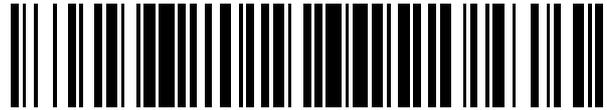


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 890**

51 Int. Cl.:

**G01N 15/00** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**B41J 2/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2001 E 01991599 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.09.2015 EP 1348116**

54 Título: **Método y sistema de clasificación celular por expulsión acústica focalizada**

30 Prioridad:

**28.12.2000 US 751666**

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

**24.11.2015**

73 Titular/es:

**PICOLITER INC. (100.0%)  
1190 BORREGAS AVENUE  
SUNNYVALE, CA 94089, US**

72 Inventor/es:

**MUTZ, MITCHELL, W.;  
ELLSON, RICHARD, N. y  
LEE, DAVID, SOONG-HUA**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 551 890 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

Método y sistema de clasificación celular por expulsión acústica focalizada

La invención se refiere en general al uso de la energía acústica focalizada en la expulsión dirigida espacialmente de las células que se suspenden en un fluido portador. Los métodos y dispositivos de la invención proporcionan la clasificación eficiente, no destructiva, y completa de las células.

Los métodos para la clasificación eficiente, no destructiva, y completa de las células tienen amplias aplicaciones en la investigación biológica y médica básica. Por ejemplo, la clasificación de células se utiliza comúnmente en la inmunología, donde las células que muestran marcadores específicos son segregadas de otras células a través de una propiedad óptica tal como fluorescencia. Otra aplicación es en la terapéutica médica, donde un cierto tipo de célula autóloga o heteróloga se desea comúnmente para el trasplante, como en la terapia para la neoplasia. Los avances en la microfabricación de materiales biocompatibles, y de la bioingeniería en general, sugieren que los métodos de clasificación de células más eficaces también encontrarán uso en aplicaciones de ingeniería de tejidos.

Los primeros dispositivos de clasificación de células distinguen entre las células basándose en los parámetros físicos. Dichas técnicas de clasificación de células incluyen la filtración, cuya selección se basa en el tamaño celular, y la centrifugación, cuya selección se basa en la densidad celular. Estos métodos son eficaces si la población celular de interés difiere significativamente en tamaño o la densidad de las otras células en una mezcla de células. Cuando las poblaciones de células individuales en la mezcla de células son similares entre sí en tamaño y densidad, sin embargo, ni la técnica de filtración ni la centrifugación pueden separarlas de manera efectiva.

Para superar estas desventajas, se han desarrollado técnicas para distinguir y separar poblaciones de células en base a la visualización de los marcadores de superficie o epitopos. Estas técnicas se diferencian entre poblaciones de células basándose en los elementos de marcación unidos a la superficie celular, y se han convertido en herramientas significativas de clasificación de células. La clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) emplea una etiqueta o marcador de anticuerpo fluorescente que se une a un marcador específico de la superficie celular. La mayoría de tales clasificadores operan principalmente en una forma binaria: la selección se basa únicamente en sí o no una célula lleva etiquetas fluorescentes suficientes para desencadenar la separación en base a un valor de fluorescencia umbral preseleccionado. Debido a que los clasificadores de FACS examinan una sola célula a la vez, la velocidad de separación de células es relativamente lenta. Generalmente, un clasificador FACS puede proporcionar una velocidad de clasificación de células de  $10^3$  células/segundo. Velocidades de clasificación de células superiores son posibles, pero pueden dañar algunas células. Un número limitado de clasificadores FACS está presente en los laboratorios porque son costosos y deben ser operados por técnicos cualificados.

Otro método de separación que utiliza la marcación de células se conoce como separación magnética de alto gradiente (HGMS). Clasificación basada en el magnetismo fue empleada por primera vez en la industria minera, y se basa en las diferencias en las propiedades magnéticas intrínsecas de los materiales ya clasificados para su funcionamiento (véase la Patente de los Estados Unidos No. 2,056,426 de Frantz). En HGMS, una población de células heterogéneas o mezcla de células, que incluye una subpoblación de células etiquetadas magnéticamente, pasa a través de un campo magnético aplicado, y las células de la subpoblación marcada con etiquetas magnéticas se atraen selectivamente hacia la fuente magnética. La subpoblación magnéticamente etiquetada se recoge por la adhesión a la fuente magnética, o a un colector de células cerca de la fuente magnética. Uno de los defectos de HGMS, que puede ser más rápido que FACS, es que la subpoblación de células de interés se puede dañar durante el proceso de HGMS debido a la masificación de las células en el colector. HGMS es de nuevo principalmente de naturaleza binaria, como la separación se basa únicamente en la presencia o ausencia de etiquetas magnéticas.

Las técnicas de separación binaria basadas en un parámetro tales como el magnetismo o la fluorescencia han encontrado un uso considerable en la clasificación de células. Existe una necesidad, sin embargo, para la separación de células de una manera no binaria, basada en la intensidad de un parámetro especificado, tales como la intensidad de una señal magnética o fluorescente detectada.

Recientemente, un sistema y un método para la clasificación de células, basado en la cantidad de etiquetas magnéticas unidas a la célula ha sido descrito (la Patente de los Estados Unidos No. 6,120,735 de Zborowski et al.), que utiliza un canal en el cual las células etiquetadas fluyen a través de un campo magnético. El método es capaz de un mayor rendimiento, manteniendo al mismo tiempo comparable a una mayor viabilidad celular, en relación con FACS o HGMS tradicionales. Una población de partículas que tienen diferentes susceptibilidades magnéticas se somete a un campo magnético durante el flujo para crear un gradiente en la corriente de flujo. Los compartimentos de flujo divididas dentro del canal se utilizan para generar corrientes de flujo eferente fraccionadas. Las partículas en estas corrientes de flujo de células fraccionadas no son, sin embargo, estrictamente ordenados, sino más bien se enriquecen en fracciones particulares. Así, el mayor rendimiento de los métodos de enriquecimiento fraccionados, mientras que el mantenimiento de la viabilidad celular, se obtiene un sacrificio en la pureza. Por lo tanto, existe una necesidad de métodos de

clasificación de células que permiten un alto rendimiento, con la flexibilidad para llevar a cabo separaciones no binarias, sin sacrificar la pureza.

Otro método recientemente descrito para la clasificación de células provee un alto rendimiento y evita el escaso enriquecimiento, pero sacrifica células destruyendo todas las células no deseadas detectadas con un láser (la Patente de los Estados Unidos No. 5,158,889 de Hirako et al., 1992).

Algunos métodos de clasificación de células incluyen la capacidad de separar una procesión continua, fila única de células suspendidas en fluido en un canal en una procesión de gotas individuales que contienen las células individuales, como se describe en las Patentes de los Estados Unidos No. 3,710,933 de Fulwyler et al. y 3,380,584 y 4,148,718 de Fulwyler. La procesión de gotas individuales se crea por la vibración de una cámara de flujo u orificio a través del cual pasa el flujo, por lo general a una frecuencia del orden de 40,000 Hz. Estas gotas, conteniendo cada una sola célula, pueden ser expulsadas de un orificio. En este método, las células de fila única están separadas entre sí por una distancia significativa, resultando en un menor número de células que pasan a un punto de detección o de expulsión por unidad de tiempo en relación con el número en un método que emplea una progresión continua de células de fila única, casi adyacentes. Por lo tanto, el rendimiento y la eficacia de la clasificación son relativamente bajos, porque las células seleccionadas no se pueden expulsar de la procesión tan rápidamente como en el caso donde el fluido sea continuo. También, existe mucha inflexibilidad e ineficiencia asociada con la manipulación de las células individuales en un canal que contiene muchas células. La velocidad de la manipulación de las células individuales en un canal está inherentemente limitada, por ejemplo, porque el flujo puede que necesite ser ralentizado o detenido para evitar colisiones celulares en un canal o sistema de canales interconectados.

Un ejemplo de dicho clasificador de células suspendidas en fluido es el clasificador jet-in-air, que está optimizado comúnmente para la clasificación de células de mamíferos comercial. Las células linfoides que tienen diámetros que van de 8 a 14  $\mu\text{m}$ , y espermatozoides que tienen una dimensión larga de hasta 200  $\mu\text{m}$ , son comúnmente clasificados por dicho dispositivo. Los sistemas jet-in-air que basados en piezo se deben ajustar a los diámetros específicos de las células para ser clasificadas, por lo que es difícil de clasificar las subpoblaciones de células que tienen sustancialmente diferentes tamaños medios. El ajuste de dicho sistema para adaptarse a diferentes tamaños de célula o viscosidades de fluido implica el ajuste de parámetros tales como el diámetro de la boquilla de flujo, presión de funda, velocidad de flujo, la frecuencia de accionamiento de las gotas, la amplitud de accionamiento, el espaciamiento de las gotas, y el punto de rotura de la gota.

Los sistemas basados en piezo también tienden a ser ineficientes por otras razones, incluyendo su necesidad de espacio a las células en la corriente de flujo para evitar la aglomeración celular, lo que reduce la capacidad para localizar rápidamente las células para las operaciones de clasificación. Por ejemplo, para evitar la aglomeración celular, una gota de fluido de cada diez puede contener una célula. En consecuencia, para una velocidad de flujo de 32,000 gotas por segundo, sólo 3,200 células por segundo se contarían, una eficiencia 10 veces menor en comparación con el uso de un sistema en donde cada gota contiene una célula.

Por lo tanto existe una necesidad de un método y sistema capaz de clasificar un gran rango de tamaños de partículas que no requieren que la boquilla de flujo sea cambiada o que otros parámetros de fluidos sean ajustados. De hecho, existe una necesidad de métodos y sistemas de clasificación de células que no utilicen boquillas de flujo, para eliminar el potencial de obstrucción. También existe una necesidad para un sistema de clasificación y un método que puede discriminar fácilmente entre grupos de células y células individuales sin obstruir, permitiendo que los grupos sean identificados y clasificados por separado. Existe una necesidad adicional para un sistema y método de clasificación que se pueda ajustar para dar cabida a soluciones de viscosidades variables simplemente cambiando los ajustes de frecuencia y potencia en el transductor de energía. Existe una necesidad adicional de un sistema de clasificación de células que pueda alcanzar económicamente niveles superiores de rendimiento y eficiencia a los de los sistemas actuales, por ejemplo, mediante el uso de la clasificación multi-canal, masivamente paralela. Aún existen necesidades fundamentales de métodos mejorados para diferenciar células de acuerdo con varios parámetros, y para separar las células en dos o más grupos con base en el grado de un solo parámetro (toma de decisión no-binaria), sin sacrificar la pureza de separación o la viabilidad celular.

Para fines de investigación, se desean numerosas mejoras para los sistemas de clasificación de células. En general, existe una necesidad de una mayor eficiencia de modo que, por ejemplo, el tiempo total se acorta entre la obtención de una mezcla de células (por ejemplo una muestra de sangre) y el uso de las células separadas experimentalmente. Además, los experimentos comúnmente requieren la siembra en placas de pequeños números de un tipo de células específico en placas individuales, platos, pozos, o matrices de los mismos. Debido a que todos los métodos de clasificación de células conocidos primero recolectan todas las células de una subpoblación dada en un solo lugar, en lugar de permitir la eliminación de células seleccionadas individuales directamente en pozos de la placa de pozos u otros recipientes, se requieren más etapas entre la recolección de una muestra y teniendo las células recolectadas listas para experimentación. Considerables tiempo y esfuerzo del laboratorio se pueden guardar por la entrega directa de un número pequeño precisamente conocido de células seleccionadas individualmente en recipientes para su uso en

experimentos, en lugar de recolectar toda la subpoblación separada en un solo recipiente y luego subdividir las células en los contenedores experimentales. Por lo tanto existe la necesidad de emplear un medio para la eliminación selectiva no binaria de células viables a partir de una mezcla de células directamente en un contenedor experimental. Esta necesidad se puede satisfacer mediante el uso de expulsión acústica.

5 No hay método o sistema actualmente conocido para la clasificación de células en las que células viables individuales son expulsados de un fluido. Por lo tanto, existe una necesidad de un método y un sistema correspondiente para la clasificación de células por expulsión de células viables individuales de un fluido, que utilizan preferiblemente selección no binaria y puede entregar número exacto de células de un fluido directamente en recipientes experimentales. Un método y un sistema para la clasificación de células utilizando la expulsión acústica de las células seleccionadas  
10 individuales contenidas en gotas ofrecen una mayor flexibilidad y eficiencia global sin reducir la viabilidad, en comparación con los métodos existentes, en virtud de su capacidad para ofrecer células clasificadas directamente en recipientes experimentales y para clasificar células en varios, en lugar de sólo dos, grupos en base a una sola propiedad intrínseca o etiquetada.

15 De acuerdo con lo anterior, es un objeto de la presente invención es proveer sistemas y métodos que superen las desventajas de la técnica anterior mencionadas anteriormente.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, por lo tanto, se provee un método como se reivindica en la reivindicación 1, a continuación.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, se provee un sistema como el reivindicado en la reivindicación 17, a continuación.

20 Un dispositivo preferido para llevar a cabo el método antes mencionado es uno que permite la expulsión acústica de una pluralidad de gotas de fluido. Tales dispositivos comprenden: una pluralidad de recipientes o depósitos cada uno adaptado para contener un fluido capaz de llevar, por ejemplo, células u otros volúmenes localizados suspendido en la misma; un eyector acústico para la generación de radiación acústica y un medio de enfoque para enfocar en un punto focal cerca de la superficie del fluido en cada uno de los depósitos; y un medio para posicionar el eyector en relación de  
25 acoplamiento acústico a cada uno de los recipientes o depósitos. Preferiblemente, cada uno de los recipientes es extraíble, o compuesto de un pozo individual en una placa de pozos, y/o dispuestos en una matriz. Además, los recipientes o depósitos son de preferencia de forma sustancial acústicamente indistinguibles entre sí y tienen impedancia acústica apropiada y la atenuación para permitir que el enfoque energéticamente eficiente de la energía acústica cerca de la superficie de un fluido contenido.

30 En variaciones en el método anteriormente mencionado, los volúmenes localizados están presentes en una corriente que fluye dentro de un canal de expulsión del fluido sobre una superficie del sustrato, o son células vivas dentro de una colonia de células que crecen en un medio (por lo general agar o un semisólido similar o gel).

En otra realización, se provee un sistema que emplea la tecnología de expulsión acústica focalizada para clasificar selectivamente las células u otros volúmenes circunscritos en los canales u otros recipientes que se cortan  
35 transversalmente sustancialmente por un plano paralelo a una superficie del fluido. Este plano también corta transversalmente el recipiente del cual se expulsan gotas. Las células individuales u otros volúmenes circunscritos se pueden seleccionar y luego expulsar a una velocidad ajustable sobre un sustrato sustancialmente plano para formar una matriz sobre el sustrato. Las operaciones del sistema se realizan mediante la colocación de un eyector acústico con el fin de estar en relación acústicamente acoplada con un primer depósito que contiene células u otros volúmenes localizados en un primer fluido portador. Después de que la presencia de un volumen localizado suficientemente cerca de la superficie del fluido se detectó acústicamente, y cualquiera de las propiedades utilizadas como criterios para la expulsión son detectadas por mediciones acústicas y/o electromagnéticas, el eyector se activa para generar y dirigir la radiación acústica que tiene un punto focal dentro de, y cerca de la superficie, del fluido portador. La energía acústica aplicada resulta en la expulsión de una gota de fluido portador. Cuando se utiliza el sistema para la expulsión de la  
40 célula, la energía acústica se aplica de una manera eficaz para expulsar una gota que es suficientemente pequeña de manera que solamente una única célula puede estar contenida en la misma. Preferiblemente, la gota se expulsa con un vector de velocidad que tiene un componente paralelo al plano de la superficie del fluido. Si se desea, el eyector puede ser reposicionado con el fin de estar en relación acústicamente acoplada con un segundo depósito, y el proceso se repite como antes para expulsar una gota del segundo fluido. El sistema también puede ser configurado para permitir la repetición de una pluralidad de recipientes de fluido.  
45  
50

En una realización adicional, la invención provee un método de formación de matrices de células vivas individuales de manera más eficiente, rápida, flexible y económica que por otras metodologías que forman matrices de células. El método permite la selección eficiente, continua y simultánea y la clasificación de células basadas en mediciones  
55 cuantitativas o semicuantitativas de sus propiedades. El método también permite el uso de múltiples objetivos de expulsión, la selección de células no binarias, y la toma de decisiones ramificadas por separado. Las células dispuestas

se pueden unir a la superficie del sustrato por uno o más sistemas de unión específicos, cada una empleando una unidad estructural de marcador externo que reconoce específicamente una unidad estructural cognada, tal como un par del receptor de ligando. Uno de tales sistemas de unión específica usa estreptavidina como una unidad estructural de marcador externo, generado por la transformación, con biotina utilizada como unidad estructural cognada. Un ejemplo de un sistema de unión que emplea una unidad estructural de marcador externo endógena (que existe sin la necesidad de la transformación celular) utiliza epítomos y clones de linfocito de Ig expresados externamente como unidad estructural cognada.

Antes de describir la presente invención en detalle, se debe entender que esta invención no se limita a fluidos específicos, células, biomoléculas, o estructuras de dispositivos, como tal, puede variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir solamente realizaciones particulares, y no se pretende que sean limitativos.

Se debe tener en cuenta que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un recipiente" o "un depósito" incluye un solo recipiente o depósito, así como una pluralidad de recipientes o depósitos, la referencia a "un fluido" incluye un fluido único o una combinación y/o mezcla de diferentes fluidos, la referencia a "una biomolécula" incluye una sola molécula, así como una combinación y/o mezcla de biomoléculas, y similares.

Al describir y reivindicar la presente invención, la siguiente terminología será utilizada de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

La frase "volumen de fluido localizado" se refiere a un volumen espacialmente localizado de fluido. Por lo general, un volumen de fluido localizado tendrá diferentes propiedades físicas que el fluido circundante, aunque esto no es necesario. En la práctica, un volumen de fluido localizado sólo se puede detectar si sus propiedades son diferentes de las del fluido circundante. Un cristal de azúcar suspendido en una solución acuosa insaturada (por el azúcar), y rodeado por un volumen en el cual la concentración de azúcar del fluido local es mayor que la concentración de azúcar media del fluido a granel, es un ejemplo de un volumen de fluido localizado incircunscrito que no tiene estructura que delinea o circunscribe. Otros volúmenes de fluido localizado incircunscrito incluyen composiciones de fluidos, en donde las regiones lipídica, o hidrófoba localizadas, están contenidas dentro de un fluido hidrófilo (por ejemplo, acuoso), o en donde las regiones hidrófilas (por ejemplo, acuosas) localizadas están contenidas dentro de un fluido lipídico, o hidrófobo.

Un "volumen de fluido circunscrito" es un volumen de fluido localizado que está delineado o circunscrito, por lo general por una estructura, pero posiblemente también por un pozo potencial de un campo de energía. Una célula biológica es un ejemplo perfecto de un volumen de fluido circunscrito, como está delineado por una membrana celular. Otros ejemplos de volúmenes de fluido circunscrito incluyen plaquetas, mitocondrias, y los núcleos, que son orgánulos celulares o subdivisiones celulares envasados. Un ejemplo de un volumen circunscrito no derivado de un organismo vivo es una microcápsula que contiene un fluido, en donde la pared de la cápsula puede o no puede permitir un cierto intercambio de material entre la cápsula interior y el fluido externo. El fluido en un volumen de fluido circunscrito puede contener partículas sólidas y gel en suspensión. Al estar circunscrito, sin embargo, todo el volumen circunscrito se comporta como una partícula individual a menos que la estructura o campo que circunscribe se quiebre. Una partícula sólida o gel, tal como una perla de vidrio o de polímero, se incluye en el sentido contemplado de volumen circunscrito; dicha partícula está circunscrita del fluido portador en virtud del material del que está hecho. Otros tipos de volúmenes circunscritos son liposomas, micelas y micelas inversas, en donde una capa externa sirve como una capa de encapsulación- vesícula, y el interior de la vesícula se llena con un fluido. Todavía otros tipos de volúmenes circunscritos se componen de un primer fluido que pueden o no pueden ser inmiscibles con el fluido en donde está contenido, en donde una capa molecular de un material inmisible circunscribe el primer fluido para proporcionar una barrera entre el interior del fluido y el exterior del fluido.

A menos que se indique lo contrario, el término "célula" como se utiliza en este documento, también se puede referir a un volumen de fluido no celular localizado. Por lo tanto, una gota de fluido expulsado que se indica para contener una célula se debe interpretar como una gota de fluido que puede contener un volumen de fluido localizado que puede o no comprender una célula. Ejemplos de otros tipos de volúmenes de fluido localizados contenidos dentro de un volumen mayor de fluido se proporcionan anteriormente.

El término "fluido" como se usa en este documento, se refiere a la materia que es no sólida o al menos parcialmente gaseosa y/o líquida. Un fluido puede contener un sólido que es mínimamente, parcial o totalmente solvatado, disperso o suspendido; partículas compuestas de geles o fluidos discretos también pueden ser suspendidos en un fluido. Ejemplos de fluidos incluyen, sin limitación, líquidos acuosos (incluyendo agua *per se* y agua salada) y líquidos no acuosos tales como solventes orgánicos y similares. Las células vivas suspendidas en un fluido portador representan un ejemplo de un gel o fluido discreto suspendido en un fluido.

