

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 047**

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 35/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2010 E 10724847 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 2577254**

54 Título: **Aparato y método para dispensar células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.06.2015

73 Titular/es:

**ALBERT-LUDWIGS-UNIVERSITÄT FREIBURG
(100.0%)
Fahnenbergplatz
79098 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**KOLTAY, PETER y
YUSOF, DR. AZMI**

74 Agente/Representante:

ARIZTI ACHA, Monica

ES 2 539 047 T3

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

DESCRIPCIÓN

Aparato y método para dispensar células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre.

- 5 La presente invención se refiere a un aparato y un método para dispensar células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre, y, en particular, a un aparato y un método apropiado para dispensar y/o imprimir un número definido de forma precisa de células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre.

10 De acuerdo con el estado de la técnica, pueden detectarse células individuales, manipularse y, en particular, clasificarse por medio de la citometría de flujo (FCM). La citometría de flujo se describe por H.M. Shapiro, "Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques", Revista de Métodos Microbiológicos, vol. 42, páginas 3-16, 2000. La citometría de flujo es una tecnología establecida, proporcionada por diversas empresas comerciales y aplicadas en muchas aplicaciones. En general, un citómetro de flujo tiene cinco componentes principales, una célula de flujo que permite una corriente de líquido, un sistema de medición, un detector y un sistema de conversión
15 analógico a digital (ADC), un sistema de amplificación y un ordenador para el análisis de las señales. La célula de flujo permite que la corriente de líquido pueda usar un fluido envolvente y llevar y alinear las células de manera que pasen en una sola fila, es decir, de una en una, a través de un haz de luz de detección. El sistema de medición usa comúnmente la medición de la impedancia o la conductividad o hace uso de sistemas ópticos. Los sistemas ópticos usados comúnmente pueden comprender lámparas (mercurio, xenón), láseres refrigerados por agua de alta
20 potencia (tal como el argón, kriptón o láseres de colorantes), láseres refrigerados por aire de baja potencia (como el láser de argón a una longitud de onda de 488 nm, láseres HeNe rojos en una longitud de onda de 633 nm, láseres de HeNe verdes o láseres de HeCd (UV)), láseres de diodo (azul, verde, rojo, violeta) para proporcionar señales de luz. El detector y el sistema de conversión analógico a digital generan una dispersión frontal (FSC), una dispersión lateral (SSC), así como señales de fluorescencia de luz y las convierte en señales eléctricas que pueden procesarse
25 por un ordenador. El sistema de amplificación puede ser lineal o logarítmico.

La FCM permite la separación y la clasificación de las células únicas de acuerdo con las propiedades ópticas específicas de alto rendimiento. Sin embargo, la FCM no es capaz de ocuparse de un volumen de muestra muy pequeño (tal como, de 1 a 10 μ l), debido a las condiciones de flujo estacionario que tienen que establecerse dentro
30 del citómetro. Por la misma razón, la FCM no puede entregar un número definido de células vivas en una pequeña alícuota de líquido con un volumen de 100 nl o por debajo. El mecanismo de clasificación de la FCM se basa en un flujo estacionario dentro de la célula de flujo que no pueden encenderse y apagarse en un tiempo suficientemente corto.

35 También hay esfuerzos en la técnica para miniaturizar la FCM en un tamaño más pequeño y más compacto. Se han introducido los citómetros de flujo de laboratorio en un chip (LOAC) (DCA-FCM) cuyo objetivo es proporcionar una FCM de coste relativamente bajo, pequeña y compacta. Se hace referencia a K. Cheung, S. Gawad, y P.Renaud, "Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation", Citometría Parte A, vol. 65A, páginas124-132, 2005 y el documento US 7.294.249 B2. El documento US 7294249 B2 divulga un componente
40 microfluídico y un método en un fluido usando un sustrato que tiene un canal para conducir a su través partículas individuales para clasificar las partículas en un flujo de fluido, en particular en un flujo de un líquido. El componente comprende una zona de preparación de influir y separar específicamente las partículas por medio de dielectroforesis, una zona del canal de medición que tiene al menos dos zonas de detección dispuestas en serie con respecto a la dirección de flujo del fluido, y una zona de clasificación que tiene unos dispositivos de electrodo para
45 clasificar las partículas identificadas en la zona del canal de medición. Por lo tanto, el documento US 7294249 B2 divulga un dispositivo miniaturizado para analizar, contar y clasificar células o partículas que no necesitan un etiquetado de las células. Sin embargo, las tecnologías FCM, ya sean las convencionales o en miniatura, no facilitan localizar las células o partículas seleccionadas para aplicaciones avanzadas como conjuntos de células únicas o la impresión de células y deben considerarse como métodos continuos.

50 Recientemente, la tecnología de impresión de inyección de tinta se ha explotado para entregar las células vivas en lugar de tintas para localizar las células precisamente en patrones deseados, véase T. Xu, J. Jin, C. Gregory, JJ Hickman, y T. Boland, "Inkjet printing of viable mammalian cells", Biomateriales, vol. 26, páginas 93-99, 2005, y S. Moon, S.K. Hasan, Y.S. Song, F. Xu, H.O. Keles, F. Manzur, S. Mikkilineni, J.W. Hong, J. Nagatomi, E. Haeggstrom, A. Khademhosseini y U. Demirci, "Layer by Layer Three-dimensional Tissue Epitaxy by Cell-Laden Hydrogel
55 Droplets" Ingeniería de tejidos Parte C: Métodos, vol. 16, páginas 157-166, 2010. Además, se hace referencia al documento US 2009/0208577 A1. La tecnología de impresión de inyección de tinta permite volúmenes mucho más pequeños de alícuotas, y al mismo tiempo, la impresión resuelta espacial de las células confinadas en las gotas. Se han demostrado varias aplicaciones usando esta tecnología, especialmente en la construcción de tejidos u órganos artificiales, la disposición de células de detección de alto rendimiento de células en el descubrimiento de fármacos, el estudio y el análisis básico de la célula. La tecnología de impresión de inyección de tinta confina a las células en un volumen de líquido que se inyecta en la forma de una gota en vuelo, de manera que ofrece una técnica de manipulación de células no invasiva o mínimamente invasiva. Aunque el concepto de células impresas suspendidas en gotas en vuelo libre se ha presentado anteriormente, el número de células por gota es en general aleatorio, véase

U. Demirci y G. Montesano, "Single cell epitaxy by acoustic picolitre droplets", Laboratorio en un chip, vol. 7, páginas 1139-1145, 2007.

5 El documento US 2008/0286751 A1 divulga un dispositivo dispensador para gotas de microfluidos especialmente para citometría. Un micro-canal principal se extiende entre dos tanques primero y segundo y una suspensión celular homogénea o heterogénea que pasa a través del micro-canal principal. Un segundo micro-canal atraviesa el micro-canal principal y comprende un orificio de inyección. Tras la generación de una onda de presión en el segundo canal, puede expulsarse una gota a través del orificio de eyección. Las mediciones de impedancia y/o los análisis ópticos se usan para medir las propiedades de las células que circulan en el micro-canal principal. Las células o
10 partículas se identifican de acuerdo con las características pertinentes, se detectan eléctricamente y/u ópticamente, en particular por criterios de tamaño, conductividad citoplásmica y/o capacitancia de la membrana. En función de los resultados de la medición, el dispositivo puede programarse para parametrizar un dispositivo de eyección caso por caso. Cuando se detecta una partícula que verifica los criterios específicos, se aplica un impulso de presión al segundo canal y se expulsa una gota a través del orificio de eyección.

15 De acuerdo con el documento US 2008/0286751 A1, las células o partículas se suministran en un canal principal, mientras que el orificio de inyección está dispuesto en un segundo canal. Por lo tanto, las células o partículas se suministran en una corriente perpendicular a la abertura del dispensador, que necesita unos elementos de enfoque de flujo de microfluidos adicionales y un equipo de control de flujo externo como unas bombas de alta precisión. Esto
20 aumenta la complejidad de todo el aparato y necesita de volúmenes considerables de suspensión celular para cebar el aparato completo. El flujo transversal en estrecha proximidad del orificio conduce, además, a la desventaja de que el diseño del orificio se ve comprometido con respecto al proceso de generación de gotas. En particular, el volumen de líquido encerrado entre el orificio y la fuente de presión aplicada para el accionamiento es mayor que para la mayoría de otros dispositivos de dispensación de acuerdo con el estado de la técnica, y los canales de flujo cruzado proporcionan rutas de escape adicionales para el líquido a expulsarse fuera del orificio. Los requisitos de diseño para el diseño del flujo transversal son, por lo tanto, contradictorios con un diseño de orificio óptimo para la
25 generación precisa y eficiente de gotas pequeñas.

