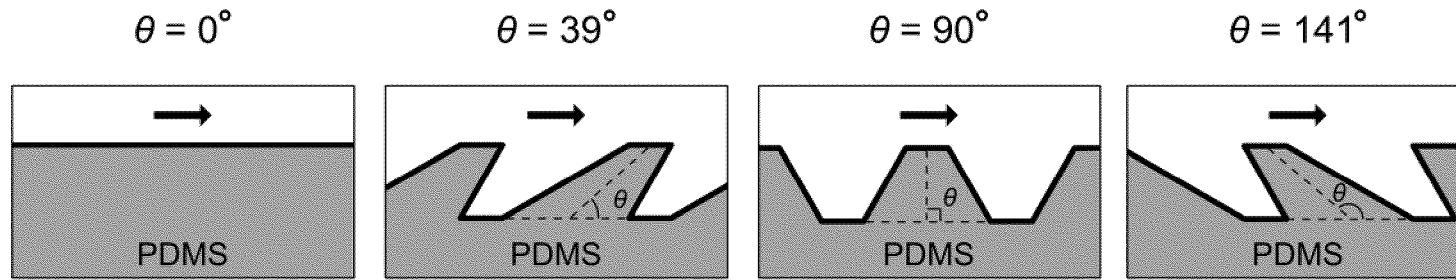


ФИГ. 6В

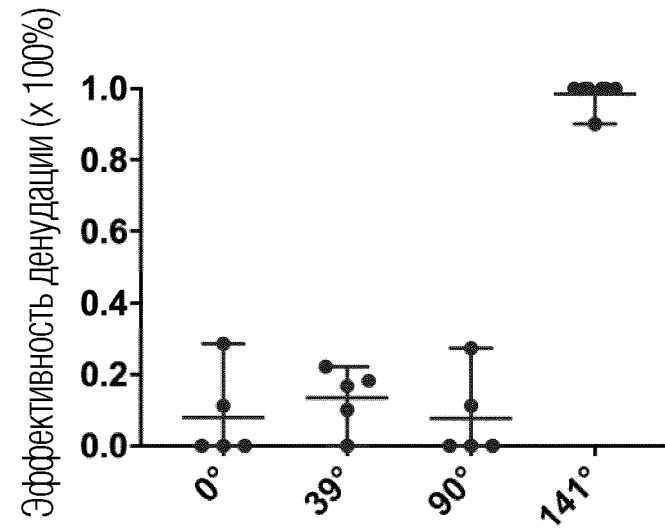


ФИГ. 7

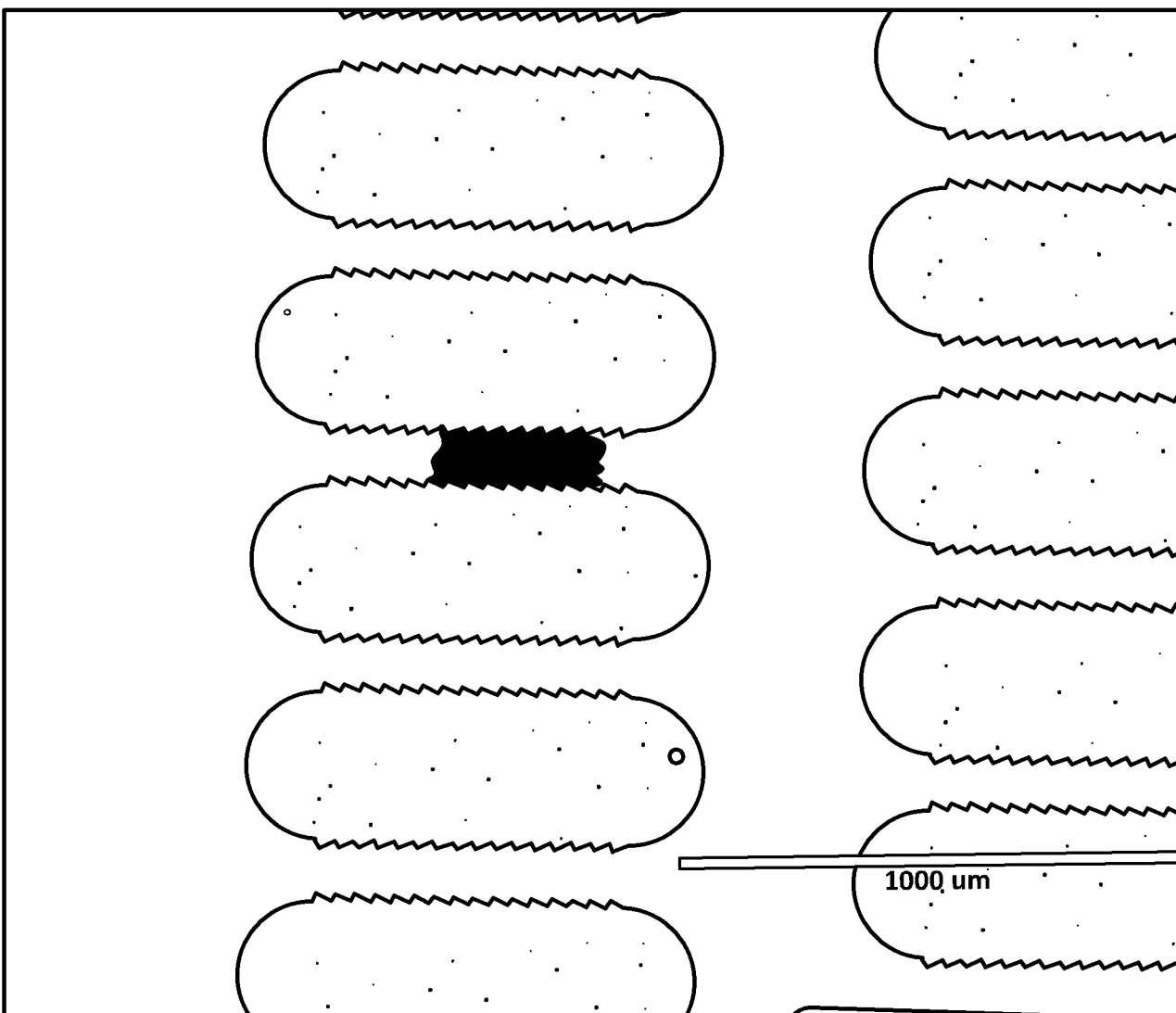
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В



ФИГ. 8С



ФИГ. 9

Скорость течения	число ооцитов (входное отверстие)	число ооцитов (выходное отверстие)	число очищенных ооцитов	производи- тельность	эффективность денудации
5 (мл/мин)	10	9	8	90%	89%
5 (мл/мин)	10	8	4	80%	50%
3 (мл/мин)	10	9	5	90%	56%
4 (мл/мин)	10	10	6	100%	60%
5 (мл/мин)	10	10	9	100%	90%
5 (мл/мин)	31	31	30	100%	97%
5 (мл/мин)	16	16	14	100%	88%
5 (мл/мин)	13	13	12	100%	92%
5 (мл/мин)	15	15	15	100%	100%

10/10

ФИГ. 10