- El término "cerca" se utiliza para referirse a la distancia desde el punto focal de la radiación acústica focalizada a la superficie del fluido desde el que una gota va a ser expulsada. La distancia debe ser tal que la radiación acústica focalizada dirige a los resultados de fluido en la expulsión de gotas desde la superficie del fluido, y un experto en la técnica será capaz de seleccionar una distancia apropiada para cualquier fluido dado usando experimentación sencilla y rutinaria. Generalmente, sin embargo, una distancia apropiada entre el punto focal de la radiación acústica y la superficie del fluido está en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 15 veces la longitud de onda de la velocidad del sonido en el fluido, más por lo general en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces esa longitud de onda, preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces esa longitud de onda.
- El término "depósito" tal como se utiliza en este documento se refiere a un receptáculo o cámara para contener o que contiene un fluido. Por lo tanto, un fluido en un depósito necesariamente tiene una superficie libre, i.e., una superficie que permite que una gota sea expulsada de la misma. Mientras un recipiente de fluido tiene al menos una superficie libre de la cual el fluido puede ser expulsado, el recipiente es un depósito, independientemente de la geometría específica. Así, un "depósito" incluye, por ejemplo, un canal de microfluidos que contiene fluido que fluye a partir del cual se expulsan las gotas. Un "recipiente de la célula" o "depósito celular" es un depósito que está especializado para la expulsión de las células vivas suspendidas en un fluido portador, e incluye, por ejemplo, un canal de microfluidos u otro a través del cual las células vivas fluyen suspendidas en un fluido portador.
- Los términos "acoplamiento acústico" y "acoplado acústicamente" utilizados en este documento se refieren a un estado en donde un objeto se coloca en contacto directo o indirecto con otro objeto con el fin de permitir que la radiación acústica se transfiera entre los objetos sin pérdida sustancial de energía acústica. Cuando dos entidades están acopladas indirectamente acústicamente, se necesita un "medio de acoplamiento acústico" para proporcionar un intermediario a través del cual se puede transmitir la radiación acústica. Por lo tanto, un eyector puede estar acoplado acústicamente a un fluido, por ejemplo, sumergiendo el eyector en el fluido o mediante la interposición de un medio de acoplamiento acústico entre el eyector y el fluido de transferencia de radiación acústica generada por el eyector a través del medio de acoplamiento acústico y en el fluido.
- El término "unido", como en, por ejemplo, una superficie de sustrato que tiene una célula "unida" a la misma, incluye la unión covalente, adsorción, y la inmovilización física. El término "ligado" es idéntico en significado al término "unido" como se usa en este documento.
- El término "adsorción" tal como se utiliza en este documento, se refiere a la retención no covalente de una molécula, segmento molecular, célula o por una superficie del sustrato. Es decir, la adsorción se produce como resultado de la interacción no covalente entre una superficie del sustrato y unidades estructurales adsorbentes presentes en la entidad que es adsorbida. La adsorción se puede producir a través de enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, atracción polar o fuerzas electrostáticas (i.e., a través de enlace iónico). A menudo, el sustrato puede ser funcionalizado con unidades estructurales adsorbentes para interactuar de una manera determinada.
- El término "matriz" utilizado en este documento se refiere a un arreglo bidimensional de características o materiales, por ejemplo, células. Las matrices están generalmente constituidas de características regulares, ordenadas, como en, por ejemplo, una rejilla rectilínea, bandas paralelas, espirales, y similares, pero las matrices no ordenadas se pueden usar ventajosamente también.
- Los términos "biomolécula" y "molécula biológica" se usan indistintamente en este documento para referirse a cualquier molécula orgánica, tanto si son de origen natural, producidos recombinantemente, o sintetizados químicamente en su totalidad o en parte, es decir., fue o puede ser una parte de un organismo vivo. Los términos abarcan, por ejemplo, nucleótidos, aminoácidos y monosacáridos, así como especies oligoméricas y poliméricas tales como oligonucleótidos y polinucleótidos, moléculas peptídicas tales como oligopéptidos, polipéptidos y proteínas, sacáridos tales como disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, mucopolisacáridos o peptidoglicanos (péptido-polisacáridos) y similares. El término también abarca los ribosomas, cofactores de enzimas, agentes activos farmacológicamente, y similares.
- Los términos "medio de enfoque" y "medio de enfoque acústico" se refieren a un medio para causar ondas acústicas para converger en un punto focal ya sea por un dispositivo separado de la fuente de energía acústica que actúa como una lente óptica, o por el disposición espacial de las fuentes de energía acústica para producir la convergencia de la energía acústica en un punto focal por la interferencia constructiva y destructiva. Un medio de enfoque puede ser tan simple como un miembro sólido que tiene una superficie curva, o puede incluir estructuras complejas tales como los encontrados en lentes de Fresnel, que emplean de difracción con el fin de dirigir la radiación acústica. El medio de enfoque apropiado incluye también métodos de matriz en fases como se conoce en la técnica y se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5,798,779 de Nakayasu et al. y Amemiya et al. (1997) Actas de la Conferencia Internacional IS & T NIP13 de 1997 en Actas de Tecnología de Impresión Digital, págs. 698-702.

El término "sustrato" como se usa en este documento se refiere a cualquier material que tiene una superficie sobre la que uno o más fluidos pueden ser depositados. El sustrato puede ser construido de cualquiera de un número de formas tales como obleas, diapositivas, placas de pozos, membranas, por ejemplo. Además, el sustrato puede ser poroso o no poroso como puede ser requerido para la deposición de un fluido particular. Los materiales de sustrato apropiados incluyen, pero no se limitan a, soportes que se utilizan por lo general para síntesis química en fase sólida, por ejemplo, materiales poliméricos (por ejemplo, polímeros a base de poliestireno, acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, polivinil pirrolidona, poliacrilonitrilo, poliacrilamida, polimetil metacrilato, politetrafluoroetileno, polietileno, polipropileno, fluoruro de polivinilideno, policarbonato, divinilbenceno estireno), agarosa (por ejemplo, Sepharose®), dextrano (por ejemplo, Sephadex), polímeros de celulosa y otros polisacáridos, materiales de sílica y a base de sílica, vidrio (vidrio de poro controlado particularmente, o "CPG") y vidrios funcionalizados, cerámicas, y tales sustratos tratados con recubrimientos de superficie, por ejemplo, con polímeros microporosos (en particular, polímeros celulósicos tales como nitrocelulosa), compuestos metálicos microporosos (aluminio particularmente microporosa), proteínas de unión a anticuerpo (disponible de Pierce Chemical Co., Rockford IL), policarbonato de bisfenol A, o similares. Los sustratos porosos de interés particular incluyen, sin limitación: portaobjetos de vidrio poroso sin revestir, incluyendo portaobjetos CPG; portaobjetos de vidrio porosas recubiertas con un recubrimiento polimérico, por ejemplo, un recubrimiento de aminosilano o poli-L-lisina, teniendo así una superficie polimérica porosa; y portaobjetos de vidrio no porosas recubiertas con un recubrimiento poroso. El recubrimiento poroso puede ser un recubrimiento de polímero poroso, tal como puede estar compuesto de un polímero celulósico (por ejemplo, nitrocelulosa) o poliacrilamida, o un recubrimiento metálico poroso (Por ejemplo, compuesto de aluminio microporoso). Ejemplos de sustratos comercialmente disponibles que tienen superficies porosas incluyen los portaobjetos de tecnología de matriz de superficie fluorescente (FAST™) disponibles de Schleicher & Schuell, Inc. (Keene, NH), que están recubiertas con una capa de nitrocelulosa permeable a los fluidos con poros de 10-30 µm de espesor que aumenta sustancialmente el área de unión disponible por unidad de área de superficie. Otros sustratos porosos disponibles comercialmente incluyen los portaobjetos permeables CREATIVECHIP® actualmente disponibles de Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania), y sustratos que tienen geometría "tridimensional", en virtud de una estructura ordenada, altamente porosa que permite a los reactivos a fluir hacia y penetrar a través de los poros y canales de toda la estructura. Dichos sustratos están disponibles de Gene Logic, Inc. bajo el nombre comercial "Flow-Thru chip", y se describen por Steel et al. in Chapter 5 of Microarray Biochip Technology (BioTechniques Books, Natick, MA, 2000).

El término "poroso", como en un "sustrato poroso" o un "sustrato que tiene una superficie porosa", se refiere a un sustrato o superficie, respectivamente, que tiene una porosidad (porcentaje de vacío) en el intervalo de aproximadamente 1% a aproximadamente 99%, preferiblemente de aproximadamente 5% a aproximadamente 99%, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 15% a aproximadamente 95%, y un tamaño medio de poro de aproximadamente 100 Å a aproximadamente 1 mm, por lo general de aproximadamente 500 Å a aproximadamente 0.5 mm.

El término "impermeable" se utiliza en el sentido convencional que significa que no permite que el agua u otro fluido pase a través. El término "permeable", como se usa en este documento, significa no "impermeable". Por lo tanto, un "sustrato permeable" y un "sustrato que tiene una superficie permeable" se refieren a un sustrato o superficie, respectivamente, que puedan ser permeados con agua u otro fluido.

Mientras que los materiales de soporte anteriores son representativos de sustratos utilizados convencionalmente, se debe entender que un sustrato puede de hecho comprender cualquier material biológico, no biológico, orgánico y/o inorgánico, y puede estar en cualquiera de una variedad de formas físicas, por ejemplo, partículas, hebras, precipitados, geles, láminas, tubos, esferas, recipientes, capilares, almohadillas, rebanadas, películas, placas, y similares, y pueden tener además cualquier forma deseada, tal como un disco, cuadrado, esfera, círculo, etc. La superficie del sustrato puede o no puede ser plana, por ejemplo, la superficie puede contener regiones deprimidas o elevadas. Un sustrato puede contener adicionalmente o ser derivado para contener funcionalidades reactivas. Estos son ampliamente conocidos e incluyen, por ejemplo, soportes de dióxido de silicio que contienen grupos Si-OH reactivos, soportes de poliacrilamida, soportes de poliestireno, soportes de polietilenglicol, y similares.

El término "modificación superficial", como se usa en este documento, se refiere a la sustancia química y/o la alteración física de una superficie mediante un aditivo o un proceso sustractivo para cambiar una o más propiedades químicas y/o físicas de una superficie de sustrato o un sitio seleccionado o región de una superficie del sustrato. Por ejemplo, la modificación superficial puede consistir en (1) el cambio de las propiedades de humectación de una superficie, (2) la funcionalización de una superficie, i.e., proporcionando, la modificación o sustitución de grupos funcionales superficiales, (3) la desfuncionalización de una superficie, i.e., la eliminación de grupos funcionales superficiales, (4) de otra manera la alteración de la composición química de una superficie, por ejemplo, a través de ataque químico, (5) aumentar o disminuir la rugosidad superficial, (6) proporcionar un recubrimiento sobre una superficie, por ejemplo, un recubrimiento que exhibe propiedades humectantes que son diferentes de las propiedades de humectación de la superficie, y/o (7) depositar partículas sobre una superficie. Cualquiera de las superficies de sustrato en este documento se pueden modificar en el presente documento en una o más de las formas anteriores, y el término "superficie" se pretende que incluya superficies modificadas como se acaban de describir.

5 El término "binario" se refiere a un esquema de selección de dos posibilidades, por ejemplo expulsión o no expulsión en base a la detección de un nivel umbral de fluorescencia. El término "no-binario" se refiere a un esquema de selección que tiene más de dos posibles selecciones, por ejemplo expulsión a un primer recipiente objetivo basada en la detección de una emisión de fluorescencia superior a un umbral alto, expulsión a un segundo recipiente objetivo basada en la fluorescencia detectada por encima del umbral de detección, pero por debajo del umbral de fluorescencia alta, y no expulsión si no hay fluorescencia de una frecuencia dada es detectable.

El término "colonia de células" o "colonia de célula", como se usa en este documento se refiere a una o más células. En el caso de que una pluralidad de células comprenden la colonia, las células están lo suficientemente cerca para que las condiciones ambientales o externas de una célula única dada se afectan por las células vecinas.

10 El término "sustancialmente", como en, por ejemplo, la frase "sustancialmente todas las células de una matriz" se refiere a al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 99%, y más preferiblemente al menos 99.9%, de las células de una matriz. Otros usos del término "sustancialmente" implican una definición análoga.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que puede o no puede ocurrir la circunstancia descrita posteriormente, de modo que la descripción incluye casos en los que la circunstancia se produce y casos donde no.

15 En una realización, entonces, la invención se refiere a un método para la separación de volúmenes localizados dentro de un fluido, en donde cada volumen localizado tiene una impedancia acústica diferente que el fluido. Un detector se utiliza para identificar la ubicación de un volumen localizado y determinar una o más propiedades del mismo. A continuación, la energía acústica focalizada, se aplica al fluido de una manera eficaz para expulsar el volumen localizado del fluido como una gota. El dispositivo utilizado es preferiblemente un dispositivo de expulsión acústica, que comprende: uno o más recipientes o depósitos, cada uno adaptado para contener un fluido portador dentro del cual están suspendidas las células vivas; un eyector que comprende un generador de radiación acústica para generar la radiación acústica; un medio de enfoque para enfocar la radiación acústica en un punto focal dentro y cerca de la superficie de fluido en cada uno de los depósitos; y un medio para posicionar el eyector en relación de acoplamiento acústico a cada uno de los depósitos.

25 A continuación se presenta una descripción solamente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos adjuntos de realizaciones de la invención.

En los dibujos:

30 Las figuras 1A y 1B, denominadas colectivamente como la Fig. 1, ilustran esquemáticamente en la vista en sección transversal simplificada una realización de un dispositivo útil en conjunción con la invención, el dispositivo comprende el primer y segundo recipientes o depósitos de células, un eyector acústico, y un medio de posicionamiento del eyector. Al igual que con todas las figuras de referencia en este documento, en los que las partes son referenciadas por números similares, la figura 1 no está a escala, y ciertas dimensiones se pueden exagerar para mayor claridad de la presentación. La figura 1A muestra el eyector acústico acoplado acústicamente al primer recipiente o depósito de la célula y activado con el fin de expulsar una gota de fluido que contiene una sola célula desde dentro del primer recipiente o depósito de la célula hacia un sitio designado en una superficie de sustrato. La figura 1B muestra el eyector acústico acoplado acústicamente a un segundo recipiente o depósito de la célula.

40 Las figuras 2A, 2B y 2C, denominadas colectivamente como la figura 2, ilustran en una vista esquemática una variación de la realización de la invención de la figura 1, en la donde los recipientes o depósitos de células comprenden pozos individuales en una placa de pozos de depósito, y el sustrato comprende una placa de pozos más pequeña con un número correspondiente de pozos. La figura 2A es una vista en planta superior esquemática de las dos placas de pozos, i.e., la placa de los pozos del recipiente o depósito de las células y la superficie del sustrato que tiene las células dispuestas contenidas en gotas de fluido. La figura 2B ilustra la vista en sección transversal de un dispositivo que comprende la placa de pozos del recipiente o depósito de las células de la figura 2A acoplados acústicamente a un eyector acústico, en donde una célula contenida en una gota se expulsa desde un primer pozo de la placa de pozos del recipiente o depósito de las células en un primer pozo de la placa de pozos del sustrato. La figura 2C ilustra una vista en sección transversal del dispositivo ilustrado en la figura 2B, en donde el eyector acústico está acoplado acústicamente a un segundo pozo de la placa de pozos del recipiente o depósito de las células y además en donde el dispositivo está alineado para permitir el eyector acústico para expulsar una gota desde el segundo pozo de la placa de pozos del recipiente o depósito de las células a un segundo pozo de la placa de pozos del sustrato.

50 Las figuras 3A, 3B, 3C, y 3D, denominadas colectivamente como la Fig. 3, ilustran esquemáticamente en vista en sección transversal simplificada una realización del método de la invención en el cual se expulsan las células que tienen una unidad estructural del marcador expresado externamente sobre un sustrato usando el dispositivo de la figura 1. La figura 3A ilustra la expulsión de una gota de fluido que contiene células en un sitio designado de una superficie del sustrato. La figura 3B ilustra la expulsión de una gota que contiene una primera célula que muestra una primera unidad

estructural del marcador adaptado para su unión a una superficie de sustrato modificada a la que está unida una primera unidad estructural cognada. La figura 3C ilustra la expulsión de una gota de segundo fluido que contiene una segunda célula que muestra una segunda unidad estructural molecular adaptada para la unión a un sitio diferente en la superficie. La figura 3D ilustra el sustrato y la primera y segunda células dispuestas en estos por el proceso ilustrado en las figuras 3A, 3B y 3C.

Las figuras 4A y 4B, denominadas colectivamente como la figura 4, representan las células dispuestas contenidas en las gotas depositadas por expulsión acústica utilizando el dispositivo de la figura 1. La figura 4A ilustra dos células diferentes residentes en los sitios de matriz adyacentes, contenida en gotas de fluido que se adhieren a un sitio designado de una superficie de sustrato por la tensión superficial, con cada célula unida además al sitio, por unión de estreptavidina (SA) a una superficie biotinilada (biotina (B) unida). La estreptavidina se visualiza en el exterior de la célula como resultado de la transformación mediante una secuencia de codificación genética para la estreptavidina dirigida de expresión externa. La figura 4B ilustra dos células diferentes residentes en los sitios de matriz adyacentes, contenidas en gotas de fluido que se adhieren a un sitio designado de una superficie de sustrato por la tensión superficial, con cada célula unida adicionalmente al sitio por la unión de dos epítomos antigénicos expresados externamente característicos de la célula ( en este documento E1 y E2) a dos anticuerpos monoclonales diferentes (mAb-E1, mAb-E2) específicos, respectivamente, para los diferentes epítomos, cada mAb unido a la superficie en solamente uno de los sitios de matriz adyacentes.

Las figuras 5A, 5B, 5C, 5D, 5E y, denominadas colectivamente como la Fig. 5, representan un dispositivo que tiene un canal de fluidos como el recipiente del cual se expulsan las células sobre el sustrato. Las figuras 5A y 5B ilustran esquemáticamente el dispositivo. La figura 5C ilustra una vista superior de canales que contienen células vivas, con la superficie del sustrato que tiene células dispuestas contenidas en gotas de fluido. La figura 5D ilustra una sección transversal de un canal que muestra un saliente hacia arriba del piso del canal para dirigir las células suficientemente cerca de la superficie del fluido para la expulsión. La figura 5E ilustra una sección transversal de un canal que muestra el uso de la energía focalizada, tal como energía acústica, para dirigir las células suficientemente cerca de la superficie del fluido para la expulsión.

La figura 6 representa una vista superior de un canal central, un canal de expulsión, y dos dispositivos de detección D1 y D2 a lo largo de los cuales fluyen las células. También se representan dos sitios de expulsión representados por grandes elipses, cada uno que contiene una representación de una célula, de la cual las células se pueden expulsar perpendicular a la superficie sobre un sustrato (no se muestra), o en canales objetivo adyacentes.

Las figuras 7A y 7B, denominadas colectivamente como la Fig. 7, representan un dispositivo que tiene un canal de fluidos central que alimenta las células, a una velocidad alta, lateralmente a un canal periférico del cual se expulsan las células sobre el sustrato, preferiblemente mediante el uso de múltiples eyectores. La figura 7A ilustra una vista lateral de un canal vertical que contiene las células, dentro de un contenedor más grande. El fluido del canal vertical sólo se puede acceder a la periferia del contenedor más grande pasando por debajo de un reborde en ángulo que se proyecta lateralmente desde el canal vertical, con la distancia entre el reborde y el suelo del contenedor más grande disminuyendo radialmente hacia fuera de modo que las células pueden pasar radialmente hacia el exterior desde el canal central a la periferia. En la periferia, se forma un canal donde las células están más espaciadas, con relación a su separación en el canal vertical. La figura 7B es una vista superior que muestra las células a lo largo de las paredes laterales del contenedor más grande; Esta configuración permite la expulsión simultánea de un gran número de células mediante el uso de múltiples eyectores, para efectuar un alto rendimiento y eficiencia.

Las figuras 1 y 5 ilustran realizaciones alternativas del dispositivo empleado en vistas en sección transversal simplificadas. La figura 1 representa un sistema de expulsión de células donde el recipiente o depósito es un recipiente convencional, tal como una placa de Petri convencional, que es radialmente simétrica. En la figura 5, el depósito es un canal de fluidos, a través del cual, por ejemplo, las células vivas fluyen en un fluido portador. El dispositivo 11 incluye una pluralidad de recipientes o depósitos de las células, i.e., al menos dos recipientes o depósitos, con un primer recipiente se indica en 13 y un segundo recipiente se indica en 15, cada uno adaptado para contener un fluido, y teniendo cada fluido una superficie de fluido; por ejemplo, un primer recipiente de células que tiene células suspendidas en el fluido 14 y un segundo recipiente de células que tiene en células suspendidas en el fluido 16, con superficies del fluidos indicados respectivamente en 17 y 19. Los fluidos portadores de 14 y 16 y cualquiera de las células suspendidas en este, pueden ser los mismos o diferentes. Como se ilustra, los recipientes o depósitos son de construcción sustancialmente idéntica de manera que sean sustancialmente indistinguibles acústicamente, pero la construcción idéntica no es un requisito. Los recipientes se muestran como componentes extraíbles separados pero, si se desea, se fijan dentro de una placa u otro sustrato. Por ejemplo, la pluralidad de recipientes en la figura 1 puede comprender pozos individuales en una placa de pozos, de forma óptima aunque no necesariamente dispuestos en una matriz. Del mismo modo, la pluralidad de recipientes en la figura 5 puede comprender canales separados o canales individuales en una placa, por ejemplo un patrón de canales de microfluidos individuales grabado en una placa como por fotolitografía. Cada uno de los recipientes o depósitos 13 y 15 de las células es preferiblemente de forma simétrica bilateral (figura 5) o axialmente (figura 1). Cada uno de ellos tiene paredes 21 y 23 sustancialmente verticales, que se extienden hacia

arriba desde las bases 25 y 27 del depósito y terminan en aberturas 29 y 31, respectivamente, aunque se pueden usar otras formas de depósito, incluyendo aquellos con canales de fluidos que tienen una abertura u orificio para la expulsión en una ubicación específica. El material y el espesor de cada base del recipiente o depósito debe ser tal que la radiación acústica pueda ser transmitida a través de este y en el fluido contenido dentro del depósito.