30 Además de la técnica anterior citada anteriormente, M. Nakamura, A. Kobayashi, F. Takagi, A. Watanabe, Y. Hiruma, K. Ohuchi, Y. Iwasaki, M. Horie, I. Morita, y S. Takatani, "Biocompatible Inkjet Printing Technique for designed Seeding of Individual Living Cells", Ingeniería de Tejidos, vol. 11, páginas 1658-1666, 2005, y R. Tornay, V. Chapuis, V. Haguët, F. Chatelain, y P. Renaud, "Electrical Detection and Ejection of Beads in a One-Cell-Per-Drop Microdispenser", presentado en la Conferencia de sensores de estado sólido, actuadores y microsistemas de 2007, TRANSDUCTORES 2007, Internacional, de 2007, también divulgan la producción de micro gotas a partir de una
35 suspensión celular suministrada.

La impresión de inyección de tinta de células viables se divulga en el documento US 7.051.654 B2. El documento US 4.318.480 se refiere a un método y un aparato para colocar un punto de formación de gotas en un fluido de inyección de un dispositivo de clasificación electrostático. Finalmente, el documento DE 197 06 513 se refiere a un
40 dispositivo de micro dosificación que usa una cámara de presión y una membrana flexible adyacente a la cámara de presión.

45 El documento GB 1 555 091 A divulga un aparato para el examen automático y la separación de artículos en una suspensión líquida de una forma general. El aparato comprende un dispositivo de exploración de partículas y un generador de gotas que incluye un orificio de formación de chorro localizado en la parte inferior del dispositivo de exploración. Una corriente entra en un anillo de carga de gota y pasa en forma de gotas a través de placas de deflexión. Se genera un flujo continuo de gotas, que se desvía en base a las características detectadas.

50 El documento US 4 318 480 A enseña un método para colocar el punto de formación de gotas en un fluido de inyección de un dispositivo de clasificación electrostática. Las gotas se generan a través de la aplicación de energía vibratoria impartida por un transductor a una corriente de flujo laminar de inyección.

55 El documento WO 2010/004627 A1 se refiere a una identificación de la muestra de ensayo y al dispositivo de dispensación. Una gota de líquido de una forma semiesférica que contiene una muestra de ensayo identificada en la misma entra en contacto con una superficie de una solución de cultivo y se dispensa en la solución de cultivo.

60 El documento EP 0 421 406 A2 se refiere a un aparato y a un método para separar o medir partículas a examinarse en un fluido de muestra. Se divulga una fuente de generación de energía térmica para generar una burbuja en el fluido de muestra para descargar el líquido de muestra que contiene las partículas individuales.

Es el objeto de la presente invención proporcionar un aparato y un método para dispensar un número definido (uno o más) de células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre de una manera sencilla y fiable.

Este objeto se consigue mediante un aparato de acuerdo con la reivindicación 1 y un método de acuerdo con la

reivindicación 11.

La presente invención contempla un aparato para dispensar una o más células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre, que comprende:

5 un dispositivo de generación de gotas a demanda de activación piezoeléctrica configurado para expulsar fuera de un orificio una gota en vuelo libre de una suspensión de células o partículas, comprendiendo el dispositivo de generación de gotas un canal unidireccional sin ramificar que tiene el orificio abierto en un extremo del mismo
10 un dispositivo de detección de información sobre células o partículas localizadas en un volumen de observación de la suspensión dentro del canal unidireccional sin ramificar; y
medios para dirigir una gota expulsada a una primera posición o a una segunda posición en función de la información detectada.

15 Las realizaciones de la invención contemplan un método para dispensar una o más células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre, que comprende:

llenar un dispositivo de generación de gotas a demanda de activación piezoeléctrica con una suspensión que comprende células o partículas, comprendiendo el dispositivo de generación de gotas un canal unidireccional sin ramificar que tiene un orificio en un extremo del mismo;
20 detectar información sobre las células o partículas localizadas en un volumen de observación del dispositivo de suspensión dentro del canal unidireccional sin ramificar; y
expulsar una gota fuera del orificio a una posición primera o segunda en función de la información detectada.

25 Las realizaciones de la invención se basan en el reconocimiento de que pueden dispensarse un número deseado de células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre de una manera fiable detectando información sobre las células o partículas dentro de un volumen de observación dispuesto en un canal unidireccional sin ramificar, un extremo de aguas abajo del cual se representa el orificio. Por lo tanto, la presente solicitud permite un diseño simple de un dispositivo de generación de gotas mientras que, al mismo tiempo, pueden dispensarse un número deseado de células o partículas con una alta fiabilidad.

30 En las realizaciones de la invención, la primera posición puede ser una posición de destino y la segunda posición puede ser una posición de residuos o viceversa.

35 El término "canal unidireccional sin ramificar" está destinado a significar un canal que tiene una única entrada y una única salida sin ninguna ramificación, de manera que un fluido que entra en el canal unidireccional en la entrada debe, en un funcionamiento normal, dejar el canal unidireccional a través de la salida. De acuerdo con las realizaciones de la invención, el orificio de salida por el que se expulsan las gotas en vuelo libre forma la salida del canal unidireccional.

40 De acuerdo con las realizaciones de la invención, el dispositivo de generación de gotas se controla para expulsar fuera del orificio las gotas en vuelo libre en repetidas ocasiones, en el que la gota en vuelo libre se dirige a una primera posición en el caso de que la información detectada indique que la suspensión dentro de los volúmenes de observación cumple una condición predeterminada, mientras que la gota en vuelo libre se dirige a una segunda posición si este no es el caso. En las realizaciones de la invención, la condición predeterminada es que esté dispuesta solo una célula o partícula dentro del volumen de observación.

45 Por consiguiente, las realizaciones de la invención permiten la separación, la clasificación y la impresión sin contacto de un número definido de células, tales como células y/o partículas biológicas vivientes. En las realizaciones de la invención, las gotas en vuelo libre pueden ser micro gotas que tienen un volumen de unos pocos microlitros o por debajo, tal como menos de 1 μ l, o incluso menos, tal como varios cientos de picolitros. Las realizaciones de la invención permiten dispensar determinadas células únicas confinadas en tales gotas por un proceso de generación de gotas de caída a demanda. Las realizaciones de la invención permiten la impresión como por inyección de tinta de células individuales únicas sobre sustratos arbitrarios de numerosas aplicaciones que van desde la investigación básica a la ingeniería de tejidos.

55 Las realizaciones de la invención superan las deficiencias de la técnica anterior proporcionando un dispositivo dispensador de gotas suministrado con una solución de células o solución de partículas y un medio de medición que detecta las células o partículas en el interior del dispositivo de dispensación cerca del orificio.

60 Las realizaciones de la invención proporcionan un enfoque para producir gotas a demanda que contengan solo una célula que puede imprimirse como por inyección de tinta sobre sustratos arbitrarios.

Las realizaciones de la invención se dirigen a un aparato y a un método para encapsular células vivas únicas o partículas en gotas de líquido de tamaño de micro, nano o picolitros. Esta gota de líquido que lleva una sola célula o

una sola partícula puede expulsarse desde el orificio de un generador de gotas en la forma de una gota en vuelo libre para permitir la impresión como por inyección de tinta de células o partículas únicas. Mediante el uso de tales realizaciones de la invención, pueden separarse las células únicas o partículas únicas y pueden producirse alícuotas de un número definido de forma precisa de células.

5 Las realizaciones de la invención contemplan un método para clasificar una mezcla heterogénea de células/partículas de acuerdo con sus propiedades específicas. Mediante esta característica de clasificación en combinación con la capacidad de impresión como por inyección de tinta, las realizaciones de la invención pueden superar muchas limitaciones de la tecnología FCM actual en el intervalo de bajo volumen y bajo número de células descrito anteriormente.

10 Por consiguiente, las realizaciones de la presente invención satisfacen la gran necesidad fallada en la técnica de un enfoque capaz de dispensar una sola célula o partícula por gota impresa, para un volumen de gota significativamente menor que 1 μ l, por ejemplo, con una alta fiabilidad. Contrariamente a las tecnologías FCM conocidas, que tienen que considerarse como tecnologías de clasificación y de separación de células continuas, las realizaciones de la invención permiten la clasificación y la impresión a demanda de una célula o partícula y pueden ocuparse de volúmenes de célula en suspensión muy pequeños. Por lo tanto, las realizaciones de la invención no solo contemplan la capacidad de separar y clasificar las células vivas, sino que además la oportunidad de suministrar "a demanda" células individuales. Esto significa que un número definido de células/partículas (tal como de 1 a N) pueden entregarse en una alícuota de líquido. Además, las realizaciones de la invención permiten producir alícuotas mucho más pequeñas que las alcanzables con la FCM baja a un intervalo de volumen de varios cientos de picolitros y por abajo. Por otra parte, de acuerdo con las realizaciones de la invención, las células tales como las células vivas, o las partículas se encapsulan en gotas en vuelo libre de tal manera que pueden imprimirse sobre sustratos de una forma de caída a demanda y sin contacto.

25 La invención descrita en el presente documento supera los inconvenientes del documento US 2008/0286751 A1, es decir, el requisito para los elementos de control de flujo externos para el flujo del canal transversal y el uso de un dispositivo accionado de presión específica con la debilidad descrita con respecto a la generación de gotas, permitiendo el uso de dispositivos generadores de gotas "arbitrarias" que muestren los canales unidireccional sin ramificar a partir del que se expulsan las gotas.

Para una descripción detallada de las realizaciones ejemplares de la invención, se hará ahora referencia a los dibujos adjuntos en los que:

35 La figura 1 muestra una vista general esquemática de una realización de la invención;
 La figura 2 muestra una vista esquemática de una realización de una parte de salida de un dispositivo de generación de gotas;
 La figura 3 muestra una vista esquemática de otra realización de una parte de salida de un dispositivo de generación de gotas;
 40 La figura 4 muestra un diagrama de una realización de un método de la invención;
 Las figuras 5a y 5b muestran vistas esquemáticas de una realización de unos medios para dirigir una gota expulsada a una primera posición o a una segunda posición;
 Las figuras 6a y 6b muestran vistas esquemáticas de otra realización de unos medios para dirigir una gota expulsada a una primera posición o a una segunda posición;
 45 Las figuras 7a y 7b muestran vistas esquemáticas de otra realización de unos medios para dirigir una gota expulsada a una primera posición o a una segunda posición; y
 Las figuras 8a y 8b muestran vistas esquemáticas de una realización adicional de unos medios para dirigir una gota expulsada a una primera posición o a una segunda posición.

50 La figura 1 muestra una realización de un aparato para dispensar una o más células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre. El aparato comprende un dispositivo de generación de gotas 10 que comprende un canal unidireccional sin ramificar 12 que tiene un orificio o abertura 14 en un extremo del mismo. El aparato comprende además un dispositivo 16, 18 de detección de información sobre las células o partículas localizadas en un volumen de observación de una suspensión dentro del canal unidireccional sin ramificar 12. Se proporcionan los medios 20 para dirigir una gota expulsada a una primera posición 22 o a una segunda posición 24 en función de la información detectada.

60 De acuerdo con la realización mostrada en la figura 1, la primera posición 22 y la segunda posición 24 se proporcionan en un soporte común 26, en el que los medios 20 para dirigir una gota expulsada a la primera posición 22 o a la segunda posición 24 comprenden una etapa mecánica configurada para mover el portador común 26 en relación con el orificio 14, de manera que una gota expulsada (indicada por una flecha 28) pueda dirigirse a la primera posición 22 o a la segunda posición 24. Tales medios para dirigir se muestran en la figura 1 con fines ejemplares solamente y pueden sustituirse por cualquier otro medio adecuado tales como los descritos en el presente documento con respecto a las figuras 5a a 8b.

Se proporciona un controlador 30 para controlar el funcionamiento del aparato, y con este fin, está conectado al dispositivo de generación de gotas 10, al dispositivo 16, 18 de detección información, y a los medios 20 para dirigir. La primera posición puede ser una posición de destino y la segunda posición puede ser una posición de residuos o viceversa.

5 En funcionamiento, el dispositivo de generación de gotas 10 se llena con una suspensión que comprende células, tales como células o partículas vivas, de tal manera que como para formar un menisco en el orificio 14. Por consiguiente, se detecta la información sobre las células o partículas localizadas en el canal unidireccional sin ramificar 12, tal como por un sensor óptico que comprende una fuente de luz 16 y un detector óptico 18. La información detectada puede comprender al menos una de entre la presencia, el número y la propiedad de las células/partículas localizadas en el volumen de observación. En función de la información detectada, los medios 20 para dirigir se controlan para alinear o la primera posición 22 o la segunda posición 24 con el orificio 14. Por consiguiente, se acciona el dispositivo de generación de fluido 10 para expulsar una gota en vuelo libre que o se dirige a la primera posición 22 o a la segunda posición 24.

15 En las realizaciones de la invención, el generador de gotas 10 puede ser un estado del generador de gota de la técnica para producir micro gotas a partir de una suspensión celular suministrada. El dispositivo de generación de gotas puede ser un dispositivo de inyección de tinta, un dispensador piezoeléctrico o cualquier otro generador de gota adecuado como se describe, por ejemplo, en los documentos de la técnica anterior citados en la parte introductoria. En las realizaciones de la invención, sin pérdida de generalidad, el generador de gotas puede trabajar de acuerdo con el principio descrito en el documento DE 197 06 513 A1.

25 Con el fin de controlar el número de células por gota, las realizaciones de la presente invención hacen uso de un dispositivo 16, 18 de detección el estado de la suspensión celular cercana al orificio 14 en el interior del generador de gotas 10. En las realizaciones de la invención, este dispositivo detector puede ser una fuente de láser 16 y un fotodiodo 18 como se muestra en la figura 1. En las realizaciones alternativas, el dispositivo de medición puede implementarse mediante un sensor de impedancia, tal como se divulga, por ejemplo, en el documento US 2008/0286751 A1. En otras realizaciones, el dispositivo de detección puede implementarse haciendo uso de una cámara óptica. Básicamente, cualquier dispositivo de detección o medio de medición puede aplicarse de manera que puede determinar una información sobre las células/partículas dentro del volumen de observación, tal como el estado de la suspensión celular en el interior del generador de gotas en términos de al menos una de entre un número, el tamaño, la posición, el tipo, el color, o cualquier otra propiedad de las células/partículas dentro del volumen de observación del generador de gotas. En las realizaciones de la invención, el dispositivo de detección puede estar formado por una cámara óptica con lentes de aumento adecuadas para entregar imágenes de las células/partículas en el interior del generador de gotas, de manera que las propiedades de las células o partículas localizadas en el volumen de observación de la suspensión pueden derivarse haciendo uso de técnicas conocidas de procesamiento de imágenes. En particular, la cámara (o en un caso general, el dispositivo de detección) observa el volumen de observación, es decir, una región de interés, cercana al orificio. Hay varias formas de seleccionar y definir la región de interés. En las realizaciones de la invención, la región de interés, y por lo tanto, el volumen de observación, puede definirse por el volumen de líquido que se expulsa desde el generador de gotas con el proceso de dispensación posterior. La región de interés puede ser más grande, pero no debería ser menor que este volumen para permitir un buen rendimiento. Para un dispositivo de generación de gotas específico, la forma, el tamaño y la posición de la región de interés pueden determinarse mediante experimentos o simulaciones numéricas. La región de interés puede definirse de manera que cualquier célula/partícula que resida en la región de interés será expulsada fuera del orificio cuando se genere una gota. Por lo tanto, la salida del dispositivo de detección, tal como la cámara, puede usarse para predecir cuántas (0 a N) células serán expulsadas por el próximo evento de dispensación de gotas.

50 La figura 2 muestra una parte de salida 40 de un dispositivo de generación de gotas que comprende un canal fluido 42 y un orificio 44. El canal fluido 42 se llena con una suspensión 46, tal como una suspensión de amortiguación, que comprende las células 48, tal como células vivas. Una región de interés (o el volumen de observación) 50 se indica en la figura 2. Por otra parte, las gotas de líquido en vuelo libre expulsadas 52 que encapsulan las células únicas 48 se muestran en la figura 2. Como se muestra en la figura 2, el canal fluido 42 comprende una sección de enfoque de flujo del fluido 54 y una sección de detección de célula única 56. Un dispositivo de detección (no mostrado en la figura 2) está configurado para detectar información sobre las células, tal como la presencia de células, dentro de la sección de detección de célula única, y para ser más específicos, dentro de la región de interés 50. La sección de detección de célula única 56 representa un canal unidireccional sin ramificar, en el que un flujo de suspensión celular, indicado por las flechas 58, entra desde la parte superior. El canal fluido 42 puede llenarse mediante fuerzas capilares, la gravedad, o si es necesario, cualquier otro medio de presión adicional. El canal fluido 42 puede estar conectado a un depósito de fluido para rellenar el canal fluido 42 cuando se expulsan las gotas desde el orificio 44.

Como se desprende de la figura 2, el volumen de observación está dentro de la parte de la suspensión celular 46, que está localizada en el canal unidireccional sin ramificar 56.

Por supuesto, la región de interés puede definirse también de una manera diferente, considerando el tamaño y la posición de las células/partículas en un modelo de dinámica de fluidos más sofisticado del proceso de generación de gotas, tal como mediante simulaciones CFD. Los modelos más sofisticados pueden permitir una determinación más precisa del número de células/partículas que será expulsado del orificio con el proceso posterior de dispensación de gotas. Tales modelos pueden hacer uso del perfil de flujo en el interior del generador de gotas en la proximidad del orificio para estimar la posición, el tamaño, la forma y la localización de la región de interés. Por razones de simplicidad, como se muestra en la figura 2, se usará a continuación una definición de la región de interés como un ejemplo. En las realizaciones de la invención, la región de interés 50, y por lo tanto, el volumen de observación, se selecciona para ser ese volumen, que se expulsa del dispositivo de generación de gota en una eyección posterior.

Independientemente de la definición específica de la región de interés, en las realizaciones de la invención, se realiza la medición de la distribución de las células/partículas en la región de interés para predecir el número de células/partículas en la siguiente gota a expulsarse del orificio. Esta predicción en base a la medición realizada anteriormente a cada gota liberada puede usarse para controlar el aparato en la manera de la invención.