5 Los dispositivos representados en las figuras 1 y 5 también incluyen un eyector 33 acústico, compuesto por un generador 35 de radiación acústica, para generar la radiación acústica, y un medio 37 de enfoque para enfocar la radiación acústica en un punto focal dentro del fluido desde el que una gota se expulsa, cerca de la superficie del fluido. Como se muestra en las figuras 1 y 5, el medio 37 de enfoque puede comprender una única pieza sólida que tiene una superficie 39 cóncava para enfocar la radiación acústica, pero el medio de enfoque puede ser construido de otras maneras como se discute a continuación. Por lo tanto, el eyector 33 acústico es adaptado para generar y enfocar radiación acústica para expulsar una gota de fluido desde cada una de las superficies 17 y 19 del fluido, cuando se acopla acústicamente a los depósitos 13 y 15, y por lo tanto a los fluidos 14 y 16, respectivamente. El generador 35 de radiación acústica y el medio 37 de enfoque pueden funcionar como una sola unidad controlada por un único controlador, o pueden ser controlados de forma independiente, dependiendo del rendimiento deseado del dispositivo. Por lo general, los diseños individuales del eyector se prefieren sobre los diseños múltiples de eyector, porque la precisión de la colocación de las gotas y la consistencia en tamaño de las gotas y la velocidad se consiguen más fácilmente con un solo eyector.

20 Como será apreciado por los expertos en el arte, cualquiera de una variedad de medios de enfoque se puede emplear junto con la presente invención. Por ejemplo, una o más superficies curvadas se pueden utilizar para dirigir la radiación acústica a un punto focal cerca de una superficie del fluido. Una de tales técnicas se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,308,547 de Lovelady et al. El medio de enfoque con una superficie curvada se ha incorporado en transductores acústicos disponibles comercialmente, tales como los fabricados por Panametrics Inc. (Waltham, Massachusetts). Además, las lentes de Fresnel son conocidos en la técnica para dirigir la energía acústica a una distancia focal predeterminada desde un plano del objeto. Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 25 5,041,849 de Quate et al. Las lentes de Fresnel pueden tener un perfil de fase radial que difracta una parte sustancial de la energía acústica en un orden de difracción predeterminado en ángulos de difracción que varían radialmente con respecto a la lente. Los ángulos de difracción se deben seleccionar para enfocar la energía acústica dentro del orden de difracción en un plano objeto deseado. Arreglos de fase de emisores de energía acústica también se han utilizado para enfocar la energía acústica en un punto determinado, como resultado de la interferencia constructiva y destructiva entre las ondas acústicas emitidas por las fuentes ordenadas (Amemiya et al. (1997) Proceedings of 1997 IS&T NIP 13 International Conference on Digital Printing Technologies, pp. 698-702).

30 También hay un número de maneras para acoplar acústicamente el eyector 33 a cada depósito individual y de este modo al fluido en el mismo. Uno de ellos es a través del contacto directo, como se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 4,308,547 de Lovelady et al., en donde un medio de enfoque construido a partir de un cristal hemisférico que tiene electrodos segmentados se sumerge en un líquido para ser expulsado. La patente antes mencionada describe además que el medio de enfoque puede estar situado en o por debajo de la superficie del líquido. Este método para acoplar acústicamente el medio de enfoque a un fluido es, sin embargo, indeseable cuando se utiliza el eyector para expulsar diferentes fluidos a partir de una pluralidad de recipientes o depósitos, ya que sería necesaria la limpieza repetida del medio de enfoque con el fin de evitar la contaminación cruzada. El proceso de limpieza alargaría necesariamente el tiempo de transición entre cada evento de expulsión de las gotas. Además, en dicho método, las células en el fluido se adherirían al eyector ya que se retiran de un recipiente, desperdiciando material celular que puede ser poco frecuente o irremplazable. Por último, la inmersión en el fluido no es posible con un medio de enfoque convencional de energía acústica cuando los depósitos son microfabricados, como cuando los recipientes de células son canales de microfluidos o micro-pozos, ya que los recipientes son demasiado pequeños.

45 Un experto en el arte de microfabricación sería capaz de hacer un medio de enfoque que comprende, un elemento curvo microfabricado. Del mismo modo, un medio de enfoque microfabricado construidas a partir de un cristal hemisférico que tiene electrodos segmentados, por ejemplo, un medio de enfoque miniatura como se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,308,547 de Lovelady et al., se puede hacer mediante técnicas de microfabricación de rutina. La inmersión sería entonces posible con las mismas desventajas que las anteriores. Para los canales de microfluidos o pozos, entonces, un medio de enfoque, así como una fuente de energía acústica podría ser integrado en el conjunto microfabricado.

55 Un método factible para cualquiera de las dimensiones del depósito sería para acoplar acústicamente un eyector convencional no-microfabricado o escala macro para los depósitos y los fluidos del depósito sin traer cualquier porción del eyector, por ejemplo, el medio de enfoque, en contacto con cualquiera de los fluidos que van a ser expulsados. Con este fin, la presente invención provee un medio de posicionamiento del eyector para posicionar el eyector en acoplamiento acústico controlado y repetible con cada uno de los fluidos en los recipientes o depósitos de células para expulsar las gotas procedentes de los mismos sin sumergir el eyector en el mismo. Este método por lo general implica el contacto directo o indirecto entre el eyector y la superficie externa de cada depósito. Cuando se utiliza el contacto

directo con el fin de acoplar acústicamente el eyector para cada depósito, se prefiere que el contacto directo sea totalmente conforme para asegurar la transferencia de energía acústica eficaz. Es decir, el eyector y el depósito deben tener superficies adaptadas para contacto de acoplamiento correspondiente. Por lo tanto, si se consigue el acoplamiento acústico entre el eyector y el depósito a través del medio de enfoque, es deseable que el depósito tenga una superficie exterior que se corresponde con el perfil de superficie del medio de enfoque. Sin contacto conforme, se pueden ver comprometidas la eficiencia y la precisión de la transferencia de energía acústica. Además, ya que muchos medios de enfoque tienen una superficie curva, el método de contacto directo puede requerir el uso de depósitos que tienen una superficie inversa formada especialmente.

De manera óptima, se consigue el acoplamiento acústico entre el eyector y cada uno de los depósitos a través del contacto indirecto, como se ilustra en las figuras 1A y 5A. En las figuras, se coloca un medio 41 de acoplamiento acústico entre el eyector 33 y la base 25 del depósito 13, con el eyector y el depósito situado a una distancia predeterminada entre sí. El medio de acoplamiento acústico puede ser un fluido de acoplamiento acústico, preferiblemente un material acústicamente homogéneo en contacto conforme con ambos el medio 37 de enfoque acústico y cada depósito. Además, es importante asegurarse de que el medio fluido está sustancialmente libre de material que tiene diferentes propiedades acústicas que el medio fluido en sí. Como se muestra, el primer depósito 13 está acoplado acústicamente al medio 37 de enfoque acústico, de tal manera que una onda acústica es generada por el generador de radiación acústica y dirigida por el medio 37 de enfoque en el medio 41 de acoplamiento acústico, que luego transmite la radiación acústica en el depósito 13.

En la operación, los depósitos 13 y 15 del dispositivo están cada uno lleno con el primer y el segundo fluido portador que tiene células o mezclas 14 y 16 de células suspendidas en este, respectivamente, como se muestra en las figuras 1 y 5. El eyector 33 acústico es posicionable por medio del medio 43 de posicionamiento del eyector, se muestra a continuación depósito 13, con el fin de lograr el acoplamiento acústico entre el eyector y el depósito a través de medio 41 de acoplamiento acústico. El sustrato 45 se sitúa por encima y en la proximidad del primer depósito 13, de tal manera que una superficie del sustrato, mostrada en las figuras 1 y 5 como la superficie 51 de la parte inferior, se enfrenta el depósito y es sustancialmente paralelo a la superficie 17 del fluido 14 en el mismo. Una vez que el eyector, el depósito, y el sustrato están en alineación apropiada, el generador 35 de radiación acústica se activa para producir la radiación acústica que se dirige por el medio 37 de enfoque a un punto 47 focal cerca de la superficie 17 del fluido del primer depósito. Como resultado, las gotas 49 se expulsan de la superficie 17 del fluido a un sitio designado en la superficie 51 de la parte inferior del sustrato. La gota expulsada se puede retener en la superficie del sustrato por solidificación de la misma después del contacto; En dicha realización, es necesario para mantener el sustrato a una temperatura baja, i.e., una temperatura que resulta en la solidificación de gotas después del contacto. Alternativamente, o además, una unidad estructural molecular o unidad estructural marcador mostrada en la superficie de la célula que contiene la gota se adhiere a la superficie del sustrato después del contacto, a través de la adsorción, la inmovilización mecánica, o la unión covalente.

A continuación, como se muestra en las figuras 1B y 5B, un medio 50 de posicionamiento del sustrato reposiciona el sustrato 45 sobre el depósito 15 con el fin de recibir una gota del mismo, en un segundo sitio designado. Las figuras 1B y 5B también muestran que el eyector 33 se ha colocado de nuevo por el medio 43 de posicionamiento del eyector por debajo del depósito 15 y en relación acoplado acústicamente a la misma en virtud de medio 41 de acoplamiento acústico. Una vez alineada correctamente, como se muestra en las figuras 1B y 5B, el generador 35 de radiación acústica de eyector 33 es activado para producir radiación acústica que se dirige entonces por el medio 37 de enfoque a un punto focal dentro del fluido 16 cerca de la superficie 19 del fluido, expulsando por lo tanto la gota 53 sobre el sustrato. Debería ser evidente que dicha operación es ilustrativa de cómo el dispositivo empleado se puede utilizar para expulsar una pluralidad de células individuales contenidas en gotas del fluido desde los depósitos con el fin de formar un patrón, por ejemplo, una matriz, de las células en la superficie 51 del sustrato. Debe ser igualmente evidente que el dispositivo puede ser adaptado para expulsar una pluralidad de células individuales contenidas en gotas del fluido expulsado desde uno o más depósitos en el mismo sitio de la superficie del sustrato.

En otra realización, el dispositivo está construido de manera que permita la transferencia de células contenidas en las gotas de fluido entre placas de pozos, en cuyo caso el sustrato comprende una placa de sustrato, y los depósitos que contiene las células suspendidas en el fluido son pozos individuales en una placa de pozos de depósito. La figura 2 ilustra dicho dispositivo, en donde cuatro pozos 13, 15, 73, y 75 individuales en la placa 12 de pozos de depósito, sirven como depósitos de fluidos para contener una pluralidad de un tipo específico de célula, o una mezcla de diferentes tipos de células, suspendidas en un fluido para ser expulsado en forma de gotas que contienen una sola célula, y el sustrato comprende una placa 45 de pozos más pequeña de cuatro pozos individuales indicados en 55, 56, 57, y 58. La figura 2A ilustra la placa de pozos de depósito o recipiente de la célula y la placa de pozos de sustrato en la vista del plano superior. Como se muestra, cada una de las placas de pozos contiene cuatro pozos dispuestos en una matriz de dos por dos. La figura 2B ilustra el dispositivo empleado en donde la placa de pozos de depósito o recipiente de la célula y la placa de pozos de sustrato se muestran en la vista en sección transversal a lo largo de los pozos 13,15 y 55, 57, respectivamente. Al igual que en las figuras 1 y 5, los pozos 13 y 15 de depósito contienen respectivamente células suspendidas en fluidos 14 y 16 portadores que tienen superficies de fluido portador respectivamente indicados en 17 y

19. Los materiales y el diseño de los pozos de la placa de pozos del recipiente o depósito de las células son similares a los de los recipientes ilustrados en las figuras 1 y 5. Por ejemplo, los recipientes o depósitos de las células mostrados en la figura 2B (pozos) y en la figura 5B (canales) son de construcción sustancialmente idéntica de manera que sea sustancialmente acústicamente indistinguible. En estas realizaciones, las bases de los depósitos de células son de un material (por ejemplo, un material que tiene apropiada impedancia acústica) y el espesor con el fin de permitir la transmisión eficiente de la radiación acústica a través del mismo en el fluido portador contenido.

El dispositivo de las figuras 2 y 5 también incluye un eyector 33 acústico que tiene una construcción similar a la del eyector ilustrado en la figura 1, que comprende un medio 35 generador acústico y un medio 37 de enfoque. La figura 2B muestra el eyector acústicamente acoplado a un pozo del depósito a través de contacto indirecto; es decir, se sitúa un medio 41 de acoplamiento acústico entre el eyector 33 y la placa 12 de pozos del depósito, i.e., entre la superficie 39 curvada del medio 37 de enfoque acústico y la base 25 del primer recipiente o depósito de la célula (pozo o canal) 13. Como se muestra, el primer recipiente o depósito de la célula (pozo o canal) 13 está acoplado acústicamente al medio 37 de enfoque acústico de tal manera que la radiación acústica generada en una dirección generalmente hacia arriba está dirigida por el medio 37 de enfoque en el medio 41 de acoplamiento acústico, que luego transmite la radiación acústica en el recipiente o depósito de la célula (pozo o canal) 13.

En funcionamiento, cada uno de los recipientes o depósitos de las células (pozo o canal) se llena preferiblemente con un fluido portador que tiene un tipo diferente de célula o de la mezcla de células suspendidas en el fluido portador. Como se muestra, los pozos 13 y 15 de depósito del dispositivo están cada uno lleno de un fluido portador que tiene una primera mezcla 14 de células y un fluido portador que tiene una segunda mezcla 16 de células, como en la figura 1, para formar las superficies 17 y 19 del fluido, respectivamente. Las figuras 1 y 5 muestran que el eyector 33 se sitúa debajo del pozo 13 de depósito por un medio 43 de posicionamiento del eyector con el fin de lograr con el mismo acoplamiento acústico a través del medio 41 de acoplamiento acústico.

Para la expulsión de las células individuales en placas de pozos de recipientes de células, la figura 2A muestra que la primera pozo 55 de sustrato de la placa 45 de sustrato, se sitúa por encima de la primera pozo 13 de depósito con el fin de recibir una gota expulsada desde el primer recipiente o depósito de la célula (pozo o canal).

Una vez que el eyector, el recipiente o depósito de la célula (pozo o canal), y el sustrato están en alineación apropiada, el generador de radiación acústica se activa para producir una onda acústica que se centra por el medio de enfoque para dirigir la onda acústica a un punto 47 focal cerca de la superficie 17 de fluido, siendo la cantidad de energía insuficiente para expulsar el fluido. Esta primera emisión de energía acústica focalizada permite la detección sónica de la presencia de una célula suficientemente cerca de la superficie para la expulsión, en virtud de la reflexión de la energía acústica, dicha reflexión que se debe a una diferencia en la impedancia acústica entre la célula y el fluido portador. Los métodos para determinar la posición de la célula mediante la detección sónica son entendidos fácilmente por los expertos normales en el arte de la microscopía acústica y artes relacionadas. Después de que se detecta y localiza una célula, otras propiedades se pueden medir antes de que se tome la decisión de hacer la expulsión. Además, si ninguna célula es lo suficientemente cerca de la superficie para la expulsión, la energía acústica se puede enfocar a distancias progresivamente mayores de la superficie del fluido hasta que una célula se sitúe y conduzca cerca de la superficie por la energía acústica focalizada u otros medios. Por ejemplo, un campo uniforme puede ser usado para mover la célula cerca de la superficie. Uno de dichos campos es un campo de fotones, que ejercerá una fuerza basada en el área de la sección transversal y el cambio en el impulso de fotones, determinado por la diferencia de los índices de refracción del medio portador y las células. Otro de dichos campos que se puede utilizar para mover las células es un campo eléctrico, que ejerce una fuerza sobre la base de carga superficial neta. Un fluido portador que tiene una densidad baja en relación con las células o un fluido portador que comprende un gradiente de densidad también se puede utilizar para células de posición, como para la expulsión. Se apreciará que existen numerosas maneras de efectuar una distancia celular media corta de la superficie del fluido. Para los canales, especialmente se pueden utilizar los canales microfabricados, medio mecánico o de fluidos para efectuar una distancia lo suficientemente pequeña de la superficie del fluido mediante la colocación de una estructura en forma de rampa a través del canal, lo que disminuye la profundidad del canal sobre la rampa a una profundidad del orden de la diámetro de la célula, con lo que sólo se permite fluir las células cerca de la superficie; es poco probable que las células se bloqueen en la rampa debido a que la velocidad del fluido será más alta, donde la profundidad del canal es más baja, tal como se representa en la figura 5D. La figura 5E representa a un canal de microfluidos, donde una fuerza que actúa sobre las células las mueve hacia la superficie.

Debido a que los canales de microfluidos se pueden fabricar con pequeñas dimensiones que reducen el volumen en el cual una célula se puede localizar, se prefieren especialmente para su uso con expulsión acústica, como la localización de una célula apropiada para la expulsión está muy simplificado. Por ejemplo, para un tipo de célula o de la mezcla de tipos de células que tienen un tamaño relativamente uniforme, por ejemplo un diámetro medio de 10.0  $\mu\text{m}$ , SD aprox. 0.5  $\mu\text{m}$ , el canal se puede diseñar para que sea de aproximadamente 12.0  $\mu\text{m}$  de ancho, creando una fila única de las células a una distancia media de aproximadamente 1.0  $\mu\text{m}$  desde la superficie del fluido (volumen de expulsión  $4/3\pi r^3 = 0.52 \text{ pl}$ ). En tal caso no es necesario para proporcionar una rampa (Fig. 5D) o cualquier otro medio para acortar la

5 distancia entre la superficie del fluido y la ubicación de la célula. La profundidad del canal es tan apropiada para el flujo de fluido deseado en el canal, pero el canal está preferiblemente equipado con un medio para dirigir células a una posición lo suficientemente cerca de la superficie para la expulsión (por ejemplo, una profundidad de canal no más de diez veces el diámetro celular). Un ejemplo específico es emplear canales de 40  $\mu\text{m}$  de profundidad que cada uno tiene una estructura en forma de rampa para dirigir las células a la superficie, con una altura de la rampa de aproximadamente 25  $\mu\text{m}$ . Las células se pueden expulsar del canal en un cierto rango de distancia limitada a lo largo del eje de flujo de fluido, reduciendo el área de la superficie del fluido escaneada. Por ejemplo, una abertura de 50  $\mu\text{m}$  para la expulsión de las células se puede proporcionar en un capilar cerrado, o una distancia limitada a lo largo del eje de flujo de un capilar abierto se puede utilizar para la expulsión, una ventaja significativa es que las células se mueven pasando el eyector, la reducción de la área de escaneado para las células. Incluso cuando se emplean tales métodos para flotar las células en un recipiente de escala macro, tales como una placa de Petri, cantidades significativas de tiempo se pueden desperdiciar en el escaneado en el plano paralelo a la superficie del fluido para localizar una célula para expulsar. Las ventajas de emplear los canales de microfluidos se disminuyen sólo ligeramente para una rango más amplia de tamaños de célula; por ejemplo, las células rojas de la sangre (RBC, diámetro de 7  $\mu\text{m}$ , SD 0,3  $\mu\text{m}$ , disco bicóncavo, altura 3  $\mu\text{m}$ ) mezclada con el tipo de célula precedente (diámetro medio de 10.0  $\mu\text{m}$ , SD 0.5  $\mu\text{m}$ ). Aunque los RBC pueden tener una profundidad significativa de la superficie con respecto al volumen de expulsión de fluido, y por lo tanto la energía significativa sería necesaria para expulsar un RBC, esta situación puede ser superada por los métodos descritos de forzar las células hacia la superficie del fluido. La ventaja de limitar la búsqueda lateral para un ancho de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ , en comparación con el ancho de varios cm de una placa de Petri, es inmediatamente evidente.

Una vez que una célula suficientemente cerca de la superficie se encuentra y se determina que satisface cualquier otro criterio para la expulsión, el generador de radiación acústica se activa para producir una onda acústica que se centra por el medio de enfoque a un punto focal cerca de la superficie 17 de fluido, siendo la cantidad de energía suficiente para expulsar un volumen de fluido que corresponde sustancialmente al volumen de la célula que va a ser expulsada, de modo que cualquier volumen expulsado no contiene más de una célula. La cantidad precisa de energía requerida para expulsar sólo el volumen requerido y no se puede calibrar más inicialmente aumentando lentamente la energía aplicada, a partir de una cantidad insuficiente para expulsar una célula deseada para la expulsión, hasta que no haya aplicado suficiente energía para expulsar la célula, la distancia deseada al sustrato objetivo local. Después de esta calibración inicial, aproximadamente la misma energía, con ajuste para cualquier cambio en el nivel de fluido, se puede aplicar para expulsar las células de sustancialmente el mismo volumen que la célula de calibración inicial. Como resultado, la gota 49, que contiene una célula viva única, es expulsada de la superficie 17 de fluido en el primer pozo 55 de sustrato de la placa 45 de pozos de sustrato. La gota que contiene las células se retiene en la placa de pozos de sustrato por la tensión superficial.

A continuación, como se muestra en la figura 2C, la placa 45 de pozo de sustrato es reposicionado por un medio 50 de posicionamiento del sustrato de tal manera que el pozo 57 de sustrato está situado directamente sobre el recipiente de la célula o depósito (pozo o canal) 15, con el fin de recibir una gota que contiene células del mismo. La figura 2C también muestra que el eyector 33 se ha colocado de nuevo por el medio de posicionamiento del eyector a continuación del pozo 15 de recipiente de la célula para acoplar acústicamente el eyector y el recipiente a través de medio 41 de acoplamiento acústico. Dado que la placa pozos de sustrato y placa de pozos de depósito o canales sobre un sustrato plano son de diferentes tamaños, sólo hay correspondencia, no identidad, entre el movimiento del medio de posicionamiento del eyector y el movimiento de la placa de pozos de sustrato. Una vez alineados correctamente, como se muestra en la figura 2C, el generador 35 de radiación acústica del eyector 33 es activado para producir una onda acústica que se dirige entonces por el medio 37 de enfoque a un punto focal cerca de la superficie 19 del fluido; esta onda se utiliza para detectar la presencia de una célula que está suficientemente cerca de la superficie del fluido portador que se va a expulsar. Después se detecta dicha células, y se mide cualquiera de las propiedades que se utilizan como criterios para la expulsión, el generador 35 de radiación acústica del eyector 33 se activa para producir una onda acústica que se dirige entonces por el medio 37 de enfoque a un punto focal cerca de la superficie 19 del fluido desde la que se expulsa la gota 53 que contiene las células en el segundo pozo de la placa de pozos del sustrato. Debería ser evidente que tal operación es ilustrativa de cómo el dispositivo empleado se puede utilizar para transferir una pluralidad de células individuales contenidas en gotas de tamaño adecuado de una placa de pozos a otra de un tamaño diferente. Alguien de experiencia normal en el arte reconocerá que este tipo de transferencia se puede llevar a cabo incluso cuando las células, el fluido portador, el eyector, y el sustrato están en movimiento continuo. Debe ser además evidente que una variedad de combinaciones de depósitos, placas de pozos, y/o sustratos se pueden utilizar en el dispositivo empleado para transferir gotas de fluido que contienen células individuales. Incluso debe ser evidente, además, que cualquier depósito se puede llenar con un fluido portador, o con un fluido portador que contiene células en suspensión, a través de expulsión acústica de gotas de fluido libres de células o, que contiene células respectivamente, antes de implementar el depósito para su posterior transferencia de gotas de fluido que contiene células, por ejemplo, para la deposición de matriz celular.

Como se discutió anteriormente, ya sea depósitos (pozo o canal) individuales (por ejemplo, extraíbles) o placas (pozo o canal) se pueden utilizar para contener suspensiones de células en fluidos portador de expulsión; los depósitos o los

5 pozos de la placa de pozos son de preferencia de forma sustancial acústicamente indistinguibles entre sí. También, a menos que se pretenda que el eyector sea sumergido en el fluido, los depósitos o placas de pozos deben tener propiedades de transmisión acústicas suficientes para permitir que la radiación acústica desde el eyector sea transportada a las superficies de los fluidos que van a ser expulsados. Por lo general, esto implica proporcionar depósitos o bases de pozos que tienen apropiada impedancia acústica en relación con el fluido portador, y que son suficientemente delgadas en relación con la atenuación acústica del material del que están hechos, para permitir que la radiación acústica se desplacen a través de la misma sin disipación o reflexión inaceptable. Además, el material utilizado en la construcción de depósitos debe ser compatible con los fluidos portadores contenidas, y ser no tóxicos para las células en suspensión.

10 Por lo tanto, como los depósitos o pozos están destinados para contener células vivas suspendidas en un fluido portador acuoso, depósitos hechos de materiales que se disuelven o se hinchan en agua o liberan compuestos tóxicos a las células vivas en el portador acuoso sería inadecuado para su uso en la formación de los depósitos, sustratos, o placas de pozos empleados en la presente invención. Para fluidos a base de agua, un número de materiales son apropiados para la construcción de depósitos; éstos incluyen, pero no se limitan a, los materiales utilizados para el tejido o cultivo celular, los biomateriales, silicio mono o policristalino, cerámica, tales como óxido de silicio y óxido de aluminio, metales tales como el acero inoxidable y el platino, y polímeros tales como poliéster y politetrafluoroetileno. Estos materiales se pueden preparar de modo que las sustancias tóxicas para las células no se lixivian en el fluido portador en cantidades suficientes para hacer el fluido portador tóxico para las células, y de modo que sus propiedades de superficie son apropiadas para el uso previsto. Por ejemplo, los recipientes o depósitos de los cuales se expulsan las células pueden ser funcionalizados en la superficie para prevenir la adhesión celular a la pared sólida o piso del material del recipiente.

25 Muchas placas de pozos apropiados para su uso con el dispositivo empleado están disponibles comercialmente y pueden contener, por ejemplo, 96, 384, o 1536 pozos por placa de pozos. La fabricación de placas de pozos apropiadas para su uso en el dispositivo empleado incluyen Corning Inc. (Corning, Nueva York) y Greiner America, Inc. (Lake Mary, Florida). La disponibilidad de tales placas de pozos disponibles comercialmente, sin embargo, no imposibilitan la fabricación y uso de placas de pozos hechas a medida que contienen al menos aproximadamente 10,000 pozos, o tantos como 100,000 pozos, o más. Para aplicaciones de formación de matrices, se espera que se puedan emplear aproximadamente 100,000 a aproximadamente 4,000,000 de depósitos. Además, para reducir la cantidad de movimiento necesario para alinear el eyector con cada depósito o pozo de depósito, es preferible que el centro de cada depósito sea localizado no más de aproximadamente 1 centímetro, preferiblemente no más de aproximadamente 1 milímetro, y de manera óptima no más de aproximadamente 0.5 milímetros, de cualquier otro centro de depósito.

30 Generalmente, el dispositivo puede estar adaptado para expulsar los fluidos de prácticamente cualquier tipo y la cantidad deseada. El fluido expulsado puede ser acuoso y/o no acuoso, aunque sólo fluidos acuosos son compatibles con la transferencia de las células vivas. Ejemplos de fluidos acuosos incluyen agua *per se*, soluciones iónicas y no iónicas solvatadas de agua, geles, suspensiones o suspensiones de sólidos, y líquidos acuosos que contienen células discretas. Debido a la precisión que es posible utilizando la tecnología de la invención, el dispositivo se puede utilizar para expulsar gotas desde un depósito adaptado para contener no más de aproximadamente 100 nanolitros de fluido, preferiblemente no más de aproximadamente 10 nanolitros de fluido. En ciertos casos, el eyector puede estar adaptado para expulsar una gota desde un depósito adaptado para contener aproximadamente 1 a aproximadamente 100 nanolitros de fluido. Esto es particularmente útil cuando el fluido sea expulsado contiene biomoléculas o células raras o costosas; en donde puede ser deseable expulsar gotas que tienen un volumen de aproximadamente hasta 1 picolitro.

35 A partir de las descripciones anteriores, es evidente que los diversos componentes del dispositivo pueden requerir control individual o de sincronización para formar una matriz de células sobre un sustrato. Por ejemplo, el medio de posicionamiento del eyector puede estar adaptado para expulsar gotas de cada recipiente o depósito de la célula en una secuencia predeterminada asociada con una matriz para que se prepare en una superficie del sustrato. Del mismo modo, el medio de posicionamiento del sustrato para posicionar la superficie del sustrato con respecto al eyector se puede adaptar para posicionar la superficie del sustrato para recibir las gotas en un patrón o matriz en el mismo. Uno o ambos medios de posicionamiento, i.e., el medio de posicionamiento del eyector y el medio de posicionamiento del sustrato, pueden ser construidos a partir de, por ejemplo, palancas, poleas, engranajes, motores lineales, una combinación de los mismos, u otros medios mecánicos conocidos para un experto normal en el arte. Es preferible asegurarse de que hay una correspondencia entre el movimiento del sustrato, el movimiento del eyector, y la activación del expulsor para asegurar la formación del patrón apropiada.

45 Además, el dispositivo puede incluir otros componentes que mejoran el rendimiento. Por ejemplo, como se alude anteriormente, el dispositivo puede comprender además un medio para regular la temperatura para garantizar la estabilidad de la muestra. Un ejemplo de regulación de la temperatura está bajando la temperatura de la superficie del sustrato para asegurar, por ejemplo, que las gotas expulsadas se adhieran al sustrato y que las células se congelen rápidamente para mantener su viabilidad. Los medios de enfriamiento pueden estar adaptados para mantener la superficie del sustrato a una temperatura que permite que el fluido parcialmente, o preferiblemente por completo,

congelar poco después de la gota de fluido que contiene células se pone en contacto con este. En el caso de las gotas de fluido acuoso que contienen células, el medio de regulación de la temperatura pueden tener la capacidad de mantener la superficie del sustrato a una temperatura dentro de un intervalo amplio, tal como entre -80 °C y 80 °C, dependiendo del tipo de célula y la meta de ensayo que se realiza.

5 Además, la aplicación repetida de energía acústica a un depósito de fluido puede resultar en calentamiento del fluido. El calentamiento puede, por supuesto, resultar en efectos no deseados en las células vivas. Así, el dispositivo puede comprender además medios para mantener fluido en los recipientes o depósitos de células a una temperatura constante. El diseño y construcción de tales medios de mantenimiento de la temperatura son conocidos para un experto normal en el arte y pueden comprender, por ejemplo, los componentes tales como elemento de calefacción, un  
10 elemento de refrigeración, un medio sensor de temperatura tal como un termopar, o una combinación de los mismos. Para aplicaciones biomoleculares y de deposición de células vivas, se desea generalmente que el fluido que contiene la biomolécula o las células se mantienen a una temperatura constante, con desviaciones de no más de aproximadamente 1 °C o 2 °C. Además, para las células vivas, se prefiere que el fluido se mantenga a una temperatura que no exceda de aproximadamente 1 °C por encima de la temperatura normal después de que la célula se deriva en el caso de los  
15 organismos de sangre caliente, y entre 16 °C y 37 °C para todos los otros organismos, ya sea procariota o eucariota, excepto para tipos específicos de células conocidas por tener escasa viabilidad a menos frío. Las células que requieren refrigeración para la viabilidad serán apreciadas por los expertos normales en el arte del cultivo y mantenimiento de las células para requerir un fluido portador de solución salina de la osmolalidad apropiada (ligeramente hiperosmótico) a aproximadamente 1 °C  $\pm$  aproximadamente 1 °C. Así, por ejemplo, cuando el fluido que contiene biomolécula es  
20 acuoso, puede ser óptimo mantener el fluido a aproximadamente -1 °C  $\pm$  aproximadamente 0.5 °C durante la expulsión.

La invención puede implicar la modificación de una superficie de sustrato antes de recibir las gotas de fluido que contiene las células expulsadas acústicamente. La modificación superficial puede implicar funcionalización o desfuncionalización, suavizando o rugosidad, recubrimiento, degradación, pasivación, u otras alteraciones de la  
25 composición química de la superficie o propiedades físicas. En una realización, la invención requiere la funcionalización con una unidad estructural cognada a una unidad estructural marcador mostrada externamente, pero otras modificaciones de la superficie descritas pueden afectar el éxito del método de la invención en un contexto específico

Uno de tales métodos de modificación de la superficie implica alterar las propiedades de humectación de la superficie. Dicho método se puede utilizar, por ejemplo, para facilitar el confinamiento de una célula contenida en una gota expulsada sobre la superficie dentro de un área designada, o para mejorar la unión superficial de unidades estructurales  
30 moleculares usadas para funcionalizar el sustrato o un sustrato específico local (tal como biotilación modelada lograda mediante expulsión acústica de una solución de biotilación). Un método preferido para alterar las propiedades de humectación de la superficie del sustrato implica la deposición de gotas de un fluido de modificación de la superficie apropiada en cada sitio designado de la superficie del sustrato antes de la expulsión acústica de los fluidos para formar una matriz de los mismos. De esta manera, la "dispersión" de las gotas expulsadas acústicamente y las células  
35 contenidas se puede optimizar, y garantizar la consistencia en tamaño de mancha (i.e., el diámetro, la altura y la forma general). Una forma de implementar el método implica acústicamente el acoplamiento del eyector a un depósito de modificador que contiene un fluido de modificación de la superficie y luego activar el eyector, como se describe en detalle anteriormente, para producir y expulsar una gota de fluido de modificación de la superficie hacia un sitio designado en la superficie del sustrato. El método se repite como se desee para depositar el fluido de modificación de la  
40 superficie en los sitios designados adicionales. Otros métodos de generación de matrices de biomoléculas, en particular las unidades estructurales cognadas que se unen específicamente a unidades estructurales de marcadores mostradas en la superficie de células transformadas o no transformadas, también se pueden utilizar. Por ejemplo, una sola unidad estructural cognada tal como biotina se puede vincular a la superficie del sustrato, ya sea de manera uniforme, o en un patrón (tal como un patrón de áreas biotilados rodeado por zonas no biotiladas). Las células para ser modeladas  
45 pueden ser transformadas para mostrar estreptavidina en su superficie.

La figura 3 ilustra esquemáticamente en vista en sección transversal simplificada una realización específica del método antes mencionado, en el cual dos células se depositan en diferentes sitios sobre un sustrato utilizando un dispositivo similar al ilustrado en la figura 1, pero incluyendo un depósito 59 adicional, que puede contener un tipo diferente de célula, o puede contener un fluido de modificación de la superficie, el fluido 60 que tiene una superficie 61 de fluido. La  
50 figura 3A ilustra la expulsión de una gota de 63 (en este documento representada que contiene una célula en lugar de un fluido de modificación de la superficie) del fluido modificación de la superficie o células 60 que contienen el fluido portador. Cuando se desee, un modificador de superficie se puede emplear para diversos fines; por ejemplo, un modificador de superficie se puede seleccionar para alterar las propiedades de humectación de los sitios designados en la superficie 51 del sustrato 45, donde las células son para ser depositadas. El eyector 33 se sitúa por el medio 43 de  
55 posicionamiento del eyector, por debajo del depósito 59 de modificador con el fin de lograr el acoplamiento acústico con el mismo a través de un medio 41 de acoplamiento acústico. Sustrato 45 se sitúa por encima del depósito 19 modificador en una localización que permite la deposición acústica de una gota del fluido 60 modificación de superficie en un sitio designado. Una vez que el eyector 33, el depósito 59 de modificador, y el sustrato 45 están en alineación apropiada, el generador 35 de radiación acústica se activa para producir la radiación acústica que se dirige por el medio

37 de enfoque de una manera que permite la expulsión de una gota 63 del fluido 60 modificación de superficie desde la superficie 61 del fluido a un sitio designado en la superficie 51 de la parte inferior del sustrato. Una vez que la gota 63 hace contacto con la superficie 51 del sustrato, la gota modifica un área de la superficie del sustrato para dar lugar a un aumento o disminución en la energía superficial de la zona con respecto a los fluidos depositados.

5 A continuación, como se muestra en la figura 3B, el sustrato 45 se vuelve a colocar por el medio 50 de posicionamiento del sustrato de tal manera que la región de la superficie del sustrato modificado por la gota 63 se encuentra directamente sobre el depósito 13. La figura 3B muestra también que el eyector 33 se sitúa por el medio de posicionamiento del eyector por debajo del depósito 13 para acoplar acústicamente el eyector y el depósito a través del medio 41 de acoplamiento acústico. Una vez alineada correctamente, el eyector 33 se activa de nuevo con el fin de  
10 expulsar la gota 49 sobre el sustrato. La gota 49 contiene una sola célula 65, preferiblemente mostrando una unidad estructural marcador en su membrana celular externa que se une específicamente por una unidad estructural cognada ligada a la superficie, para efectuar la unión específica a la superficie. La unidad estructural marcador se puede producir en una célula no transformada o puede ser el resultado de la transformación o manipulación genética, y puede significar  
15 opcionalmente transformación de tal manera que un gen distinto del marcador se exprese, por ejemplo, el marcador es un indicador de la transformación de otro gen.

Como se muestra en la figura 3C, el sustrato 45 se vuelve a colocar de nuevo por el medio 50 de posicionamiento del sustrato, de tal manera que un sitio diferente que el sitio donde la primera célula 65 única está unido, se encuentra directamente sobre el depósito 15, con el fin de recibir una célula contenida en una gota del mismo. La figura 3B muestra también que el eyector 33 se sitúa por el medio de posicionamiento del eyector por debajo del depósito 15,  
20 para acoplar acústicamente el eyector y el depósito a través de un medio 41 de acoplamiento acústico. Una vez alineado correctamente, el eyector 33 se activa de nuevo de modo que la gota 53 se expulse sobre el sustrato. La gota 53 contiene una segunda célula individual.

Las unidades estructurales cognadas son comúnmente ligandos, incluyendo oligonucleótidos y péptidos. Las unidades estructurales marcadores probablemente son péptidos o peptidoglicanos. La química empleada en la síntesis de oligonucleótidos unidos al sustrato se puede adaptar a expulsión acústica de gotas de fluido. Estos métodos pueden ser utilizados para crear matrices de oligonucleótidos sobre una superficie de sustrato para su uso con la presente invención. Dicha adaptación implicará generalmente técnicas no convencionales conocidos por los expertos en el arte de la química de ácido nucleico y/o descritos en la literatura y los textos pertinentes. Véase, por ejemplo, DNA Microarrays: A Practical Approach, M. Schena, Ed. (Oxford University Press, 1999). Es decir, las reacciones de  
30 acoplamiento individuales se llevan a cabo bajo condiciones estándar utilizadas para la síntesis de oligonucleótidos y empleados convencionalmente con sintetizadores de oligonucleótidos automatizados. Dicha metodología se describe, por ejemplo, en D.M. Matteuci et al. (1980) Tet. Lett. 521:719, la Patente de los Estados Unidos No. 4,500,707 de Caruthers et al, y las Patentes de los Estados Unidos No. 5,436,327 y 5,700,637 de Southern et al. La energía acústica focalizada también se puede adaptar para síntesis *in situ* de oligonucleótido combinatorio, oligopéptido, y oligosacáridos; estas síntesis se pueden utilizar para producir matrices combinatorias para su uso con la presente invención.  
35

Como alternativa, un oligómero se puede sintetizar antes de la unión a la superficie del sustrato y luego aplicado en un emplazamiento particular en la superficie utilizando la metodología de la invención. Una vez más, el oligómero puede ser un oligonucleótido, un oligopéptido, un oligosacárido, o cualquier otra unidad estructural oligómero biomolecular (o no-biomolecular).

40 Estos métodos de expulsión acústicos para su uso con la presente invención permiten la preparación de matrices moleculares, particularmente matrices biomoleculares, que tienen densidades sustancialmente más altas que las posibles utilizando técnicas de preparación de matriz actuales, tales como procesos de fotolitografía, técnicas de piezoeléctricos (por ejemplo, la tecnología de impresión usando inyección de tinta), y microdeposición. Las densidades de matrices que se pueden conseguir utilizando los dispositivos y métodos de la invención son al menos  
45 aproximadamente 1,000,000 biomoléculas por centímetro cuadrado de superficie de sustrato, preferiblemente al menos aproximadamente 1,500,000 por centímetro cuadrado de superficie del sustrato. Las unidades estructurales biomoleculares pueden ser, por ejemplo, moléculas y/u oligonucleótidos peptídicos. Tales densidades comúnmente no son necesarias para la creación de sitios que contienen las células individuales, que están separadas por una distancia de otras células. Pero la adaptación de tales métodos, por ejemplo, para funcionalizar una porción discreta de una  
50 superficie de sitio con una unidad estructural cognada que se une específicamente a una unidad estructural marcador, puede ser útil para la localización de las células dentro del sitio, o para poner en orden deliberadamente las células en las proximidades la una con la otra. Por ejemplo, una matriz de linfocitos (que consiste en células de diámetro pequeño (8  $\mu\text{m}$ ), medio (12  $\mu\text{m}$ ), o grande (14  $\mu\text{m}$ )), se puede crear por la funcionalización de una mancha de diámetro 10  $\mu\text{m}$  en el centro de cada sitio 100  $\mu\text{m}$  x 100  $\mu\text{m}$  con la unidad estructural cognada apropiada para unir específicamente la célula manchada. Esta disposición aseguraría la separación de células suficiente para permitir, por ejemplo, la prueba o la  
55 selección de las células individuales. La prueba se puede realizar, por ejemplo, por deposición acústica de las gotas de fluido que contienen el reactivo de un volumen suficiente para exponer o tratar una célula, sin exponer las células en los sitios adyacentes al fluido. Tal método permitiría, por ejemplo, la selección combinatoria de las células.