De acuerdo con las realizaciones de la invención, la capacidad de detectar y analizar células o partículas únicas se mejora alineando las células o partículas, de una en una para que fluyan a través de la zona de detección de la región de interés. Para este fin, se proporciona el flujo de fluido enfocado en la sección 54 de la figura 2, reduciendo la geometría del canal de manera que su sección transversal de flujo tenga dimensiones (tamaño/anchura) en el orden del diámetro de las células o partículas, en general, ligeramente mayor que el diámetro de las células o partículas. Por lo tanto, las células o partículas pueden hacerse fluir en una sola fila, es decir, de una en una, a través de la sección de detección de célula única 56.

Se muestra una realización alternativa para una integración de un efecto de enfoque de flujo con un dispositivo de generación de gotas en la figura 3. El dispositivo de generación de gotas comprende una parte de enfoque de flujo 60, una parte de generación de gota 62 y una parte de orificio 64 que tiene un orificio 44. Se suministra una suspensión de célula o partícula 66 a través de un canal central 68 y unos flujos envolventes 70 de enfoque hidrodinámico que se suministran a través de unos canales laterales 72. Mediante tal disposición, el flujo de fluido puede expresarse utilizando el enfoque de flujo hidrodinámico de manera que se forme una corriente que comprende unas dimensiones en el orden de magnitud del diámetro de la célula o partícula, y por lo tanto, las células 48 fluyen de una en una a través de la parte de generación de gotas 62 y de la parte de orificio 64. En la realización mostrada en la figura 3, la región de interés puede disponerse en algún lugar a lo largo de la parte de generación de gotas y la parte de orificio, preferentemente, tan cerca como sea posible del orificio 44.

En aún otras realizaciones, pueden usarse las técnicas de dielectroforesis para hacer que las células o partículas fluyan en una sola fila.

Pueden disponerse accionadores convencionales (no mostrados en las figuras 2 y 3) en una posición apropiada, tal como en la parte de generación de gotas 62, para efectuar la expulsión de una gota en vuelo libre fuera del orificio 44 cuando se accionan los mismos.

El dispositivo de detección, tal como la cámara, y el generador de gotas pueden controlarse por un sistema de control adecuado, tal como el controlador 30, que puede implementarse de una manera apropiada por hardware o software. En general, el sistema de control puede implementarse usando un dispositivo informático adecuado que incluya software y algoritmos apropiados de tal manera que pueda activarse la eyección de gotas en función de los resultados de la medición realizada por el dispositivo de detección en el interior de la región de interés. En general, la posición en la que se expulsa una gota, está en función de los resultados de la medición. En las realizaciones de la invención, si la medición muestra que solo se expulsará una célula o partícula en la siguiente expulsión, la gota se expulsa a una primera posición, y si la medición muestra que se expulsará otro número de células o partículas en la siguiente expulsión, la gota se expulsará a una segunda posición, tal como a un depósito de residuos.

En general, la información sobre las células o partículas puede comprender al menos una de entre la presencia de células o partículas, el número de células o partículas y/o cualquier propiedad específica de las células o partículas. Las propiedades específicas de las células o partículas pueden incluir, por ejemplo, el tamaño o el color de las células o partículas.

Una realización de un algoritmo para permitir la liberación controlada de gotas con una célula/partícula por gota se muestra en la figura 4.

Después de llenar el generador de gotas con una suspensión que incluye células, tales como células o partículas vivas, se activa el generador de gotas para dispensar una gota en la etapa 100. Durante esta dispersión, el medio para dirigir se controla de tal manera que la gota expulsada se entrega en un depósito de residuos. Para este fin, puede usarse cualquier medio adecuado de posicionamiento mecánico, un obturador mecánico o una desviación eléctrica o neumática de las gotas como se explica a continuación con respecto a las figuras 5 a 8. Después de esto,

en la etapa 102, para cada gota se graba el estado de la distribución de la célula/partícula dentro de la región de interés, es decir, la región de observación, y el número de células que se ha predicho que se expulsarán dentro de la siguiente gota. En esta realización, el número de células/partículas dentro de la región de interés es la medida para determinar el número de células/partículas a dispensar con la gota posterior. Por otra parte, en esta realización el número de células/partículas dentro de la región de interés es la información, en base a la que se ha tomado la decisión de en qué posición se expulsa la gota. En las realizaciones de la invención, el número de células en la región de interés puede obtenerse fácilmente a partir de una imagen de cámara mediante un software de procesamiento de imágenes automático para producir el resultado de la medición, es decir, el número de células/partículas dentro de la siguiente gota a dispensarse, $N = 0, 1, 2, \dots$. Si la medición de la distribución de células/partículas dentro de la región de interés produce exactamente una partícula a expulsarse por la dispensación posterior, es decir, $N = 1$, se detiene la dispensación repetida de gotas a la posición de residuos y la siguiente gota se entrega a una posición de destino activando una expulsión de gota única. Para ello, la entrega de gotas tiene que cambiarse desde la posición de residuos a la posición de destino por los medios para dirigir, que pueden denominarse como medios de cambio. En función de la solución técnica para este proceso de cambio, o un obturador tiene que abrirse, un mecanismo de desviación neumática/eléctrica tiene que detenerse, el generador de gotas tiene que moverse desde la posición de residuos a la posición de destino por un movimiento mecánico, o los portadores de destino tienen que moverse para alinear la posición de destino con el generador de gotas. Esto se indica en la etapa 104 como que se cambia a la posición de destino (x_i, y_i) . Por consiguiente, se dispensa una única gota que incluye una única célula/partícula en la etapa 106. Si se determina en la etapa 102 que el número de células/partículas dentro de una gota es diferente de 1, el algoritmo salta de nuevo a la etapa 100 y la siguiente gota se expulsa a la posición de residuos.

Una vez que la gota que contiene la única célula se ha entregado en la posición de destino en la etapa 106, se inicia de nuevo el algoritmo desde el principio. Si la concentración de suspensión celular se elige apropiadamente, el número de gotas entregadas en la posición de residuos durante una iteración puede ser pequeño, tal como de 0 a 6, y la producción de gotas entregadas al destino puede ser mayor que un 50 % en promedio. Dada una alta frecuencia de dispensación alcanzable con los generadores de gotas normales, tal como $f > 1000$ Hz, y siempre que la cámara, el mecanismo de desviación, el software de control y las fases mecánicas sean lo suficientemente rápidos, las gotas pobladas con células únicas pueden imprimirse con frecuencias en el orden de varios cientos de Hz que permiten diversas aplicaciones de impresión y manipulación con un rendimiento razonable.

Se han realizado experimentos imprimiendo células de levadura únicas en un gel de Agarosa con el método descrito. Para ser más específicos, se han impreso células *S.cerevisiae* únicas en medios de cultivo. El experimento ha mostrado que las células únicas pueden imprimirse con una alta fiabilidad usando el enfoque de la invención.

A continuación, se explican unas implementaciones específicas de medios para dirigir las gotas expulsadas a diferentes posiciones en referencia a las figuras 5 a 7. Los medios para dirigir pueden estar configurados para dirigir las gotas generadas en una posición específica para (i) discriminar respectivamente la clasificación de las diferentes células o partículas y (ii) recoger las células o partículas destino en las localizaciones prescritas (iii) imprimir patrones celulares de dos o tres dimensiones con una resolución de célula única.

En las realizaciones de la invención, puede usarse una fase motorizada lineal que comprenda al menos un eje que proporcione un movimiento de traslación preciso para localizar el generador de gotas 10, y por lo tanto, el orificio 14 en las posiciones predefinidas. En las figuras 5a y 5b, tal fase motorizada se indica de manera esquemática por una flecha 110. De acuerdo con la figura 5a, la fase 110 se controla para localizar el generador de gotas 10 por encima de una primera posición 112, que puede representar una posición de residuos, tal como un depósito de residuos. De acuerdo con la figura 5b, la fase 110 se controla para localizar el generador de gotas 10 por encima de un portador de destino 114, de tal manera que se expulsa una gota 52 a una posición destino deseada x en el portador de destino 114. Como puede derivarse a partir de las figuras 5a a 5b, el generador de gotas puede moverse con respecto al portador de destino 114 de tal manera que pueden expulsarse las gotas únicas 52 a una pluralidad de posiciones de destino deseadas, tal como para contemplar un conjunto de gotas, y por lo tanto, células en el soporte de destino 114. Por lo tanto, en la realización de las figuras 5a y 5b, se logra dirigir las gotas cambiando la gota al menos entre dos posiciones definidas, es decir, una posición de residuos y una única, o como se muestra en las figuras 5a y 5b, múltiples posiciones de destino.