- Debe ser evidente, entonces, que son posibles muchas variaciones de la invención. Por ejemplo, cada una de las gotas expulsadas se puede depositar como una característica aislada y "final". Alternativamente, o además, una pluralidad de gotas expulsadas, cada uno que contiene una o una pluralidad de células, se pueden depositar en el mismo lugar sobre una superficie de sustrato con el fin de sintetizar una matriz de células, donde cada sitio contiene múltiples células del número determinable. Este método puede ser usado para células patrón para otros fines, tales como para diseñar un tejido basado en la replicación de una arquitectura histológica específica. Para las técnicas de fabricación de la matriz celular y de modelado que implican la unión de las células a una superficie de sustrato, se espera que las etapas de lavado se puedan utilizar entre las etapas de expulsión de gotas. Tales etapas de lavado pueden implicar, por ejemplo, sumergir toda la superficie del sustrato sobre el que las células han sido depositadas en un fluido de lavado.
- La invención permite la expulsión de gotas a una velocidad de al menos aproximadamente 1,000,000 gotas por minuto desde el mismo depósito, y a una velocidad de al menos aproximadamente 100,000 gotas por minuto de diferentes depósitos. Además, la tecnología de posicionamiento actual permite que el medio de posicionamiento del eyector se desplace de recipiente o depósito de la célula a otro de forma rápida y de una manera controlada, permitiendo de este modo la expulsión rápida y controlada de diferentes fluidos. Es decir, la tecnología actual disponible comercialmente permite que el eyector sea desplazado de un depósito a otro, con acoplamiento acústico repetible y controlado a cada depósito, en menos de aproximadamente 0.1 segundos para medios de posicionamiento de alto rendimiento y en menos de aproximadamente 1 segundo para el medio de posicionamiento ordinario. Un sistema diseñado a medida permitiría que el eyector sea desplazado de un depósito a otro, con acoplamiento acústico repetible y controlado, en menos de aproximadamente 0.001 segundos.
- Con el fin de proporcionar un sistema diseñado a medida, es importante tener en cuenta que hay dos tipos básicos de movimiento: pulso y continuo. El movimiento del pulso implica las etapas discretas de mover un eyector en su posición, emitiendo energía acústica, y moviendo el eyector a la siguiente posición; de nuevo, usando un medio de posicionamiento de alto rendimiento con dicho método permite el acoplamiento acústico repetible y controlado en cada depósito en menos de 0.1 segundos. Un diseño de movimiento continuo, por otra parte, mueve el eyector y los depósitos de forma continua, aunque no a la misma velocidad, y provee la expulsión, mientras que estos movimientos están ocurriendo. Dado que la anchura de pulso es muy corta, este tipo de proceso permite que se produzcan transiciones de depósito a una velocidad de más de 10 Hz, e incluso en más de 1000 Hz.
- Con el fin de asegurar la exactitud de expulsión de fluido, es importante para determinar la ubicación y la orientación de la superficie del fluido desde el que una gota va a ser expulsada con respecto al eyector. De lo contrario, las gotas expulsadas pueden ser de tamaño inadecuado o moverse en una trayectoria incorrecta. Por lo tanto, otra realización se refiere a un método para determinar la altura de una superficie del fluido y la proximidad de una célula en un depósito entre los eventos de expulsión. El método implica acústicamente el acoplamiento de un depósito que contiene fluido a un generador de radiación acústica, y luego activar el generador para producir una onda acústica de detección que se mueve a la superficie del fluido y se refleja en la misma como una onda acústica reflejada. Los parámetros de la radiación acústica reflejada se analizan a continuación con el fin de evaluar la relación espacial entre el generador de radiación acústica y la superficie del fluido. Dicho análisis implicará la determinación de la distancia entre el generador de la radiación acústica y la superficie del fluido y/o la orientación de la superficie del fluido en relación con el generador de radiación acústica.
- Más particularmente, el generador de radiación acústica se puede activar con el fin de generar la radiación acústica de baja energía que no es lo suficientemente enérgica para expulsar una gota desde la superficie del fluido. Esto se realiza normalmente mediante el uso de un pulso muy corto (del orden de decenas de nanosegundos) con respecto a la normalmente requerida para la expulsión de gotas (del orden de microsegundos). Determinando el tiempo que tarda la radiación acústica para ser reflejada por la superficie del fluido de vuelta al generador de radiación acústica, y luego correlacionar ese tiempo con la velocidad del sonido en el fluido, la distancia - y por lo tanto la altura de fluido - se puede calcular. La presencia y la profundidad de una célula debajo de la superficie se pueden determinar del mismo modo. Por supuesto, se debe tener cuidado con el fin de asegurar que la radiación acústica reflejada por la interfaz entre la base del depósito y el fluido se descuenta. Se apreciará por los expertos en el arte que dicho método emplea técnicas de sonar convencionales o modificadas.
- Una vez que el análisis se ha realizado, una onda acústica de expulsión que tiene un punto focal cerca del centro de una célula cerca de la superficie del fluido se genera con el fin de expulsar al menos una gota del fluido, en donde la intensidad y la direccionalidad óptima de la onda acústica de expulsión se determina usando el análisis mencionado anteriormente, opcionalmente en combinación con datos adicionales. La intensidad "óptima" y la direccionalidad se seleccionan generalmente para producir gotas de tamaño y velocidad uniforme. Por ejemplo, la intensidad deseada y la direccionalidad de la onda acústica de expulsión se puede determinar mediante el uso de no sólo la relación espacial evaluada como anteriormente, sino también: datos geométricos asociados con el depósito, datos de propiedades de fluido asociados con el fluido sea expulsado, dimensiones de la célula y el volumen consecuente celular, y/o datos históricos de expulsión de gotas que contienen células asociados con la secuencia de expulsión. Además, los datos pueden mostrar la necesidad de reposición del generador de radiación acústica con respecto a la superficie del fluido,

con el fin de asegurar que el punto focal de la onda acústica de expulsión está cerca de la superficie del fluido, cuando se desee. Por ejemplo, si el análisis revela que el generador de radiación acústica se sitúa de tal manera que la onda de expulsión acústica no puede ser focalizada cerca de la superficie del fluido, el generador de radiación acústica se vuelve a colocar utilizando movimiento vertical, horizontal, y/o de rotación para permitir un enfoque apropiado de la onda acústica de expulsión.

Debido a un aspecto de la invención es la expulsión de una sola célula, la naturaleza selectiva de la invención será inmediatamente apreciada. Usando la expulsión sencilla, las células de tamaño suficientemente diferentes se pueden separar, a partir de expulsión de las células más pequeñas. El dispositivo puede así ser empleado como un tipo de clasificador de células, además de su uso para la fabricación de matrices. Por ejemplo debido a los monocitos (diámetro 20  $\mu\text{m}$ ) son mucho mayores que tanto linfocitos pequeños (diámetro 8  $\mu\text{m}$ ) y medianos y grandes (12-14  $\mu\text{m}$  de diámetro) (correspondientes a un volumen celular para los monocitos de aproximadamente 3 veces más grandes (linfocitos grandes) hasta aproximadamente 16 veces más grandes (linfocitos pequeños)), una mezcla de estas células se puede expulsar selectivamente para organizar o clasificación. El nivel de energía acústica mínima apropiado para expulsar linfocitos pequeños será insuficiente para expulsar los linfocitos grandes y monocitos.

Una vez que todos los linfocitos pequeños han sido expulsados, los linfocitos grandes pueden ser expulsados utilizando un nivel de energía acústica mínima apropiado para expulsar los linfocitos grandes (que será apropiada para la inyección de linfocitos medianos), con poco peligro de expulsar los monocitos mucho más grandes y más pesados. La funcionalización de la superficie con unidades estructurales cognadas para unidades estructurales marcador mostradas externamente en un exterior de la célula ofrece otro nivel de selectividad, aunque requiere de expulsión sobre una superficie. Por último, como la invención provee para la localización acústica de una célula para determinar si está lo suficientemente cerca a la superficie a ser expulsado, diversas propiedades se pueden medir y utilizar como criterios adicionales para la expulsión. Un experto en el arte de clasificación de células apreciarán que dicha expulsión con criterios adicionales pueden ser adaptados a las aplicaciones de clasificación de células tradicionales, por expulsión en una trayectoria apropiada para transferir la célula expulsada a otro recipiente de fluidos, o mediante la aplicación sobre un sustrato y posteriormente el lavado de las células deseadas en un recipiente. Del mismo modo, la invención tal como adaptado para los volúmenes circunscritos de clasificación (tales como células) que tienen una impedancia acústica diferente que el fluido portador, es claramente adaptable a las partículas de clasificación (tales como perlas de vidrio o de polímero), incluyendo partículas etiquetados con una unidad estructural o partículas específicas que pueden ser de otra manera evaluadas mediante la medida alguna propiedad. Las propiedades útiles en la clasificación de células, y otros volúmenes circunscritos que difieren en la impedancia acústica (tales como partículas sólidas o gel), incluyen la densidad y el tamaño acústico, ambos de los cuales se pueden medir por medios acústicos conocidos. La densidad se puede calcular a partir del coeficiente de reflexión obtenido mediante la medición de las ondas acústicas reflejadas por la interfaz entre el volumen circunscrito y el fluido portador. El tamaño y forma se pueden medir mediante el uso de métodos de sonar convencionales.

La presente invención reflejada como un clasificador de células se configura preferiblemente con al menos un canal, preferiblemente más de un canal, a partir de la cual se expulsan las células. Un canal de expulsión preferiblemente permite que las células que van a ser clasificadas a pasar en una fila única. Las células se pueden expulsar a otros tipos de recipientes, incluyendo los canales de fluidos, o sobre un sustrato que no tiene particiones, tales como una matriz plana donde las células se localizan por la unión a distancias suficientes entre sí para formar un recipiente separado virtual para cada célula; alternativamente, el sustrato puede tener algunas células dispuestas lo suficientemente cerca para permitir interacciones entre ellos en los recipientes virtuales. Los recipientes convencionales, tales como una serie de pozos en una placa de pozos comercial, pueden servir como recipientes físicos para una serie de recipientes virtuales de una o más células, o pueden servir como receptáculos para las células individuales o para múltiples células de uno o más tipos de células. Las mezclas de células, tales como monocitos, linfocitos B, y los linfocitos T, pueden ser deseables para un experimento particular.

Múltiples eyectores para cada canal de expulsión puede aumentar el rendimiento, especialmente con múltiples canales, y se prefiere esta configuración. Cada eyector puede ser coordinado con uno o más medios de selección o detección. Dicha coordinación se puede efectuar manualmente, como por una operación individual, el uno o una pluralidad de eyectores asociados con un canal de expulsión dado. Preferiblemente, la coordinación de la detección y la expulsión se lleva a cabo por un sistema integrado que emplea un procesador, que hace la selección basándose en parámetros preseleccionados para la propiedad detectada. Los diferentes canales de expulsión se pueden diseñar para las poblaciones de células de diferentes tamaños, que se pueden separar por tamaño usando medios convencionales, tales como técnicas de enriquecimiento y filtración absoluta. Los múltiples eyectores preferidos para cada canal de expulsión pueden expulsar las células a múltiples objetivos, tales como placas de múltiples pozos o diferentes pozos en la misma placa, o diferentes recipientes, incluyendo canales de fluido.

Se pueden proveer canales objetivo para llevar las células expulsadas selectivamente a un destino. Para la expulsión conveniente de células de un canal de expulsión que está abierto en la parte superior en al menos una región, en canales eferentes u objetivo (u otros recipientes) situados en las cercanías, que también están abiertos en la parte

superior, el medio de expulsión acústica o la fuente de energía acústica focalizada debe ser capaz de impartir una trayectoria no vertical (i.e., una trayectoria que tiene un componente de velocidad paralelo a la superficie del fluido) a la gota expulsada. Se apreciará fácilmente que dicha velocidad de expulsión no vertical, si no es paralela al flujo en el canal de expulsión, se puede expulsar una gota en un recipiente tal como un canal objetivo que es espaciado horizontalmente del canal de expulsión. Dicho canal objetivo para la recepción de células desde un canal de expulsión puede o no puede estar en contacto de fluido con el canal de expulsión; además, el canal objetivo para recibir una célula o células expulsadas acústicamente también puede servir como un canal de expulsión para la expulsión de la célula a otro canal o recipiente objetivo, incluyendo el canal desde el que la célula fue expulsada originalmente.

Para una máxima eficiencia y flexibilidad de separación, el componente horizontal (o superficie-paralela) de la velocidad de expulsión se puede variar para permitir la expulsión de una célula (1) verticalmente desde el fluido, (2) paralelo al flujo del canal de expulsión de tal manera que el único componente no vertical de la velocidad es impartida por ese flujo, o (3) con varios componentes de la velocidad no vertical que no son paralelos a la dirección del flujo de fluido en el canal. Tal direccionalidad de expulsión (controlable por el enfoque del eyector acústico sí mismo) permite, por ejemplo, la expulsión desde un canal de expulsión central por un solo eyector para cualquiera de los dos canales objetivo que fluyen a cada lado del canal de expulsión, cada canal objetivo que fluye sustancialmente en la dirección paralela o anti-paralelo al flujo del canal de inyección. Más preferiblemente, dicho eyector acústico ajustable puede ser movido para expulsar las células de un canal a otro. Por ejemplo, en la disposición de tres canales paralelos donde las células se expulsan a uno o los otros canales laterales de un canal central, el eyector se puede mover preferiblemente a cualquiera de canal lateral para expulsar las células, ya sea de nuevo en el canal central, al canal separado opuesto lateralmente del canal central, o para otros canales que los tres descritos anteriormente, que sean lo suficientemente cerca de los canales laterales.

Además, se apreciará fácilmente que, durante la expulsión, el fluido en el recipiente o canal de expulsión, o en el recipiente o canal objetivo, es necesario que no fluya en cualquier dirección específica, o en absoluto, ya sea en términos absolutos o en relación con los fluidos en otros recipientes o canales. En los casos de flujo de fluidos, los canales objetivo pueden hacer lazos hacia el canal de expulsión, o el canal de expulsión puede hacer lazos hacia un canal objetivo; alternativamente, los canales objetivo o de expulsión pueden cruzar encima o por debajo uno del otro, como puede ser convenientemente fabricado por métodos de microfabricación de rutina (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 6,044,981 de Chu et al., teaching of a nanometer-scale buried channel filter constructed using sacrificial oxide and standard photolithographic techniques that employ the layering of a silicon material).

Para aplicaciones clínicas de clasificación de células, donde por razones médicas se pueden desear, velocidad y alto rendimiento, la clasificación limitada a menudo es posible. Por ejemplo, sólo ciertas células específicas, tales como las células madre inmaduras, necesitan ser separadas para infusión en el caso de los aloinjertos heterólogos (o posiblemente xenoinjertos). Para reinfusión autóloga, sólo las células enfermas necesitan ser eliminadas. En tales casos, el medio de expulsión acústica de células múltiple "pre-canal" se puede usar para expulsar las células no deseadas a partir de un canal dado secuencialmente o en serie, como coordinado con la única o una pluralidad de medios de detección para aumentar el rendimiento de células por canal. Este aumento de rendimiento por canal es adicional al que se consigue mediante el uso de una combinación de múltiples canales para la expulsión simultánea.

La figura 7 representa un dispositivo que tiene un canal de fluidos central que alimenta las células, a una velocidad alta, lateralmente a un canal periférico de la cual se expulsan las células sobre el sustrato, preferiblemente mediante el uso de múltiples eyectores. La figura 7A ilustra una vista lateral de un canal vertical que contiene las células, dentro de un contenedor más grande. El fluido del canal vertical sólo se puede acceder a la periferia del contenedor más grande pasando por debajo de un reborde en ángulo que se proyecta lateralmente desde el canal vertical, con la distancia entre el reborde y el suelo del contenedor más grande disminuyendo radialmente hacia fuera de modo que las células pueden pasar radialmente hacia el exterior desde el canal central hacia la periferia. En la periferia, se forma un canal donde las células están más espaciadas en relación con su separación en el canal vertical, y se mueven en el plano horizontal. Las figuras 7A y 7B representan dos elementos acústicos centrado en dos sitios 93 y 94 de inyección, situados en la circunferencia exterior de la cámara de fluido giratorio para expulsar las células, que llegan a un canal 89 periférico, que se encuentra justo dentro de la pared 92 del recipiente. Un dispositivo o sustrato recolector no se muestra. Múltiples elementos acústicos enfocados se sitúan preferiblemente sobre la circunferencia, donde cada uno preferiblemente se precede por al menos un detector de propiedad de célula, en este documento D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>. El líquido también se puede extraer de encima del reborde 91 en ángulo, para inducir aún más el flujo de partículas a la zona de expulsión en el punto focal del elemento acústico, y para disminuir el área horizontal en el cual una célula puede estar presente. Esta configuración tiene la ventaja de barrido de un gran volumen de fluido en la zona de expulsión y aumentar tanto el rendimiento y la eficiencia global de la clasificación de células. Todo el volumen de fluido, y todas las células contenidas, pasan a través de un canal 90 central común antes de pasar por debajo del reborde 91 en ángulo en ruta hacia el canal 89 periférico. El exceso de fluido que entra en el canal 89 periférico puede ser retirado por expulsión acústica (no mostrado), o mediante canales de microfluidos convencionales que tienen unas dimensiones demasiado pequeñas para las células que se separan al pasar a través; estos canales serán apreciados como hecho fácilmente mediante técnicas de microfabricación de rutina.

Además de los detectores y eyectores de multiplexación en una dicha unidad de separación, múltiples dichas unidades se pueden emplear simultáneamente en paralelo para mejorar en gran medida el rendimiento y la eficiencia. Además, las decisiones de expulsión no binarias se pueden hacer en cada eyector en la unidad, y más flexibilidad se puede obtener mediante el empleo de unidades en serie para separaciones complejas. Las unidades empleadas en serie se pueden optimizar para tamaños promedio de célula diferentes sucesivamente u otros parámetros de la célula para los procedimientos complejos de clasificación.

El medio de expulsión acústica orientable preferido se puede ajustar verticalmente para expulsar una gota, a pesar de movimiento del fluido, por expulsión de la gota con una velocidad horizontal exactamente igual y en dirección opuesta al flujo de fluido en el canal. El medio de expulsión se puede ajustar tan fácilmente para expulsar la gota con una velocidad horizontal neta en una dirección perpendicular al flujo de fluido en el canal, si hay o no cualquier velocidad horizontal en relación con un bastidor estacionario de referencia en paralelo al flujo de fluido del canal. Así, por ejemplo, una gota que contiene una célula se puede expulsar de un eyector direccionable a uno de dos canales cerca del canal de expulsión, o sobre una superficie del sustrato dispuesta por encima del canal de expulsión. La expulsión es no binaria porque existen cuatro opciones: no expulsar, expulsar a cada uno de dos canales posibles, y expulsión a la superficie del sustrato. Del mismo modo, incluso sin el sustrato sólido como una diana posible para la expulsión, las opciones de no expulsión o expulsión a cualquiera de los dos canales diana proporcionan un esquema de selección ternario en lugar de un binario en un solo eyector.

Varios medios de detección se emplean de forma rutinaria, a menudo el uso de etiquetas tales como anticuerpos específicos (Abs) que se imparten con alguna propiedad, tales como siendo ferromagnético o fluorescente o similar. Tales propiedades etiquetados e intrínsecos, tales como propiedades fluorescentes intrínsecas, pueden ser utilizados para determinar las características celulares tales como el diámetro, la relación del volumen nuclear a volumen citoplásmico, y, en algunos casos, condiciones intracitoplásmica y las intranucleares. Por ejemplo, la medición de la fluorescencia intrínseca del aminoácido triptófano (Trp) puede proporcionar información valiosa en cuanto a la identidad de una célula mediante la detección de las contribuciones al espectro neta de proteínas específicas, o de las mismas proteínas en diferentes condiciones. Cada molécula de triptófano tendrá espectros de absorción y emisión que se ven afectados o desplazado por el ambiente local de la molécula. Así, una proteasa tendrá un espectro diferente que otra proteasa, y la misma proteasa experimentará un cambio en su espectro si se cambia el pH del fluido que lo rodea. Así, entre los granulocitos, por ejemplo, los neutrófilos o células polimorfonucleares (PMN), con su gran cantidad de gránulos rodeados de membrana-neutrófilos, exhibirán una fluorescencia intrínseca Trp neta diferente que los eosinófilos y los basófilos, con sus gránulos característicamente diferentes. Del mismo modo, los núcleos, con altos niveles de histonas densamente empaquetadas en la cromatina, será discernible de citoplasma mediante fluorescencia intrínseca Trp. El etiquetado fluorescente de la superficie externa de una célula permite el dimensionamiento de la célula mediante la medición de la emisión de fluorescencia de la célula a medida que fluye más allá de un detector, con la duración de la emisión de cualquiera de los componentes del espectro de emisión a través de la ventana de detección es proporcional a la dimensión en la sección transversal paralela al flujo. La señal es proporcional al diámetro de las células si se obtiene la más larga duración posible de la señal, por ejemplo, se obtiene desde el otro lado del centro de la célula o a lo largo de la distancia más larga de la transección de la sección transversal. Si la detección es también de la emisión desde todos los puntos en la dimensión de la sección transversal ortogonal tanto a la dirección de flujo y el eje del detector al centro de la célula, entonces la intensidad integrada de la fluorescencia con el tiempo se dio una señal proporcional a la zona de la sección transversal presentada. La diferenciación de la intensidad medida como una función del tiempo con respecto al tiempo (que a su vez corresponde a la distancia para el flujo de velocidad constante) produce algo de información sobre la geometría, con células esféricas esperadas para exhibir una señal menos aumentada que, supongamos, las células cúbicas. Si se mide la fluorescencia intrínseca de contenido de la célula, la duración de la emisión es proporcional al diámetro de la célula, mientras que la intensidad de la emisión integrada en el tiempo es proporcional al paso de volumen total por la ventana de detección, y la intensidad diferenciada con respecto al tiempo produce información sobre la geometría.