Se muestra otra realización en la figura 6a y 6b. De acuerdo con esta realización, el generador de gotas 10 está montado de forma giratoria como se indica por las flechas 120. El generador de gotas puede hacerse girar alrededor de un eje de rotación que está localizado en un extremo o en un centro del dispositivo de generación de gotas. La rotación puede efectuarse por cualquier medio mecánico, eléctrico o neumático adecuado. Como se muestra en las figuras 6a y 6b, pueden usarse dos posiciones definidas para dispensar las gotas 52. En la figura 6a, el generador de gotas está colocado para expulsar gotas 52 a una posición 112, que puede ser una posición de residuos. Puede generarse una dispensación continua de gotas con el generador de gotas dirigida a la posición A para liberar células o partículas no deseadas hasta que el dispositivo de detección reconozca una o más células o partículas que tienen una propiedad deseada. Tras la generación de una señal de detección correspondiente, el generador de gotas se

hace girar a una posición mostrada en la figura 6b, de tal manera que el orificio 14 se lleva de una posición para expulsar gotas a una posición de destino en el soporte de destino 114, para liberar la célula o partícula seleccionada. Una fase lineal motorizada como se indica por las flechas 122 puede proporcionarse para efectuar un movimiento de traslación de zona de destino 114 de tal manera que pueden expulsarse las gotas a diferentes posiciones de destino en el portador de destino 114.

Las figuras 7a y 7b muestran otra realización, en la que los medios para dirigir comprenden un obturador mecánico 130. El obturador mecánico 130 puede girar alrededor de un eje 132 de manera que el obturador 130 puede colocarse entre el orificio 14 y el portador de destino 114 como se muestra en la figura 7a, y puede retirarse de un espacio entre el orificio 14 y el portador de destino 114, como se muestra en la figura 7b. Una vez más, puede proporcionarse una fase lineal motorizada 122 configurada para mover el portador de destino 114. Siempre y cuando no se detecte una propiedad deseada de las células o partículas, el obturador 130 se controla para estar en la posición mostrada en la figura 7a, y las gotas 52 se expulsan al obturador 130, que puede estar en una posición de residuos. Tras la detección de una propiedad deseada, el obturador 130 se mueve a la posición mostrada en la figura 7b y una gota 52 que tiene una célula/partícula con la propiedad deseada se expulsa sobre el soporte de destino 114. Por lo tanto, en esta realización, se usa un obturador mecánico para bloquear las gotas no deseadas que no contienen células/partículas que tienen la propiedad deseada, tales como sin ningún conteniendo o más de una célula o partícula.

Las figuras 8a y 8b muestran una realización de un dispositivo para dirigir que comprende medios de succión neumática. Para ser más específicos, se proporciona un colector de succión neumática 140 localizado adyacente al orificio 14 del generador de gotas 10 para succionar gotas que llevan células o partículas no deseadas. El mecanismo de succión puede generarse conectando el colector a una bomba de vacío o a un dispositivo que cree una presión por debajo de la presión atmosférica. Un gradiente de presión negativo entre el colector y el ambiente provoca que las gotas se desvíen en el colector como se muestra en la figura 8a. Por lo tanto, las gotas que contienen células o partículas no deseadas pueden dirigirse en el colector, que puede representar una posición de residuos. Una vez que el sensor detecta la célula o partícula destino, el mecanismo de succión del colector 140 se desactiva y la célula o partícula seleccionada se expulsa a la posición prescrita en el soporte de destino 114. De nuevo, puede proporcionarse una fase 122 lineal motorizada.

Huelga decir que la fase lineal motorizada puede estar configurada para proporcionar al menos un movimiento de dos dimensiones de la portadora de destino con el fin de permitir dispensar gotas sobre el soporte de destino en un patrón de dos dimensiones. En las realizaciones de la invención, el generador de gotas puede implementarse por cualquier medio adecuado apropiado para expulsar las gotas a demanda. En las realizaciones de la invención, pueden generarse gotas a demanda para el fin descrito utilizando un accionamiento de membrana mecánica, un accionamiento térmico de chorro de burbujas, unos sistemas accionados por presión externa con controles de micro-válvulas o cualquier dispensador que pueda producir micro gotas. Ejemplos de dispositivos generadores de gotas pueden incluir impresoras de inyección de tinta, dispensadores conocidos bajo las marcas comerciales NanoJet y PipeJet, o tecnologías de válvula de dispensación.

En las realizaciones de la invención, puede realizarse una detección de célula o partícula única para reconocer o analizar y/o clasificar la célula o partícula destino a partir de una corriente de células o de partículas continua usando medios de detección ópticos o de impedancia que están localizados dentro de la región de interés. Los elementos sensores pueden estar integrados dentro del generador de gotas usando un par de electrodos fabricados a lo largo de las paredes laterales o en el canal, un aparato de guía de ondas con un foto detector, o usando un sistema de visión montado externamente como un dispositivo de detección.

En las realizaciones de la invención, puede incorporarse un depósito en el aparato con el fin de proporcionar la suspensión al generador de gotas. El depósito puede incluir medios para mantener las células o partículas en suspensión y para suministrar las células/partículas al generador de gotas conforme a una temperatura controlada y unas condiciones ambientales durante el curso del proceso de deposición de células/partículas. Con el fin de mantener un estado homogéneo de la suspensión, el depósito puede estar integrado con un micro-mezclador, un micro-agitador o cualquier medio para evitar que se produzca la sedimentación de las células o partículas.

Las realizaciones de la invención pueden comprender un sistema de control de movimiento x, y, z con unas interfaces adecuadas para la impresión controlada por ordenador de patrones.

Las realizaciones de la invención contemplan la posibilidad de clasificar mezclas heterogéneas que constan de diferentes gotas/partículas. Debido al hecho de que los medios de medición, tales como la cámara, pueden aplicarse para detectar el estado de las células/partículas en la región de interés antes de cada evento de dispensación, la salida de los medios de medición también puede usarse para determinar ciertas propiedades de las células/partículas. Un ejemplo es determinar el tamaño de las partículas grabadas por una cámara a través de algoritmos de procesamiento de imágenes adecuados. Los algoritmos de procesamiento de imágenes apropiados son conocidos para los expertos en la materia y por lo tanto, no es necesario que se expliquen adicionalmente en el

presente documento. En consecuencia, las células/partículas de diferente tamaño pueden clasificarse fácilmente imprimiéndolas en diferentes localizaciones, tal como en distintos pocillos de una placa de micropocillos. Para este fin, el generador de gotas puede moverse a diferentes posiciones mediante una fase mecánica, como se ha explicado anteriormente con respecto a las figuras 5a y 5b. Como alternativa, un portador de destino puede moverse con respecto al generador de gotas. En las realizaciones de la invención, el generador de gotas puede dirigirse a una posición de residuos como una posición por defecto y puede cambiarse la posición a una posición de destino deseada cuando se detecta una determinada propiedad de la célula/partícula.

En las realizaciones de la invención, pueden realizarse solicitudes de clasificación más sofisticadas discriminando las células teñidas o etiquetadas con fluorescencia de acuerdo con su color. Las técnicas para el marcado y el etiquetado de superficie conocidas a partir de la FCM podrían aplicarse de la misma manera para permitir la capacidad de clasificación similar a como se conoce a partir de la FCM. También la clasificación de acuerdo con las propiedades de impedancia de las células puede adoptarse en el caso de que se use un sensor de impedancia. Básicamente, cualquier propiedad puede considerarse para clasificar lo que puede detectarse por un dispositivo correspondiente de detección.

En las realizaciones de la invención, pueden combinarse varios medios de medición para producir un mayor contenido de información de la célula/partícula bajo consideración. Por ejemplo, las imágenes ópticas obtenidas por una cámara podrían evaluarse en combinación con los resultados de medición de impedancia para determinar de manera simultánea el tamaño y la forma de la célula, así como sus propiedades eléctricas. Una gran cantidad de nuevas aplicaciones podrían realizarse de esta manera.

En resumen, las realizaciones de la invención contemplan un dispositivo para dispensar células o partículas vivas únicas confinadas en una micro gota en vuelo libre que comprende al menos un dispositivo de generación de gotas suministradas mediante una suspensión de células o partículas para producir gotas a demanda a partir de la suspensión fuera de al menos un orificio. Al menos puede proporcionarse un medio de medición de detección la presencia y/o el número y/o las propiedades específicas de las células o partículas en el interior del dispositivo de generación de gotas antes de la eyección de una gota. Una fase motorizada u otros medios mecánicos, eléctricos, magnéticos o neumáticos adecuados pueden proporcionarse, dirigidos a las gotas o al destino o a un depósito de residuos en función del resultado de la detección. Pueden proporcionarse un mecanismo de control de operación por medio de software, algoritmos y un módulo de interfaz de usuario para controlar al generador de gotas, a los medios de medición y a los medios de dirección de gota.

Además, las realizaciones de la invención contemplan un método para generar y depositar gotas que contienen solo una única célula o partícula que comprende las etapas de: Etapa 1: llenar un dispositivo de generación de gotas con células o partículas en suspensión. Etapa 2: dirigir un generador de gotas a una posición de residuos y generar una gota. Etapa 3: detectar el estado y/o las propiedades de las células o partículas en la región de interés dentro del generador de gotas mediante unos medios de medición adecuados. Etapa 4: si se detecta exactamente una única célula o partícula en la región de interés que se expulsará con la dispensación posterior, dirigir el generador de gotas hacia la posición de destino y activar el generador de gotas para liberar una gota a la posición deseada en el destino. Etapa 5: si no se detectan células o partículas o si se detecta más de una célula o partícula en la región de interés que se expulsará con la dispensación posterior, empezar de nuevo en la etapa 2.

En las realizaciones de la invención, puede lograrse contener una célula o partícula sumando el número de células o partículas únicas que pasan a través de la región de interés dentro de un período específico de tiempo. Para recolectar una cantidad conocida de células o para producir una suspensión de amortiguación secundaria con un número conocido de células, pueden dispensarse las células contadas directamente en el depósito del colector. Las evaluaciones estadísticas sobre las poblaciones de células pueden realizarse de esta manera similar a los métodos de FCM convencionales.

En las realizaciones de la invención, pueden realizarse estudios de propiedad característicos y pueden mantenerse registros de bases de datos. Las propiedades intrínsecas de las células o partículas como el contenido químico, el estado de la célula, el tipo de células, el contenido de ADN, etc., o las características extrínsecas como la viabilidad, el tamaño, la forma, etc., pueden deducirse a partir de los datos grabados adquiridos a través de los medios de medición en la región de interés para su análisis posterior. Cada conjunto de la señal de medición puede correlacionarse con la característica real de las células o partículas como se determina a través de la prueba posterior y la medición de laboratorio físico independiente. Esta excitación de señal frente a la característica de la célula o partícula puede usarse como una base de datos para desarrollar algoritmos específicos o de acondicionamiento de señal para clasificar las células destino de acuerdo con tales propiedades.

Las realizaciones de la invención contemplan la clasificación de células o partículas de acuerdo con las propiedades medidas. En base a las propiedades eléctricas, ópticas o a otras propiedades físicas de las células o partículas determinadas por los medios de medición, pueden definirse los algoritmos de clasificación para entregar las células en posiciones distintas, tales como diferentes pocillos de una placa de multipocillos. Las propiedades consideradas

pueden incluirse en el algoritmo de clasificación para clasificar las células o partículas de acuerdo con sus propiedades estipuladas y depositar las células o partículas seleccionadas en las posiciones prescritas. Por esto, las poblaciones de células homogéneas de un número conocido de células pueden establecerse fácilmente.

5 Cada célula o partícula depositada posee propiedades individuales conocidas, que pueden grabarse en un dispositivo de almacenamiento de datos y que pueden recuperarse para su posterior observación o análisis analítico. La base de datos puede incluir la posición de las células depositadas junto con un perfil de propiedades relacionadas. Esta base de datos puede usarse para rastrear la condición temporal de una célula o partícula individual depositada, especialmente durante el análisis post-recolección.

10 Las realizaciones del aparato de la invención comprenden un depósito acoplado de manera fluida al dispositivo de generación de gotas. Las realizaciones del aparato de la invención comprenden un dispositivo para mover el dispositivo de generación de gotas y un portador que soporta la primera posición en dos o tres dimensiones una respecto a la otra y un controlador para controlar el dispositivo para que se mueva de tal manera que pueda alcanzarse la impresión en el soporte de los patrones de las células o partículas en dos dimensiones o en tres dimensiones.

15 En las realizaciones del método de la invención, la información sobre las células o partículas comprende al menos una de entre una presencia, un número, un tamaño, un color y/o una impedancia de las células o partículas. Las realizaciones del método de la invención comprenden expulsar la gota a la primera posición si la información detectada indica que la gota expulsada incluirá un número predeterminado de células o partículas y expulsar la gota a la segunda posición si la información detectada indica que la gota expulsada no incluirá el número predeterminado de células o partículas. El número predeterminado puede ser uno.

25 En función de determinados requisitos de implementación, las realizaciones de la invención pueden implementarse en hardware o en software. La implementación puede realizarse usando un medio de almacenamiento digital, por ejemplo un disquete, un DVD, un CD, una ROM, una PROM, una EPROM, y una EEPROM o una memoria FLASH, que tenga señales de control legibles electrónicamente almacenadas en el mismo, que cooperen (o sean capaces de cooperar) con un sistema informático programable de tal manera que se realice el método respectivo. Algunas realizaciones de acuerdo con la invención comprenden un portador de datos que tiene señales de control legibles electrónicamente, que son capaces de cooperar con un sistema informático programable, de tal manera que se realiza uno de los métodos descritos en el presente documento. En general, las realizaciones de la presente invención pueden implementarse como un producto de programa informático con un código de programa, siendo el código de programa operativo para realizar uno de los métodos cuando el producto de programa informático se ejecuta en un dispositivo informático tal como un ordenador. El código de programa puede, por ejemplo, almacenarse en un soporte legible por máquina.

30 Las realizaciones descritas anteriormente son simplemente ilustrativas de los principios de la presente invención. Se entiende que las modificaciones y las variaciones de las disposiciones y los detalles descritos en el presente documento serán evidentes para otros expertos en la materia. Es la intención, por lo tanto, estar limitado solo por el alcance de las siguientes reivindicaciones y no por los detalles específicos presentados por medio de la descripción y la explicación de las realizaciones del presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato para dispensar una o más células o partículas (48) confinadas en una gota en vuelo libre (52), que comprende:
- 5 un dispositivo de generación de gotas de activación piezoeléctrica (10) configurado para expulsar fuera de un orificio (14; 44) una gota en vuelo libre de una suspensión (46) de células o partículas (48), comprendiendo dicho dispositivo de generación de gotas (10) un canal unidireccional sin ramificar (12; 56) que tiene la abertura del orificio (14; 44) en un extremo del mismo;
- 10 un dispositivo (16, 18) de detección de información sobre células o partículas localizadas en un volumen de observación (50) de la suspensión (46) dentro del canal unidireccional sin ramificar (12; 56); y medios (20; 110; 120; 130; 140) para dirigir una gota expulsada (52) a una primera posición o a una segunda posición en función de la información detectada,
- 15 **caracterizado por que** el dispositivo de generación de gotas de activación piezoeléctrica (10) es un dispositivo de generación de gotas a demanda de activación piezoeléctrica (10).
2. El aparato de la reivindicación 1, en el que el volumen de observación (50) es un volumen de la suspensión que está localizado adyacente al orificio (14; 44) y que se expulsa como una gota en vuelo libre (52) en el siguiente evento de dispensación.
- 20 3. El aparato de la reivindicación 1, en el que la primera posición es una posición de destino y la segunda posición es una posición de residuos.
4. El aparato de una de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la información sobre las células o partículas comprende al menos una de entre una presencia, un número, un tamaño, un color y/o una impedancia de las células o partículas.
- 25 5. El aparato de una de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dichos medios para dirigir están configurados para dirigir una gota expulsada a la primera posición si la información detectada indica que la gota expulsada incluirá un número predeterminado de células o partículas y para dirigir y expulsar la gota a la segunda posición si la información detectada indica que la gota expulsada no incluirá el número predeterminado de células o partículas.
- 30 6. El aparato de la reivindicación 5, en el que el número predeterminado es uno.
- 35 7. El aparato de una de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dichos medios para dirigir comprenden una plataforma motorizada (20; 110; 122) configurada para mover el dispositivo de generación de gotas (10) o uno o más portadores (26, 114) que llevan a la posición primera y/o segunda, y/o medios (140) que desvían de manera neumática, eléctrica o magnética una gota expulsada del dispositivo de generación de gotas (10).
- 40 8. El aparato de la reivindicación 7, en el que dichos medios para dirigir comprenden un obturador (130) que comprende la segunda posición y medios para colocar el obturador (130) entre el dispositivo de generación de gotas (10) y la primera posición (114) y para retirar el obturador de un espacio entre el dispositivo de generación de gotas (10) y la primera posición (114).
- 45 9. El aparato de una de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el dispositivo de generación de gotas comprende medios de enfoque (54, 60) para hacer que las células o partículas vivas fluyan de una en una a través del volumen de observación (50), y en el que dichos medios de enfoque comprenden al menos uno de entre:
- 50 un canal (42) que comprende una sección transversal ahusada hacia el orificio (44); y un canal central (68) y dos canales laterales (72) que entran en el canal central (68) en posiciones opuestas.
10. El aparato de una de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el dispositivo de detección comprende al menos uno de entre un sensor de impedancia localizado dentro del dispositivo de generación de gotas y un sensor óptico localizado dentro o fuera del dispositivo de generación de gotas.
- 55 11. Un método para dispensar una o más células o partículas confinadas en una gota en vuelo libre, que comprende:
- 60 llenar un dispositivo de generación de gotas a demanda de activación piezoeléctrica (10) con una suspensión (46) que comprende células o partículas (48), comprendiendo el dispositivo de generación de gotas (10) un canal unidireccional sin ramificar (12; 56; 62, 64) que tiene un orificio (14; 44) en un extremo del mismo; detectar información sobre las células o partículas localizadas en un volumen de observación (50) de la suspensión (46) dentro del canal unidireccional sin ramificar; y expulsar una gota (52) fuera del orificio (14; 44) a una posición primera o segunda (22, 24; 112; 114; 130; 140) en función de la información detectada,