Se apreciará fácilmente que uno cualquiera de un número de diferentes propiedades o parámetros se pueden detectar. Comúnmente, la propiedad detectada requerirá una señal de sondeo o de excitación. Por ejemplo, la mayoría de métodos espectroscópicos, incluyendo fluorescencia, utilizan mediciones de emisión electromagnética o absorción que resultan de la excitación por ondas electromagnéticas. Detección de tipo acústico o sonar requiere una señal de sondeo de la energía acústica focalizada que se refleja como resultado de diferencias en la impedancia acústica en una interfaz, tales como la interfaz entre una superficie celular y un fluido portador, o la interfaz entre el núcleo y el citoplasma. Se apreciará, por ejemplo, que las diferencias en la impedancia acústica entre empaquetadas densamente y firmemente sostiene el material nuclear y más flexible, citoplasma menos denso permite la detección acústica de los núcleos y la determinación de los volúmenes nucleares y citoplasmáticos. Un buen ejemplo de métodos ahora rutinarios para células etiquetadas fluorescentes de la superficie clasificada por tamaño, que emplean un haz láser que tiene un diámetro más grande que el más grande de las células en una mezcla de células, y en el cual se miden tanto la dispersión de luz y fluorescencia, se describe en la Patente de los Estados Unidos No. 4,765,737 de Harris et al. Se aprecia fácilmente que la información equivalente se puede derivar de los métodos de detección o sonar acústicos. La adaptabilidad, sin embargo, de la detección de la fluorescencia intrínseca para medir volúmenes nucleares y citoplasmáticos es apreciada

para ofrecer estimaciones más fiables del volumen total de células, el volumen citoplasmático, y el volumen nuclear de esos valores estimados a partir de mediciones dimensionales acústicas. Además, como se ha discutido previamente, la fluorescencia intrínseca puede, por ejemplo, distinguir entre los granulocitos morfológicamente similares.

5 Las diferencias detectadas en las características físicas se pueden manifestar como diferencias en las características visuales. Estas características visuales pueden ser detectables a simple vista, por examen microscópico, o por una cámara de vídeo integrado con el equipo de procesamiento de imagen adecuadamente programada. Las diferencias en las características ópticas, tales como transmisividad, reflectividad, color, polarización, o similar, se pueden medir.

10 Las diferencias detectadas pueden ser de otras características físicas, tales como la conductividad eléctrica, capacitancia, inductancia, la permeabilidad a las microondas, o propiedades magnéticas. Estas diferencias se pueden detectar por el uso de ultrasonido u otra energía acústica, o por técnicas espectroscópicas, siempre y cuando el método de detección no afecta sustancialmente a la viabilidad celular.

15 Una vez separado de acuerdo con una propiedad específica, las células se pueden separar más. Por ejemplo, una mezcla de células que tienen una distribución de tamaño ancho se puede separar en tres recipientes de tamaño: grandes, medianas y pequeñas. Estas poblaciones de tamaño, por ejemplo, la población de tamaño medio, puede cada una ser separada de nuevo por el tamaño en tres recipientes más. Comúnmente, la detección sucesiva de las diferencias más pequeñas en la misma propiedad se puede efectuar mediante el cambio de las condiciones de detección. Por ejemplo, los subgrupos de células separadas por grandes diferencias de tamaño, mientras que en un fluido que se mueve rápidamente, utilizando imágenes de sonar o acústicas, se pueden separar aún más por el tamaño en los fluidos se mueven más lentamente. Las células sanguíneas son un ejemplo de células que pueden ser tanto  
20 clasificados. Una mezcla de monocitos (esferas aproximadamente 11 - 20  $\mu\text{m}$  de diámetro), linfocitos (esferas sobre 8 [pequeños], 12 [medio] o 14 [grandes]  $\mu\text{m}$  de diámetro) y eritrocitos (discos como rosquilla de aproximadamente 7  $\mu\text{m}$  de diámetro por aproximadamente 3  $\mu\text{m}$  de alto) se puede separar por tipo de célula mediante el uso de un canal de expulsión alrededor de 22  $\mu\text{m}$  de ancho. Este canal emplea medios para flotar de forma fiable todas las células, tales como un fluido portador de densidad apropiada que no afecta a la viabilidad celular, o una estructura en forma de rampa física en el canal de expulsión justo aguas arriba desde el sitio de expulsión. Los linfocitos y monocitos son expulsados en los canales de tamaño apropiado, con el canal objetivo para los linfocitos que tienen un ancho de aproximadamente 15  $\mu\text{m}$  y el canal objetivo para los monocitos que tienen un ancho de hasta aproximadamente 22  $\mu\text{m}$ . Algunos eritrocitos pueden ser expulsados con linfocitos, y son menos propensos a ser expulsado con monocitos, debido a su capacidad para ser colocado junto a la célula expulsada durante la expulsión en el canal de expulsión. Los linfocitos que una vez  
25 fluyeron en el ancho del canal de 15  $\mu\text{m}$  pueden ser de tamaño acústicamente de nuevo, usando una velocidad más lenta de flujo que es apropiada para el mantenimiento general rápido de alto rendimiento, debido a que la subpoblación de linfocitos es meramente una fracción del número total de células.

30 Alternativamente, diferentes células en una mezcla se pueden separar por fluorescencia intrínseca usando excitación a un volumen; los grupos separados inicialmente se pueden separar aún más mediante la medición de emisión a una longitud de onda diferente, que podría sondear una propiedad diferente de las células.

35 El anterior es un tipo de multiplexación en serie, en donde diferentes propiedades se miden para todas o algunas de las subpoblaciones separadas inicialmente para separarlas aún más. Este método también es similar a la separación analógica, como la selección se puede hacer basándose en el valor de una propiedad que varía continuamente (como el tamaño). El método, como cualquier forma de procesamiento en serie, se puede llevar a cabo en paralelo para aumentar el rendimiento.

40 Para las mezclas complejas de células, ambas la multiplexación en serie y en paralelo se combina preferiblemente con múltiples detectores y diferentes tipos de detectores. Por ejemplo, se puede utilizar la detección acústica combinada con fluorescencia intrínseca en múltiples sitios de detección. Muchos parámetros se pueden determinar a partir de mediciones tanto la reflexión acústica como la fluorescencia en el tiempo. Por ejemplo, los diámetros celulares y nucleares, la presencia de un núcleo, y los volúmenes de células del núcleo/citoplasma/total pueden ser determinados por la integración de los datos de fluorescencia acústica e intrínseca. (Para los fines descritos en el presente documento, se toma el volumen citoplasmático para incluir el volumen de los orgánulos incluidos, tales como las mitocondrias en los macrófagos y los gránulos de granulocitos, aunque estos volúmenes son técnicamente no citoplasmático, y un término más preciso sería volumen extranuclear, i.e., volumen celular total menos volumen nuclear).  
45 La medición de las emisiones de fluorescencia intrínseca en varias frecuencias (por ejemplo, intensidad máxima frecuencia de emisión Trp para la media sobre tipos de células en la sangre; que para la media análoga de núcleos de células sanguíneas nucleadas, el desplazamiento de frecuencia correspondiente a PMN intensidad máxima de frecuencia de emisión Trp) permitirá la selección de células tales como granulocitos, que no se pueden distinguir por parámetros geométricos tales como la relación de volumen nuclear a citoplásmico. Aunque evitando etiquetas introducidas por lo general será deseable, cualquier método de selección que implican células deliberadamente  
50 etiquetadas también se pueden emplear con la presente invención.

La figura 6 representa una vista superior de un canal (79) central, un canal de expulsión, dos dispositivos de detección D<sub>1</sub> (87) y D<sub>2</sub> (88) más allá de la cual fluyen las células, y dos sitios de expulsión representado por grandes elipses, conteniendo cada uno una representación de una célula, de la cual las células se pueden expulsar perpendicular a la superficie sobre un sustrato (no mostrado), o en canales (81, 82) diana adyacentes. El flujo de las células pasan los detectores (87, 88) antes de alcanzar los sitios de expulsión. Las células se pueden expulsar de los sitios de expulsión con el único componente de la velocidad perpendicular al plano sustancialmente paralelo a la superficie del fluido (en este documento un plano horizontal, con la perpendicular a la misma siendo vertical). Cuando el componente de la velocidad de expulsión perpendicular es el único componente distinto de cero de la velocidad, la trayectoria de expulsión es perpendicular a la superficie del fluido (en este documento vertical), permitiendo la expulsión sobre una superficie del sustrato (no mostrado en este documento) para la formación de matriz como se representa en las figuras precedentes. Las gotas que contienen células también pueden ser expulsadas con un componente de velocidad no perpendicular, permitiendo trayectorias tales como los representados por las líneas punteadas.

Los canales (81, 82) representan cerca del canal (79) central o de expulsión son los canales objetivo para recibir células (84, 86) expulsadas. En cada lado del sitio de expulsión en el canal de expulsión, un canal de fluidos común se divide en dos canales justo antes de alcanzar el canal de expulsión, y el bucle de dos canales hacia el canal de expulsión, que fluye paralelo y antiparalelo al flujo de fluido en el canal de expulsión para una distancia corta. Los canales objetivo están suficientemente cerca del canal central para permitir que una célula que va a ser expulsada desde el canal de expulsión a cualquier canal objetivo seleccionado se apoya en el canal de expulsión cerca del sitio de expulsión. Como se configurado en esta representación, una célula en uno de los sitios de expulsión se puede seleccionar para no ser expulsada (85), seleccionada para ser expulsado verticalmente a una superficie (84) de sustrato (como para un sitio de matriz en la superficie del sustrato), o expulsado selectivamente a cualquiera de los cuatro sitios (86) de expulsión. Por lo tanto, hay seis posibles destinos de expulsión de cada sitio, incluyendo no-expulsión, permitiendo que hasta 11 subpoblaciones de células diferentes sean clasificadas (9 canales más dos superficies de sustrato). Alternativamente, los canales pueden ser utilizados para clasificar nueve tipos diferentes de células o las subpoblaciones de células, y la expulsión vertical de algunas de estas células en los sitios de matriz sobre una superficie de sustrato, tales como pozos de la placa de pozos, se puede realizar simultáneamente para la caracterización de las células clasificadas.

Una tarea común de la selección celular implica el muestreo de la colonia, en la que las superficies de agar se "apuñalan" con las células bacterianas o células de otros microorganismos. Normalmente, los dispositivos de muestreo de colonia contienen un sistema óptico que conduce un brazo robótico que contiene una aguja o bucle de inoculación. El sistema óptico localiza una colonia de interés, y la aguja clava el agar y entrega la colonia a un recipiente para un mayor crecimiento. Estos sistemas son a veces poco fiables en su capacidad para encontrar una colonia de interés.

Las agujas de estos dispositivos deben ser enjuagadas y esterilizadas entre inoculaciones. El proceso de lavado y esterilización conduce a la deposición de depósitos de carbono y residuos químicos, que puede interferir con el crecimiento adicional del organismo de interés. Los brazos robóticos mecánicos también son propensos a fallar y son capaces de posicionamiento relativamente impreciso para el muestreo de colonias estrechamente espaciados o entrega de células en matrices densas.

La expulsión acústica de las células directamente a partir de colonias ofrece un método superior para la expulsión de un número específico de células a partir de cualquier número de colonias de bacterias que crecen en un agar u otro semisólido, gel, o similares. Las colonias densamente empaquetadas se pueden muestrear individualmente sin contaminación de una colonia muestreada por las células de las colonias cercanas, debido a la capacidad de enfocar con precisión y exactitud la energía acústica.

La presencia de colonias se puede detectar por medio microscópico acústico, por ejemplo, mediante la detección de una impedancia acústica diferente en la superficie del agar en una región que tiene una colonia, en comparación con una región que tiene ninguna colonia. La capacidad de intercambiar o adicionar otros innumerables medios de detección, incluyendo la microscopía óptica estándar y la detección de la fluorescencia intrínseca del triptófano, será evidente de inmediato.

Las células se pueden expulsar en los pozos de placas de pozos u otros recipientes físicos. Alternativamente, un sustrato plano con o sin medios específicos para unir las células al sustrato se pueden emplear. Los recipientes o pozos pueden contener medios nutritivos, por ejemplo agar nutritivo, antes de la expulsión de las células de la misma, o nutrientes se pueden adicionar después de la expulsión. Ajustar la potencia de la energía acústica entregado en una unidad de tiempo (a un punto focal suficientemente cerca de la superficie para que la expulsión se produzca, y manteniendo esta distancia constante), y por consiguiente el volumen de la gota, permite la deposición de un número deseado de células por recipiente objetivo o receptáculo de una manera reproducible. Cuando múltiples colonias discretas son detectables en uno o más recipientes de cultivo, las muestras de células pueden estar dispuestas por colonia sobre una placa de pozo u otra superficie del sustrato.

Dependiendo del organismo y la morfología de la colonia, las células se pueden expulsar del agar u otra superficie nutritiva sin la necesidad de crear condiciones específicas para facilitar la expulsión, tales como la reducción de la viscosidad del fluido en la colonia o del gel subyacente o semisólido que forma el sustrato o medio. Algunas circunstancias requieren medios para la promoción de las condiciones específicas que permiten la expulsión. Varios medios para la creación de condiciones permisivas de expulsión incluyen la deposición de reactivos químicos o bioquímicos en los sitios de colonia para afectar la adhesión intracelular y/o la viscosidad del fluido extracelular o el agar subyacente (u otro medio similar a un gel). Por ejemplo, un fluido que contiene agarosa (u otro enzima degradante-agar) se pueden depositar para licuar el agar subyacente a una colonia, o para reducir la viscosidad de un medio líquido con el fin de facilitar la expulsión de las células de una colonia. Se pueden emplear, otras enzimas, por ejemplo, dependiendo del tipo de medio sobre el cual se cultivan las células.

Aunque las células eucariotas no suelen crecer en el medio de tipo gel, a menudo requieren algún tratamiento para reducir la adhesión intracelular, que también puede ser necesario para algunas células procariotas. Si las células eucariotas se cultivan en gel u otro medio semisólido, efectuando un cambio de fase o viscosidad en el sustrato subyacente a las células por la entrega de la energía acústica o de otro tipo se puede utilizar junto con cualquier tratamiento necesario para reducir la adhesión entre las células.

Preferiblemente, la región subyacente a la colonia se calienta a una temperatura que funde ( $T_m$ ) el agar (u otro gel o medio semisólido) sin afectar a la viabilidad de las células en la colonia suprayacente. Para este efecto, se pueden utilizar un agar  $T_m$  bajo o medio similar a un gel. Además, el cambio de fase debe estar localizado en la región subyacente a la colonia de la que las células se deben ser expulsadas de modo que las colonias vecinas no se interrumpen. De fusión al por mayor de todo el medio en una placa de agar que contiene numerosas colonias sería indeseable porque todas las colonias discretas se unirían antes de algunas células de cada podrían ser expulsados. Con el fin de que las células se pueden expulsar de cada colonia en rápida sucesión, el cambio de fase localizada o de fusión del medio subyacente a las colonias de las que las células se expulsan sucesivamente debe ser alcanzado rápidamente. Varios medios de calentamiento localizado rápido se pueden emplear. Por ejemplo, un elemento de calentamiento eléctrico que comprende un elemento delgado o pasador puede ser insertado bajo la colonia y el medio subyacente fundido por un impulso eléctrico.

El medio de calentamiento que no requieren contacto físico entre el dispositivo de calentamiento y el medio son preferibles. Por ejemplo, dirige la energía electromagnética, tal como microondas o radiación infrarroja dirigida o un haz de láser que tiene una sección transversal y frecuencia apropiadas, se pueden emplear. Preferiblemente, la fuente de radiación electromagnética está situado de manera que las ondas electromagnéticas deben pasar por el medio subyacente a una colonia de la que se pueden expulsar a las células, por ejemplo, la fuente se encuentra bajo el medio, de modo que el medio subyacente se calienta antes y en mayor medida que las células en la colonia suprayacente, para proteger a la células del calentamiento indeseado.

Licuar el medio por debajo de una colonia por energía acústica focalizada es un medio más preferible de efectuar la fusión localizada debido a que la profundidad, así como la amplitud del volumen a la que la energía térmica se entrega puede ser controlada. La energía acústica focalizada se puede utilizar para calentar una región cilíndrica que tiene un diámetro de tan poco como aproximadamente  $20\ \mu\text{m}$  y la altura de tan poco como aproximadamente  $200\ \mu\text{m}$ , sin calentamiento significativo fuera de la zona cilíndrica para sustancias que tienen conductividad térmica moderada. Por lo tanto, una vez que una colonia se encuentra, por ejemplo, por medios acústicos, el foco de la energía acústica se puede ajustar para que la potencia sea insuficiente para entregar la energía umbral para expulsar una gota de la superficie. La región de la calefacción se controla espacialmente en un plano paralelo a la superficie del medio (amplitud) para ser totalmente subyacente de los límites de la colonia de interés. La profundidad de enfoque acústico y de calefacción se ajusta para estar por debajo de la superficie o de la interfaz entre el medio y la colonia recubre, evitando de ese modo aún más la expulsión. Para efectuar el calentamiento más uniforme en el foco deseado sin expulsión, la frecuencia de la onda acústica se puede reducir con respecto a la frecuencia utilizada para la expulsión. La amplitud de la onda acústica se puede ajustar la rapidez de calefacción.

En algunos casos, las células que forman las colonias para ser expulsadas se pueden transformar para licuar el medio subyacente. Por ejemplo, cuando se utiliza un medio de gel a base de agar, las células pueden ser transformadas para liberar agarasa, una enzima que se licua hidrolíticamente el agar subyacente. Las enzimas análogas se pueden utilizar para diferentes medios, por ejemplo celulasa se puede utilizar para hidrolizar diversas unidades estructurales de polisacáridos. La transformación para liberar agarosa se puede hacer únicamente para facilitar la expulsión de un material en gel de agarosa, o se puede hacer en conjunto con otra transformación para facilitar selectivamente la expulsión únicamente de colonias que han sido transformadas. Por ejemplo, las bacterias pueden ser transformadas con una construcción para la expresión de pancitoqueratina (una proteína de mamífero) en el citoplasma y la liberación de agarasa a los alrededores de células, de modo que la capacidad de expulsión es un marcador para las células transformadas.

5 Aunque no es necesario para los métodos y sistemas para clasificar y poner en orden las células de la presente invención, la multiplexación serie y paralelo preferida de la detección y la expulsión se prestan a, y se integran preferiblemente con, un procesador. Las funciones del procesador para integrar los diversos datos de detección y para calcular el tiempo que una célula detectada y medida llegará a un sitio de expulsión, y para efectuar la expulsión apropiada, haciendo que la célula contenida en la gota expulsada con el vector de velocidad apropiado y la trayectoria para orientar correctamente el recipiente objetivo, el canal, o sitio matriz. La máxima eficiencia y el rendimiento se pueden por lo tanto efectuar con un alto nivel de ambos multiplexación de serie y paralelo de sitios de detección y expulsión, con un gran número de objetivos de expulsión seleccionables en cada sitio.

10 La capacidad de medir una propiedad como un criterio de expulsión, además de permitir que la invención sea utilizada para la clasificación de células, permite la clasificación de los sólidos no vivos, geles, y regiones discretas de fluido desde el fluido portador. Se apreciará fácilmente que la expulsión de, por ejemplo, las perlas utilizadas para la síntesis combinatoria en fase sólida y teniendo algún marcador o la propiedad identificación de la secuencia combinatoria, se puede separar por el método de la invención.

### Ejemplo 1

15 Eyección acústica de monocitos sobre un sustrato como una matriz de una mezcla de células de sangre periférica con separación simultánea de los glóbulos rojos, granulocitos y linfocitos en Canales

20 Policlonal-Ab de conejo contra MHC humano (se muestra en todas las células) se genera y un único clon se selecciona que se une a un epítipo MHC común a todos los seres humanos en lugar de a los epítipos específicos a los individuos. Un sustrato es funcionalizado con el anticuerpo monoclonal (mAb) mediante métodos de rutina. Si monocristalino es elegido como el sustrato debido a la gran cantidad de métodos conocidos para la funcionalización de Si.

25 Un canal que tiene un ancho de 25  $\mu\text{m}$ , como se ilustra en la figura 6, se utiliza para reducir el tiempo de búsqueda de células para expulsar. Este componente central de canal de expulsión de la unidad de clasificación es de unos 6 cm de longitud, abierto en la parte superior entre aproximadamente 2.75 y 3.25 cm y en un extremo por aproximadamente 0.5 cm. Las células de la sangre se suministran desde canales conectados de manera fluida, no mostrados. Dos detectores,  $D_1$  y  $D_2$ , se despliegan a aproximadamente los primeros 0.5 cm del canal representado. Los transductores de energía acústica focalizada se encuentran directamente debajo de los sitios de expulsión en las regiones del canal de expulsión que están abiertos en la parte superior. A cada lado de cada sitio de expulsión, un canal de fluidos común se divide en dos canales que hace lazos hacia el canal de expulsión de tal manera que, por una corta distancia, el fluido en un canal fluye paralelo y el fluido en el otro antiparalelo al flujo de fluido en el canal de expulsión; estos dos canales están suficientemente cerca del canal de expulsión para permitir que una célula sea expulsada desde el canal de expulsión a un canal objetivo seleccionado. Hay cuatro canales objetivo por sitio de expulsión, y ocho en total. La expulsión acústica puede impartir un componente de la velocidad de magnitud cero, o un componente de la velocidad direccional no-cero, paralelo a la superficie del fluido, por ejemplo, en cualquier dirección horizontal. Esto permite que las gotas que contienen células se expulsen acústicamente, en base a las propiedades detectadas, a cualquiera de los cuatro canales objetivo o sobre una superficie de sustrato orientado sustancialmente paralelo a la superficie del fluido por encima del sitio de expulsión, o nada en absoluto. Los canales se fabrican de una placa de vidrio grabada con HF fusionado con calor a una placa de vidrio cubierta (excepto cuando está abierto en la parte superior) mediante técnicas de microfabricación de rutina.

30 Los detectores utilizados son laser/fluorescencia intrínseca ( $D_1$ ) y la imagen acústica ( $D_2$ ). Los transductores acústicos de expulsión también llevan a cabo, algunas de las funciones de detección en el sitio de expulsión, en un mínimo de detección si la célula está suficientemente cerca de la superficie del fluido para la expulsión. Las células se ven obligadas a la superficie por una estructura en forma de rampa, tal como se representa en la figura 5D. La severidad adicionada se efectúa mediante el ajuste de la energía acústica entregada basado en el volumen de la célula que va a ser expulsada, lo que impide la expulsión de las células sustancialmente más grandes si hay un error en el dimensionamiento que subestima sustancialmente el tamaño de célula.

35 La fluorescencia, dispersión de la luz, y los datos acústicos se introducen en un procesador que controla el proceso. Los datos de dimensionamiento, incluyendo las dimensiones, los volúmenes de las células y los núcleos detectados, y proporciones pertinentes citoplasmáticas/total/volumen o tamaño nuclear, se obtienen a partir acústico integrado, fluorescencia, y/o los datos de dispersión. El espectro de emisión de fluorescencia Trp intrínseco también se mide para cada célula. Un árbol de decisión se basa en las proporciones de tamaño y volumen primero, y en segundo lugar los datos intrínsecos de fluorescencia, ya que la mayoría de las células será distinguible por características morfológicas. Los glóbulos rojos (GR) tendrán cierta superposición en su dimensión más grande con linfocitos pequeños, pero tendrán un volumen total mucho más pequeño incluso si los radios son idénticos, porque los linfocitos son esféricos, mientras que los RBC tienen forma de rosquilla. Los RBC también serán no nucleados. Los linfocitos pequeños tendrán grandes proporciones de volumen nuclear a citoplásmico (y nuclear para el total de células), como linfocitos medianos y grandes. Los linfocitos medianos y grandes solaparan en tamaño con los granulocitos y monocitos pequeños, pero tendrán

sustancialmente mayores proporciones de volumen nuclear a citoplasmático que cualquiera, por lo que será innecesario el empleo de los datos de espectro de fluorescencia, a excepción de rigurosidad añadido, en la mayoría de los casos. Los monocitos que se solapan en tamaño con los granulocitos tenderán a tener diferentes características morfológicas, incluyendo más grandes proporciones de volumen nuclear a citoplasmático y una señal nuclear continua, con su núcleo de dos lóbulos que parecen casi esféricos; granulocitos tendrán una señal nuclear discontinua y por lo tanto parecerá que son multinucleadas debido a su morfología nuclear multilobular. Un espectro de fluorescencia proporcionará los datos concluyentes para algunas pequeñas monocitos, para comprobar que no son granulocitos o linfocitos grandes. Los granulocitos, incluyendo PMNs, eosinófilos, y basófilos, son morfológicamente similares y por lo tanto se distinguen basándose en las diferencias en sus espectros de emisión de fluorescencia intrínseca Trp, que se cambian característicamente como resultado de sus diferentes gránulos característicos. Las plaquetas también están presentes en la sangre periférica y son técnicamente fragmentos de células, no nucleados, y más pequeños que los glóbulos rojos. Debido a que son de uso en procedimientos quirúrgicos, que no son expulsados del canal central o de expulsión y se recogen para su posterior purificación con el plasma sanguíneo.

La sangre periférica se puede separar de un individuo o de un número de individuos, aunque, como se apreciará fácilmente, Igs debe ser retirado de la sangre antes de mezclar diferentes tipos de sangre antigénicos. Los ocho canales objetivo en los dos sitios de expulsión se utilizan para las diferentes células expulsado, con linfocitos pequeños, medianos y grandes, y el exceso de monocitos expulsado del sitio de expulsión más distal, expulsan a los canales de expulsión separadas. En el sitio de expulsión proximal a D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, PMNs, eosinófilos, basófilos y los glóbulos rojos se expulsan a los canales objetivo separados. El sitio proximal también se utiliza para crear una matriz de monocitos para la experimentación, utilizando el sustrato proporcionado. Se apreciará fácilmente que una matriz adicional de uno o más tipos de células se puede hacer simultáneamente en el sitio de expulsión distal; por ejemplo, una matriz se puede crear de todos los tipos de células nucleadas donde ningún vecino más cercano es del mismo tipo de células, o se puede crear una matriz de linfocitos grandes, que son más propensos a ser linfocitos de memoria.

El canal de expulsión se conecta fluidicamente, mediante métodos de rutina a una columna de fluido al que se adiciona una suspensión de células. Las dimensiones de la columna permiten que se adicionen 5 ml de fluido portador y células, por lo que existe una presión de la columna suficiente para iniciar el flujo de fluido a través del canal y para permitir que el fluido llegue a la zona superior abierta en un tiempo suficientemente corto. A continuación, la parte superior de la columna está conectada a un regulador de presión que permite que la presión de gas por encima del fluido portador en la columna sea regulada para permitir el ajuste fino, la terminación y reiniciación del flujo del fluido portador a través del canal.

El fluido portador puede ser una solución salina fisiológica u otra solución de electrolitos que tiene una osmolalidad aproximadamente equivalente a la del suero de la sangre. Los monocitos se colocan sobre un sustrato mantenido a aproximadamente 38 °C. Se elige un sustrato empleado que sea plano, y tenga una densidad de 10,000 sitios/cm<sup>2</sup>, con cada sitio ocupado por una sola célula. Se obtienen los monocitos circulantes de 10 individuos diferentes y se purifican por métodos de rutina.

Los monocitos de cada individuo se unen a la matriz por expulsión acústica de una gota que tiene un volumen de aproximadamente 4.2 pL. Específicamente, cada décimo sitio de cada fila de la matriz se aplica con monocitos de un individuo, y la deposición de las células de ese individuo es escalonada en las filas posteriores para aumentar la separación entre las células de un individuo. La separación de las células de un individuo es preferible porque provee un control interno contra la variación en las condiciones entre las diferentes áreas de sustrato. Los monocitos de los individuos restantes son aplicados de manera similar sobre los sitios de la matriz en las gotas expulsadas acústicamente. Se hacen diez duplicados de matrices.

Debido a que los monocitos son atraídos por quimiotaxis en los tejidos inflamados (donde se transforman en macrófagos bajo la influencia de mediadores inmunes), las matrices son estudiados por medio de su inmersión en varias soluciones fisiológicas que contienen uno o más mediadores inflamatorios, como la histamina, las interleucinas (ILs), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), leucotrienos, y otros mediadores inflamatorios conocidos en la técnica. Las células también pueden estar expuestas a otras condiciones que puedan afectar a la inflamación, tales como el calor y agentes anti-inflamatorios conocidos, incluyendo los fármacos anti-inflamatorios esteroides, no esteroideos, y otras sustancias que se sospecha que afectan la activación de los macrófagos. Se apreciará fácilmente que ciertos mediadores y combinaciones de los mismos tendrán un efecto pro- o anti-inflamatorio, y que habrá diferencias entre los individuos y, en menor medida entre las células individuales. Debido a que los monocitos se unen mediante la unión específica mAb/MHC, la matriz no será interrumpido por inmersión.

La transformación de los monocitos en macrófagos y de los macrófagos de nuevo a los monocitos se puede observar por microscopía de luz sin afectar la viabilidad celular. Otros métodos conocidos de medición de las células individuales incluyen XPS (espectroscopia de fotoelectrones de rayos X) de las células individuales. Dado que las células inmunes, especialmente macrófagos activados, son capaces de activar otras células inmunes por la liberación de mediadores inmunes y agentes quimiotácticos, existe la posibilidad de que los monocitos de un individuo puedan no responder a un

mediador o condición inmune, pero ser sensibles a los mediadores inmunes liberados por otros macrófagos del individuo que fueran sensibles a las condiciones experimentales. Para el control de la precedente, placas de pozos estándar se emplean como controles utilizando el método idéntico, con múltiples monocitos del mismo individuo en cada pozo (para placas de 96 pozos, 9 pozos/individuo, 110 células cada uno). Un control final, usando placas de pozos sin el sistema de unión de mAb/MHC, también se crea mediante el método descrito, con suficiente a la tensión superficial para mantener las gotas que contienen células expulsadas en su lugar. Se aprecia fácilmente que las 110 gotas depositadas en cada pozo de la placa se depositan preferiblemente en diferentes lugares dentro del pozo para evitar la formación, por deposición múltiple, de gotas demasiado grandes para ser mantenidas en su lugar por la tensión superficial.

El diseño de alto rendimiento representado en las figuras. 7A y 7B, y descrito anteriormente, también se pueden emplear sustancialmente de la misma manera como se utiliza en este ejemplo con la configuración representada en la figura 6. Una ventaja de este diseño es que las células se recirculan inherentemente. En algunos casos un sitio de expulsión puede ser abrumado por el número de células que debe ser manipulado. En el caso de la sangre, esta situación es especialmente aplicable a los RBC, que son las células más numerosas. La capacidad para superar este problema mediante el uso de más de un eyector para la expulsión de los glóbulos rojos, o la adición de un tercio del eyector dedicado-RBC al sistema (como se realiza en los sistemas ilustrados en las figuras 6 y 7), será entendido fácilmente. La recirculación de los RBC que no se expulsan en un primer paso (con el fin de permitir la procesión ordenada de células sin interrupción del flujo) se puede expulsar más tarde por la recirculación del fluido portador después de que se han clasificado todos los menos numerosos tipos de células. La realización representada en las figuras. 7A y 7B es especialmente apropiada para dicha recirculación.

## Ejemplo 2

Matriz de células del epitelio de las vías respiratorias epitelio humanas (HAE) de lavado broncoalveolar para el estudio de la respuesta inflamatoria con recuento celular simultáneo

El método del ejemplo anterior está adaptado para hacer matrices de las células HAE obtenidas a partir de lavado broncoalveolar con dispositivo de selección simultánea y el recuento de células diferencial. Además de las células epiteliales, el fluido de lavado broncoalveolar contiene rutinariamente otras células. Las células que se encuentran en el fluido de lavado incluyen los leucocitos granulocitos, linfocitos, y monocitos, que normalmente se activan como macrófagos y leucocitos granulocitos, neutrófilos (PMN), eosinófilos y basófilos. A menudo presentes son patógenos como virus, incluyendo el virus de la gripe y los virus de ADN, incluyendo miembros de la familia del virus herpes, sobre todo por CMV (citomegalovirus) y KSV (sarcoma de Kaposi asociado al herpes virus); especies de hongos, incluyendo *Cryptococcus albidus*, *Coccidioides immitis*, y *Aspergillus flavus*; patógenos oportunistas eucariotas tales como *Pneumocystis carinii*, que se encuentra en pacientes sanos y causa neumonía en los severamente inmunocomprometidos; miembros de grupos de bacterias gram-positivas y negativas; especies de micobacterias; y obliga a los procariontes intracelulares, como la clamidia, micoplasma y rickettsia. Con la posible excepción de los procariontes intracelulares obligados, todos los agentes patógenos pueden cultivarse mediante métodos rutinarios microbiológicos y virológicos del fluido que queda después de que todas las células de mamíferos han sido expulsadas. Quistes de *Pneumocystis carinii* (Diámetro 5 - 7  $\mu$ m), trofozoítos y esporozoítos pueden ser expulsadas para la tinción, como puede bacterias extracelulares (diámetro típico 1  $\mu$ m). La tinción y examen se pueden hacer en vez de o además del cultivo, según sea necesario para la identificación. Por ejemplo, los quistes de *Pneumocystis carinii*, son identificables sin cultivo, mediante examen microscópico de muestras teñidas.

La clasificación, recuento y formación de matrices procede sustancialmente como se describe en el Ejemplo 1, con la grabación adicional de la identidad de cada célula expulsada para propósitos de recuento. Comúnmente, recuentos diferenciales solo proporcionarán información de diagnóstico y fisiopatológica útil. Por ejemplo, los eosinófilos y linfocitos elevados indicarán asma o procesos inflamatorios pulmonares eosinofílica relacionados. Los infocitos separados se pueden averiguar más al haber elevado los linfocitos T activados que expresan marcadores de activación de la superficie celular HLA-DR, IL-2R (receptor interleucina 2) y VLA-1. Alternativamente, se pueden hacer matrices de los linfocitos sobre un sustrato funcionalizado en diferentes sitios con anticuerpos que reconocen los marcadores que acabamos de mencionar. La enfermedad inflamatoria fibrótica de las vías respiratorias inferiores, generalmente denominado enfermedad pulmonar intersticial, producirá un predominio de PMN y macrófagos alveolares. La inmunocitoquímica de los macrófagos, y en menor medida los PMNs y las células epiteliales de las vías respiratorias, demuestra que estas células contienen citoquinas características, por ejemplo IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, en la enfermedad pulmonar crónica del prematuro (Kotecha et al. (1996) Pediatric Res. 40:250-56). Las neumonías bacterianas son distinguibles porque producen similares recuentos diferenciales de células, pero con más células inmunes y partículas bacterias en el fluido de lavado y, a veces dentro de los macrófagos.

Usando los recuentos diferenciales de células y cultivo de patógeno microbiológico/virológico y métodos de identificación, procesos inflamatorios primarios eosinofílica y neutrófilos se distinguen uno de otro y de inflamaciones secundarias a procesos infecciosos en los pacientes de los que se toman muestras de lavado pulmonar. También se estudian las células HAE de los pacientes en las matrices.

5 Como se apreciará fácilmente, un canal que tiene las dimensiones apropiadas se debe proporcionar (apenas más grandes que las células de HAE y posiblemente los monocitos grandes, por lo tanto, aproximadamente 25 - 30  $\mu\text{m}$ ). Alternativamente, la anchura del canal es sólo más ancha que las células; para permitir una carga más rápida, la profundidad es aproximadamente tres veces el diámetro de las células, y una rampa (tal como se representa en la Fig. 5D) se emplea en la trayectoria de flujo del canal justo antes de la región de canal, que está abierto. Como una opción adicional, un campo de fotones (como se puede proporcionar por un láser como se usan comúnmente en las pinzas ópticas) se puede emplear para obligar a las células cercanas a la superficie. Células de HAE en la matriz se obtienen mediante lavado broncoalveolar, y salen a la superficie del sustrato durante la clasificación y recuento tal como se describe en este documento y en los ejemplos precedentes. Antes de ser cargadas para la expulsión, los fluidos de lavado se tratan para suspender las células adheridas como células individuales mediante la desagregación de ellos utilizando métodos de cultivo de tejidos convencionales.

10 Los experimentos en células HAE se pueden llevar a cabo en condiciones que permiten la división celular. La necesidad de que el anterior, así como las condiciones necesarias para esto, será apreciada por un experto normal. Los controles con placas de pozos son útiles pero no tan críticos como con los monocitos.

15 **Ejemplo 3**

Matriz de las células HAE para el estudio de la susceptibilidad individual a Mutagénesis como un proxy para Carcinogénesis

20 El método del ejemplo anterior está adaptado para permitir la exposición de las células HAE en la matriz a mutágenos químicos y otros, como el calor y la radiación. El daño genético se mide en diferentes momentos después de la exposición es discontinuo por métodos de rutina, por ejemplo ensayos bioquímicos de enlaces cruzados rotos y otros daños en el ADN. Las diferencias en la genética de la enzima de reparación del ADN se pueden estudiar mediante la comparación de recuperación (grado de reducción de daño) en diversos momentos después de la exposición. Los matrices de la placa de pozos siguen siendo útiles como controles, y las células se pueden cultivar en placas de pozos, o células de matriz pueden ser retiradas y se cultivaron, para determinar la aparición de células displásicas o neoplásicas en generaciones de células posteriores después de la exposición, y la extensión de cualquier desdiferenciación en cualquiera de las células displásicas o neoplásicas detectadas.

25 **Ejemplo 4**

Modelado de la célula

30 El método de los Ejemplos 1 y 2 se adapta al modelo de células escamosas basales. Las células epiteliales escamosas basales queratinizadas y las células epiteliales no queratinizadas escamosas son modeladas sobre un sustrato de nitrocelulosa funcionalizado como en el Ejemplo 1. El modelo generado emula el borde bermellón del reborde. Las células modeladas sobre el sustrato se sumergieron entonces en un medio de cultivo apropiado, y se llevan a cabo estudios sobre la formación de una unión de la piel/no queratinizado.

35 **Ejemplo 5**

Expulsión acústica de los linfocitos de la sangre en una matriz de epítomos

40 Los linfocitos pequeños, medianos y grandes son expulsados por los métodos de los ejemplos anteriores para formar una matriz de epítomos clonales. Dos canales paralelos, adyacentes se construyen con diferentes anchos y están adecuadamente diseñados para obligar a las células cerca de la superficie. El canal más ancho es de unos 15  $\mu\text{m}$  de ancho para dar cabida a los linfocitos medianos y grandes; el canal más estrecho es de 10  $\mu\text{m}$  de ancho para acomodar linfocitos pequeños. Los linfocitos pequeños se pueden separar de linfocitos grandes y medianos mediante métodos rutinarios, o por expulsión acústica. Una cantidad de energía suficiente para expulsar apenas linfocitos pequeños se aplica como todos los linfocitos en la mezcla pasan a través de un canal común (15  $\mu\text{m}$  de ancho). La energía se aplica a cada linfocito que se detecta en la apertura o abertura del canal que forma la región de expulsión. Los linfocitos expulsados pueden ser expulsados sobre un sustrato y se lavan en una placa de Petri u otro recipiente. Alternativamente, la energía acústica se puede enviar para expulsar la gota en una trayectoria no vertical de manera que las gotas caen en un recipiente cercano, tal como un canal que está abierto en la parte superior y está suficientemente cerca del canal de expulsión.

50 La matriz de epítomos es una matriz tetrapéptido combinatoria formada a partir de aminoácidos de origen natural. Otros epítomos se apreciarán fácilmente a existir tanto en proteínas, como resultado de la estructura no primaria, en las moléculas peptídicas que llevan haptenos, y en otras biomoléculas tales como peptidoglicanos y polisacáridos. Sólo se forma una matriz con una pequeña fracción de los aproximadamente  $10^{12}$  epítomos. Tanto las células T como B unirán estos epítomos, por mecanismos ligeramente diferentes, como se apreciará fácilmente. Los matrices de tetrapéptidos se

pueden hacer por varios métodos, por ejemplo, mediante la adaptación de las técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida a los dispositivos que utilizan expulsión acústica focalizada de reactivos como se describe en la solicitud en tramitación en la química combinatoria descrita anteriormente. Como existen  $1.6 \times 10^4$  tetrapéptidos naturales diferentes, 16 áreas de síntesis de matriz, cada uno de  $1 \text{ cm}^2$  y cada uno contiene 1,000 sitios de matriz, deben estar disponibles para la síntesis de todos los tetrapéptidos y para mantener una densidad apropiada para permitir la separación de las células individuales.

Las células se detectaron en los sitios de la matriz lo más rápidamente posible (por lo tanto la necesidad de dos canales para mantener las líneas de una fila única de células en los canales a pesar de los diferentes tamaños). Cuando cada uno de los 16,000 sitios de la matriz ha tenido una gota expulsada en él, las matrices se lavan para eliminar las células que no se unen al epítipo en el sitio de deposición. Se hacen imágenes de las matrices para determinar qué sitios se han unido una célula, y el ciclo se repite para los sitios que no se han unido a una célula, que se vuelven a colocar. Inmediatamente se entiende que este proceso requiere de formación de imágenes de la matriz después del lavado, y debe ser automatizado. La automatización de un sistema de este tipo es fácilmente alcanzable, y se deriva una información muy valiosa sobre la separación clonal antes de la finalización del proyecto. El uso de diferentes tipos de epítipos se extendería aún más la catalogación.

### Ejemplo 6

Eyección de bacterias para seleccionar bacterias transformadas

*E. coli* son transformadas por métodos de rutina para expresar pancitoqueratina, una proteína eucariota, por un constructo que también causa la expresión y la visualización de estreptavidina en la superficie celular. Las células se expulsan acústicamente sobre un sustrato biotinilado por métodos de rutina, como se describe en los anteriores Ejemplos 1 - 5. El tamaño del canal de expulsión puede ser adaptado a las dimensiones bacterianas ( $1 \mu\text{m}$ ), pero esto es posible mediante métodos de microfabricación conocidos. Las células transformadas se unirán específicamente a la unidad estructural cognada, biotina por la unidad estructural marcador, estreptavidina. El lavado del sustrato eliminará las células que no han sido transformadas, dejando sólo las células transformadas unidas al sustrato.

La capacidad de separar las bacterias transformadas a partir de bacterias no transformadas se combina con la capacidad de eliminar todas las células sanguíneas de la sangre periférica (Ejemplo 1) para evaluar la capacidad de *E. coli* transformada y sin transformar para causar bacteremia en ratones, y comparar la respuesta inmune montada contra las bacterias transformadas y no transformadas. La sangre de los ratones inoculados se dibuja y se clasifican como en el Ejemplo 1, excepto que, además de clasificar todas las diferentes células sanguíneas, el número de células de cada tipo se recuenta para proporcionar información en cuanto a la respuesta inmune. Los recuentos basales son hechos por métodos de rutina antes de la inoculación. Después de la clasificación y el recuento de células de la sangre de acuerdo con el Ejemplo 1, sólo las bacterias, plaquetas y plasma permanecen en el canal de expulsión central. Aunque aproximadamente el mismo tamaño y la geometría como de plaquetas, una bacteria se pueden distinguir de una plaqueta por la presencia de un nucleoide, donde se localiza el cromosoma bacteriano (que se puede detectar mediante dispersión de luz u otros medios), o por fluorescencia intrínseca Trp, que diferirán entre una plaqueta y una bacteria. Todas las bacterias se cuentan y se expulsan, y el número y la fracción de bacterias expulsadas que se transforman se determina contando las bacterias que permanecen adheridas a la superficie del sustrato biotinilado después de que se lava.