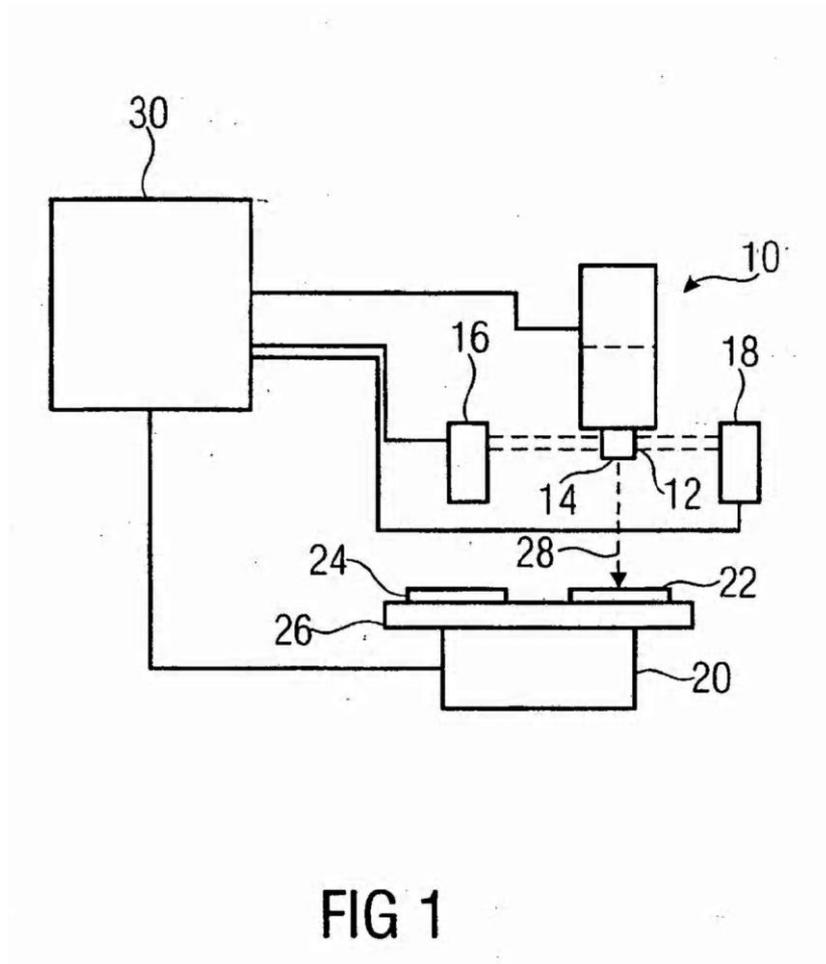
caracterizado por que el dispositivo de generación de gotas de activación piezoeléctrica (10) es un dispositivo de generación de gotas a demanda de activación piezoeléctrica (10).

5 12. El método de la reivindicación 11, que comprende contar un número de células o partículas que pasan a través de la región de observación dentro de un período específico de tiempo en base a la información detectada.

10 13. El método de una de las reivindicaciones 11 y 12, en el que la información detectada comprende una propiedad de las células o partículas y en el que el método comprende clasificar al menos dos tipos diferentes de células o partículas en función de la propiedad detectada expulsando células o partículas que tienen una primera propiedad a una primera localización de destino y células o partículas que tienen una segunda propiedad diferente a una segunda localización de destino.

15 14. El método de la reivindicación 13, en el que las localizaciones de destino son diferentes pocillos de una placa de multipocillos.

15 15. Un producto de programa que comprende un código de programa ejecutable en un dispositivo informático, en el que el código de programa es eficaz para derivar la información sobre las células o partículas de una salida de un dispositivo sensor y para controlar un aparato para realizar un método de acuerdo con una de las reivindicaciones 11 a 14.



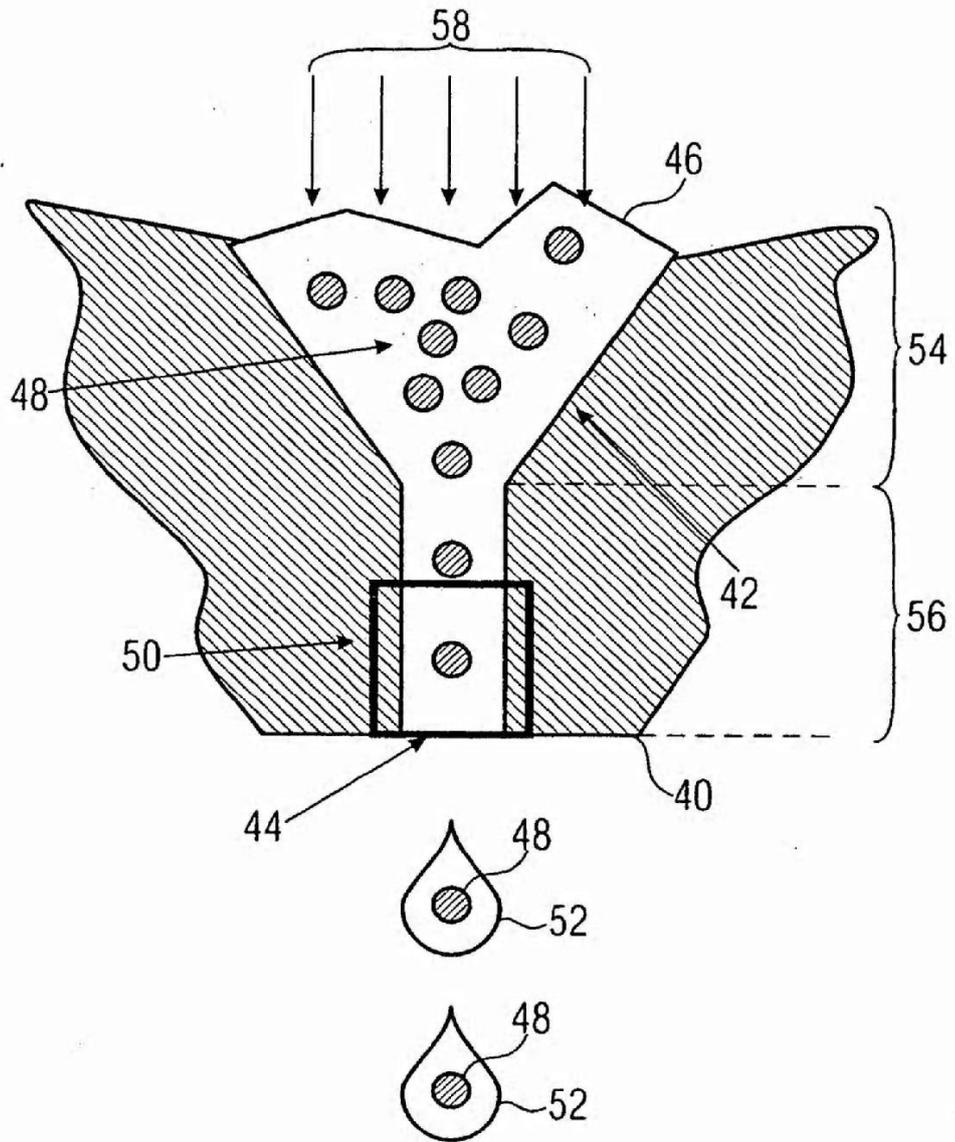


FIG 2

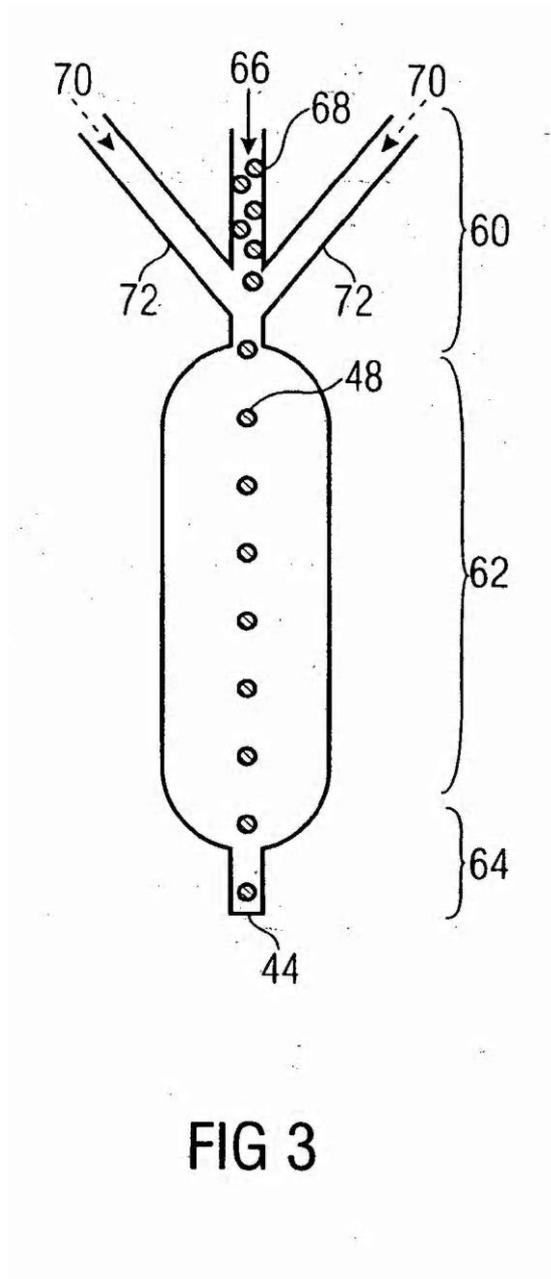


FIG 3

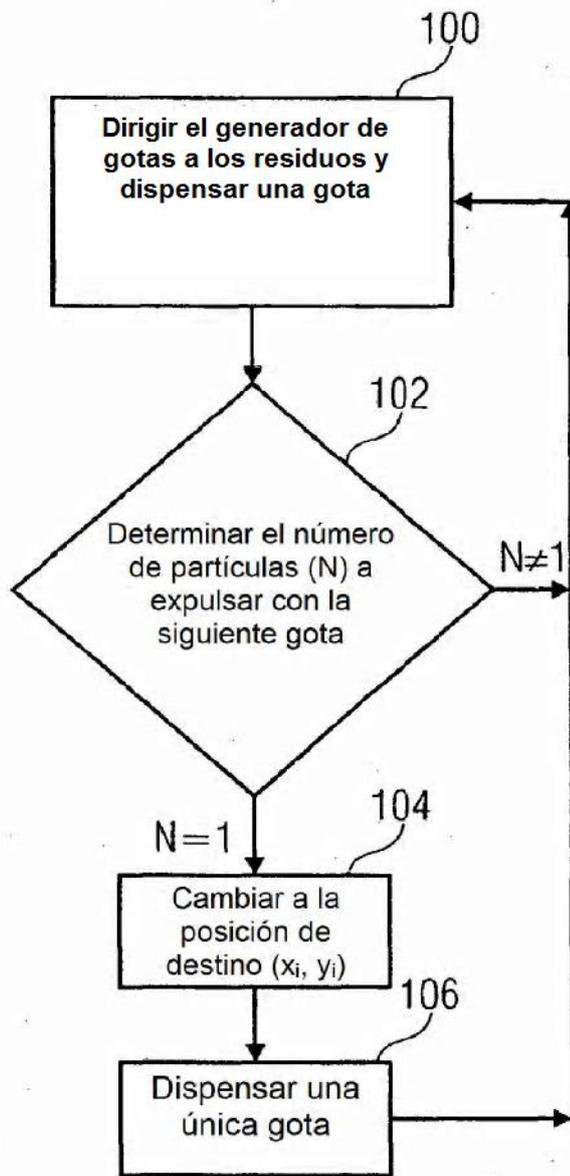


FIG 4

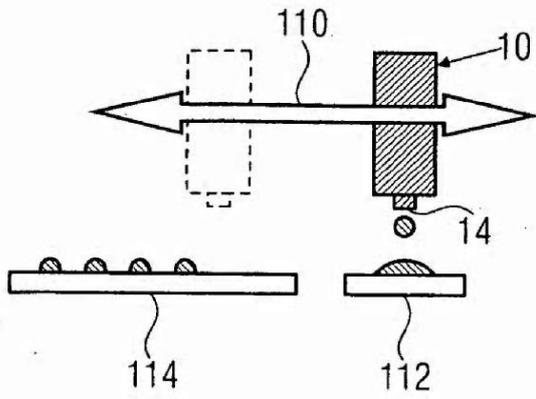


FIG 5A

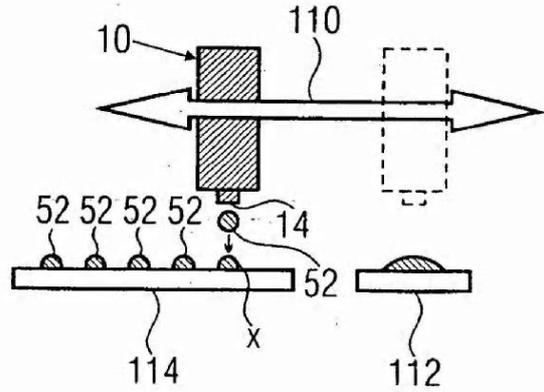


FIG 5B

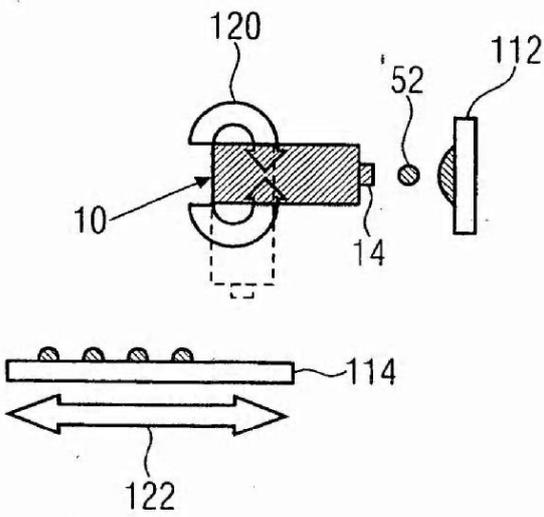


FIG 6A

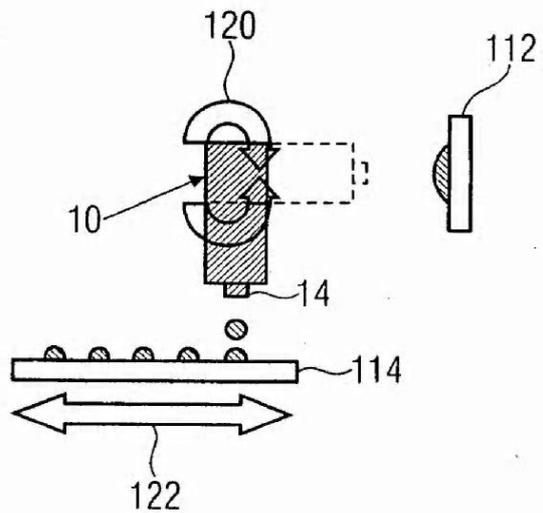


FIG 6B

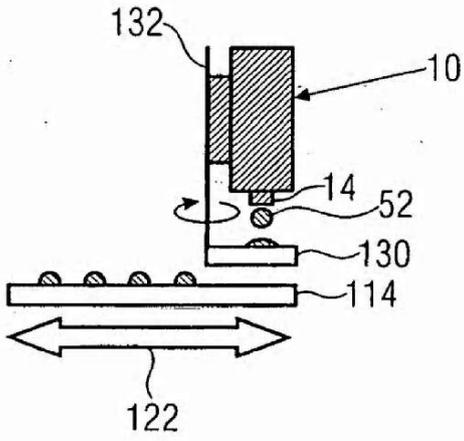


FIG 7A

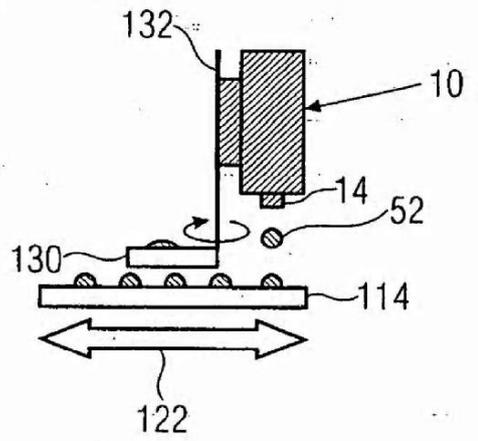


FIG 7B

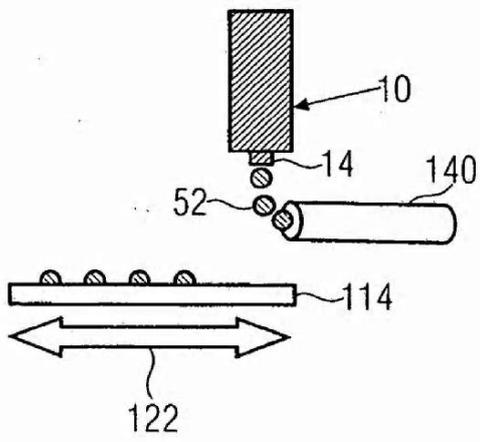


FIG 8A

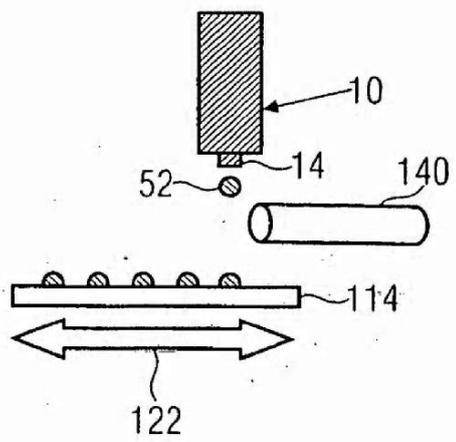


FIG 8B