Se evalúan cuatro grupos de ratones. El primer grupo se inocula por vía intravenosa con un placebo de un portador apropiado, tal como solución salina estandarizada, al no tener bacterias e igual en volumen a los volúmenes de inoculación para los otros grupos. El segundo grupo se inocula con portador que contiene un número conocido *E. coli* vivo, transformada. El tercer grupo se inocula con portador que contiene un número conocido de *E. coli* vivo no transformadas, de la misma cepa como las bacterias transformadas. El cuarto grupo se inocula con portador que contiene un número conocido de *E. coli* vivo de la misma cepa, siendo la población una mezcla igual de bacterias transformadas y no transformadas. Se extrae sangre de los ratones a intervalos regulares después de la inoculación durante una semana, o hasta la muerte de los ratones de bacteremia. Los datos estadísticos sobre los tipos de células y los recuentos diferenciales de todos los grupos proporcionarán datos sobre las variaciones individuales de respuesta inmune dentro de los grupos.

Los datos del primer grupo principalmente se utilizan como control para determinar la entrada espontánea de bacterias (si se presentan estreptavidina o no) en la sangre de los ratones no inoculados; todas las bacterias detectadas en la sangre de los ratones de este grupo se cultivaron y se caracterizaron para fines de control. Los datos del segundo grupo, además de ser un control para el cuarto grupo, se pueden comparar con los datos del tercer grupo para estudiar la patogenicidad relativa sin la competencia de las bacterias no transformadas. Además, los datos del segundo grupo se pueden utilizar para estudiar la pérdida de la totalidad o parte del constructo, por ejemplo, las bacterias obtenidas de ratones del Grupo Dos, después de la inoculación que no muestra estreptavidina y se unen la superficie biotinilada pueden ser cultivadas e inmunoteñidas para determinar si están expresando pancitoqueratina, para cuantificar la

reversión para fines de control. Los datos del tercer grupo también se pueden obtener para determinar si se ha producido la transformación espontánea, y para explorar la posibilidad remota de que el constructo estreptavidina/pancitoqueratina tiene (de alguna manera) entraron en esa población. El cuarto grupo provee datos sobre la capacidad de las cepas transformadas y no transformadas para causar bacteremia en condiciones competitivas. Los datos del cuarto grupo de bacterias totales por volumen se comparan con los otros grupos. Además, las proporciones relativas de bacterias transformadas y no transformadas pueden ser analizadas, después de la consideración apropiada de la infección espontánea, de la pérdida o ganancia de transformación. A estos efectos, la transferencia del constructo de transformación por conjugación no se considera espontánea. También puede ser deseable, la posible adición de otros grupos con diferentes proporciones de inoculación de bacterias transformadas y no transformadas.

## 10 Ejemplo 7

Expulsión de células directamente de colonias que crecen en Medio agar

Un modo de selección de células precisa, sin contacto a partir de colonias que crecen en agar es proporcionado por energía acústica focalizada para efectuar la expulsión de las gotas. Las gotas expulsadas pueden contener una o más células, y pueden ser ajustadas en el volumen para depositar las células más o menos por la expulsión. Una colonia de células se muestrea desde el centro, en el plano paralelo a la superficie del medio o sustrato, para evitar la contaminación de la muestra por los organismos de las colonias vecinas. El número de muestras separadas a partir de una colonia individual que puede ser depositado de este modo depende del tamaño de la colonia y tamaño de la muestra; como mínimo, varias muestras de incluso las colonias más pequeñas se pueden expulsar

Un frotis de garganta de rutina se cultiva en un medio de agar de sangre estándar en una placa de Petri de plástico convencional, y el cultivo se incubó a aproximadamente 38 °C, durante 72 horas. Después de la incubación, un transductor acústico se sitúa debajo de la placa de Petri de plástico que contiene el agar y las colonias bacterianas, y la presencia o ausencia de colonias se detecta a través de microscopía acústica.

El mismo transductor acústico utilizado para localizar las células se utiliza para propulsar la célula a partir de la superficie del agar, siempre que la superficie tenga la viscosidad correcta. Energía acústica focalizada se entrega inmediatamente por debajo del centro de la colonia en un punto focal aproximadamente 75 µm por debajo de la superficie del medio de agar (el "pulso acústico de entrega térmica"). Este pulso de la energía acústica tiene potencia suficiente y una duración suficiente para licuar un cilindro de agar que tiene dimensiones en el plano paralelo a la superficie del medio que están dentro de las dimensiones de la colonia en este plano y se extienden en la dirección perpendicular a la superficie a la superficie del sustrato, que se licua a temperaturas próximas a 45 °C (Gibco, Inc., now Life Technologies, Rockville Md., a division of Invitrogen). La necesidad de calibrar el pulso acústico de entrega térmica a la composición y la profundidad del agar específico y a la placa de Petri, para fundir los volúmenes cilíndricos de diferentes diámetros, será inmediatamente apreciado. Alternativamente, un láser de barrido se puede usar para calentar el agar de bajo punto de fusión. Utilizando un agar bajo punto de fusión permite la licuefacción de la superficie sin reducción significativa en la viabilidad de los microorganismos seleccionados sobre la superficie del agar. Si se emplea un láser, la colocación de láser se puede acoplar a la ubicación colonia determinada por microscopía acústica. El punto focal de la energía acústica para la expulsión está en la superficie del medio. Por localmente calentar el agar, la viscosidad a la superficie del medio se reduce para permitir la expulsión de las células de interés directamente en una placa u otro recipiente.

La entrega acústica de la energía térmica se utiliza para llevar a cabo la fusión local por debajo de las colonias antes de expulsión acústica. De esta manera, cada colonia Dos matrices duplicadas de células expulsadas de las colonias bacterianas se realizan con placas de pozos estándar que contenían medio de agar nutritivo, teniendo cada gota un volumen de aproximadamente 0.1 a 1.0 pL. se muestrea cuatro veces. Que los diferentes pozos pueden contener diferentes medios y los nutrientes serán detenidos inmediatamente. Dos muestras adicionales que tienen cada uno un volumen de aproximadamente 1.0 a 100 pL (en múltiples gotas según se requiera) de cada colonia se depositan sobre una superficie limpia y se lavaron usando solución salina en un matraz que contiene el fluido nutritivo (o alternativamente en los canales que contienen fluido que fluye que desembocan en recipientes de fluido nutritivo).

Las células muestreadas se cultivaron inmediatamente en placas de Petri de los matraces, por métodos convencionales de cultivo celular. Las placas de matriz y matraces se almacenan refrigeradas para ralentizar la reproducción bacteriana, permitiendo cultivo y ensayo futuro. La placa de cultivo de Petri original también se almacena refrigerada pendiente de los resultados del cultivo. Los resultados del cultivo del cultivo de garganta se examinan mediante microscopía convencional y otros medios. Numerosas especies bacterianas gram positivas y gram negativas están inicialmente identificadas, así como varias especies de levaduras, todas no-patógenas para los seres humanos adultos inmunocompetentes. Además el cultivo de los matraces usando medios de agar nutritivo que contiene antibióticos, usando métodos de rutina para la determinación de resistencia a los antibióticos, revela que las diferentes colonias de la misma especie de bacterias tienen diferentes niveles de resistencia a los antibióticos, lo que demuestra que las diferentes colonias son diferentes cepas o subcepas.

5 El método de la expulsión de las células de las colonias que crecen en medio de agar se puede usar para expulsar selectivamente las células transformadas. Un indicador se utiliza en el constructo de transformación junto con la transformación genética deseada, en este documento la expresión de pancitoqueratina. Por ejemplo, el constructo puede transformar adicionalmente las células para secretar agarasa, y las colonias transformadas pueden ser seleccionadas mediante la detección de una impedancia acústica alterada. Alternativamente, las colonias transformadas se pueden seleccionar ópticamente si el constructo está diseñado para hacer que las células transformadas para coexpresar un marcador tal como una proteína fluorescente verde. Sólo las colonias fluorescentes verdes, detectadas ópticamente se expulsan.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de separación que comprende las etapas de:
  - (a) detectar en un fluido que tiene una superficie, y que contiene una pluralidad de volúmenes localizados que tienen una impedancia acústica diferente que el fluido, un único volumen localizado situado suficientemente cerca de la superficie para la expulsión, en virtud de la reflexión de la energía acústica dirigida a un punto focal dentro del fluido, siendo la cantidad de energía insuficiente para expulsar el fluido;
  - (b) determinar si el volumen único localizado cumple con uno o más criterios de expulsión;
  - (c) seleccionar el volumen único localizado para la expulsión del fluido basado en la determinación en la etapa (b); y
  - (d) expulsar el volumen único localizado del fluido mediante el uso de energía acústica focalizada, siendo la cantidad de energía suficiente para expulsar un volumen de fluido que corresponde sustancialmente al volumen único localizado seleccionado.
2. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen localizado comprende una partícula sólida o gel.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen localizado comprende una célula.
4. El método de la reivindicación 3, en donde el volumen localizado comprende una célula viva.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen localizado se expulsa en una trayectoria sustancialmente perpendicular a la superficie del fluido.
6. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen localizado se expulsa con un componente de velocidad distinto de cero perpendicular a la superficie de fluido y un componente de velocidad distinto de cero paralelo a la superficie del fluido para efectuar una trayectoria, por lo que el volumen localizado experimenta un desplazamiento neto en una dirección paralela a la superficie del fluido.
7. El método de la reivindicación 6, en donde la trayectoria es direccionalmente controlable, de modo que la dirección de desplazamiento neta paralela a la superficie de fluido también es direccionalmente controlable.
8. El método de la reivindicación 6, en donde la distancia no vertical de viaje paralela a la superficie del fluido es controlable mediante la variación de la energía focalizada.
9. El método de la reivindicación 6, en donde la distancia vertical de viaje paralela a la superficie del fluido es controlable mediante la variación de la energía focalizada.
10. El método de la reivindicación 9, en donde la determinación en la etapa (b) de los uno o más criterios para la expulsión es una determinación cuantitativa o semicuantitativa y la selección de la etapa (c) es entre trayectorias sin expulsión y múltiples eyecciones y depende la determinación cuantitativa o semicuantitativa.
11. El método de la reivindicación 10, en donde el fluido está contenido en un canal de fluidos.
12. El método de la reivindicación 11, en donde los datos de dicha detección de (a) y dicha determinación de (b) se introduce en un procesador, por lo que el procesador dirige dicha selección de (c) y dicha expulsión de (d) con referencia a los datos medidos, criterios de selección programados, y parámetros del sistema.
13. El método de la reivindicación 1, en donde los volúmenes localizados son volúmenes circunscritos que comprenden células vivas.
14. El método de la reivindicación 3, en donde el volumen localizado comprende una parte que forma la célula de una colonia de células dispuestas en una superficie de un medio.
15. El método de la reivindicación 14, en donde la detección se efectúa mediante la medición de la impedancia acústica en la superficie del medio.
16. El método de la reivindicación 14 o 15, en donde el medio es un gel o semisólido, que comprende además la causa del medio para licuar en un volumen seccionado por un plano paralelo a la superficie del medio y totalmente subyacente de los límites de la colonia de células.

17. Un sistema para la separación, a partir de un fluido (14, 16; 60) portador que tiene una superficie (17, 19; 61) de fluido y que contiene una pluralidad de volúmenes circunscritos que tienen una impedancia acústica diferente que el fluido portador, de uno o más de los volúmenes circunscritos, comprendiendo el sistema:
- un recipiente (13, 15; 79; 89) de fluido;
- 5 un detector (87, 88) para detectar el volumen circunscrito y la determinación de una propiedad del volumen circunscrito; y
- un eyector (33; 93, 94) acústico de gotas de fluido desde el fluido portador, que comprende un generador (35) de radiación acústica para generar la radiación acústica y un medio (37) de enfoque para enfocar la radiación acústica en un punto (47) focal cerca la superficie del fluido;
- 10 en donde los volúmenes circunscritos presentes en el fluido portador que se detectan para estar lo suficientemente cerca de la superficie del fluido para la expulsión se pueden eyectar acústicamente a un objetivo (45) desde el fluido portador en una gota (49, 53; 63; 84, 85, 86) de fluido dependiendo de si el volumen circunscrito posee una o más propiedades.
- 15 18. El sistema de la reivindicación 17, que comprende además un medio (43) para posicionar el eyector en relación de acoplamiento acústico con el recipiente en una posición apropiada para permitir que el medio de enfoque enfoquen la radiación acústica en el punto (47) focal, en un punto deseado del fluido portador.
19. El sistema de la reivindicación 18, que comprende además un procesador para la integración de dicho detector, dicho eyector acústico, y dicho medio para posicionar dicho eyector acústico con respecto a dicho recipiente para expulsar los volúmenes circunscritos a objetivos seleccionados sobre la base de la propiedad detectada.
- 20 20. El sistema de la reivindicación 19, en donde dicho recipiente de fluido comprende un canal (79) de fluidos que tiene una superficie, el canal de fluidos que tiene dimensiones que permiten que el fluido portador que contiene la pluralidad de volúmenes circunscritos fluya libremente a través del canal.
- 25 21. El sistema de la reivindicación 20, en donde dicho canal de fluidos tiene dimensiones que permiten que la pluralidad de volúmenes circunscritos, o un subconjunto de la pluralidad de volúmenes circunscritos, fluyan libremente a través del canal sólo en sustancialmente fila singular.
- 30 22. El sistema de la reivindicación 17, 18, 19 o 20, que comprende además medios para posicionar el punto focal en cualquier punto de una colonia de células o un medio que tiene una superficie sobre la que se dispone la colonia de células, en donde el detector puede detectar un volumen circunscrito que es una parte que forma la célula de la colonia de células dispuestas en la superficie del medio, y en donde la célula se eyecta mediante la entrega de la energía acústica al punto focal con una potencia apropiada y durante un tiempo suficiente para expulsar la célula.
23. El sistema de la reivindicación 22 que comprende además un procesador para la integración de dicha fuente de energía acústica, dicho medio para enfocar la energía acústica, y dicho medio para el posicionamiento del punto focal en cualquier punto en el medio para expulsar las células a objetivos seleccionados de las colonias de células .
- 35 24. El sistema de la reivindicación 22, en donde la colonia de células se encuentra mediante el escaneo del punto focal a través de la superficie del medio para detectar un área de la superficie del medio que tiene una impedancia acústica diferente de un área de la superficie del medio sin cualquier colonia de células.
25. El sistema de la reivindicación 22 o 23, en donde el medio comprende un gel y la energía acústica se suministra adicionalmente a la masa del medio antes de la expulsión de células en un volumen seccionado por un plano paralelo a la superficie del medio y totalmente subyacente de los límites de la colonia de células.
- 40 26. El sistema de la reivindicación 25, en donde la energía acústica se entrega al volumen en el centro geométrico del volumen, el centro geométrico situado a una distancia debajo de la superficie del medio en la masa.
27. El sistema de la reivindicación 25, en donde el centro geométrico del volumen se encuentra a aproximadamente 50 a 150  $\mu\text{m}$  por debajo de la superficie del medio en la masa.
- 45 28. El sistema de la reivindicación 22, en donde el medio en el volumen sufre un cambio antes de la expulsión desde el centro geométrico del volumen a la superficie del medio, por lo que el cambio reduce la cantidad de energía acústica para expulsar las células.

29. El sistema de la reivindicación 28, en donde el cambio es una licuefacción y la licuefacción se detecta midiendo un cambio en la impedancia acústica o atenuación acústica del volumen.
30. El sistema de la reivindicación 29, en donde la licuefacción es causada por la deposición de un reactivo, una característica de las células en la colonia, o el suministro de energía al medio.
- 5 31. El sistema de la reivindicación 23 que comprende además un detector que mide una propiedad de la colonia de células.
32. El sistema de la reivindicación 31, en donde basándose en una medición cuantitativa o semicuantitativa de la propiedad por dicho detector de las células de la colonia se seleccionan para no ser expulsada, a ser expulsada en un recipiente objetivo, o para ser expulsado en un sitio de la matriz.
- 10 33. El sistema de las reivindicaciones 22, 23, o 32, en donde las células son células vivas.
34. El sistema de la reivindicación 20 o 23, en donde el objetivo es un sitio de matriz o un canal de fluidos (81, 82).
35. El sistema de la reivindicación 34, cuando depende de la reivindicación 20, donde se basa en una medición cuantitativa o semicuantitativa de la propiedad por dicho detector (87, 88) no se selecciona el volumen circunscrito a ser expulsado, para ser expulsado en un canal objetivo (81, 82) o para ser expulsado en un sitio de matriz.
- 15 36. El sistema de la reivindicación 35, en donde el volumen circunscrito expulsado en el canal objetivo se puede expulsar del canal objetivo en un canal objetivo posterior o un sitio de matriz posterior.
37. El sistema de la reivindicación 32 en donde el recipiente objetivo es un canal de fluidos.
38. El sistema de la reivindicación 32 o 37, en donde las células expulsadas en el recipiente objetivo se pueden expulsar del recipiente objetivo en un recipiente objetivo posterior o un sitio de matriz posterior.
- 20 39. El sistema de la reivindicación 17, 18, 19, 20, 21, 34, cuando depende de la reivindicación 20, 35, o 36, en donde el objetivo forma parte de un sustrato que tiene una superficie (51) de sustrato orientada sustancialmente paralela a la superficie del fluido.
40. El sistema de la reivindicación 39, en donde el objetivo es un sitio de matriz sobre dicha superficie del sustrato o un canal de fluidos objetivo.
- 25 41. El sistema de la reivindicación 35, 32 o 40, en donde el sitio de matriz es un pozo (45) de la placa de pozos.
42. El sistema de la reivindicación 17, 35 o 39, en donde dicho volumen circunscrito es una célula.
43. El sistema de la reivindicación 42, en donde la célula es una célula viva.

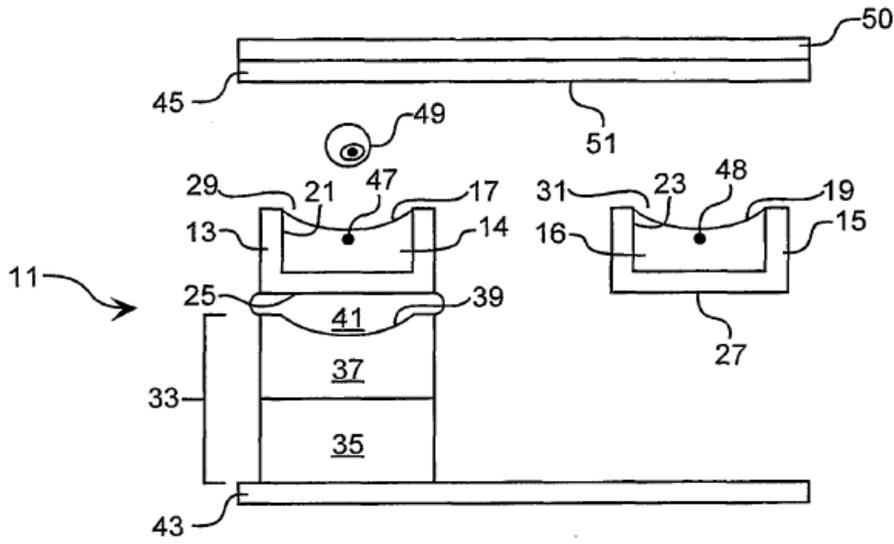


FIG. 1A

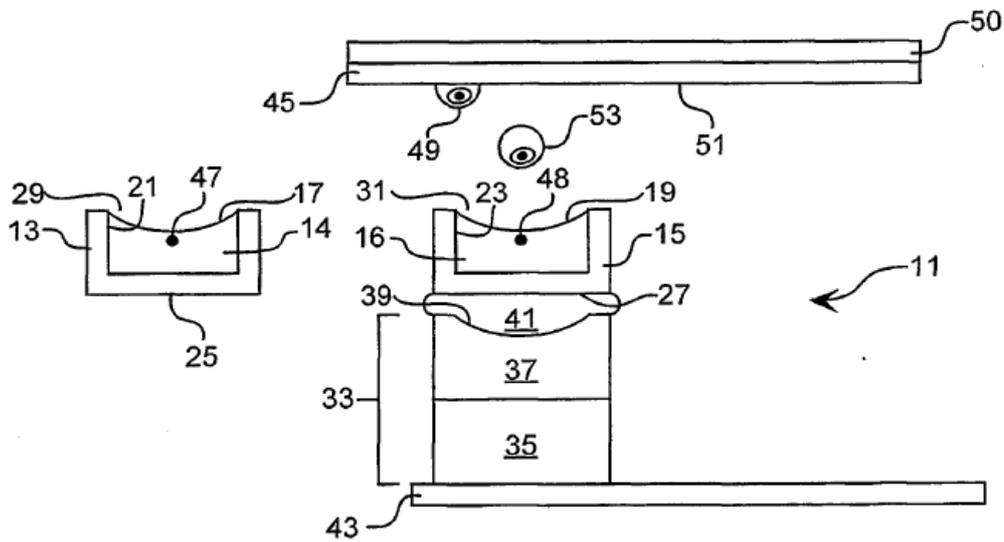
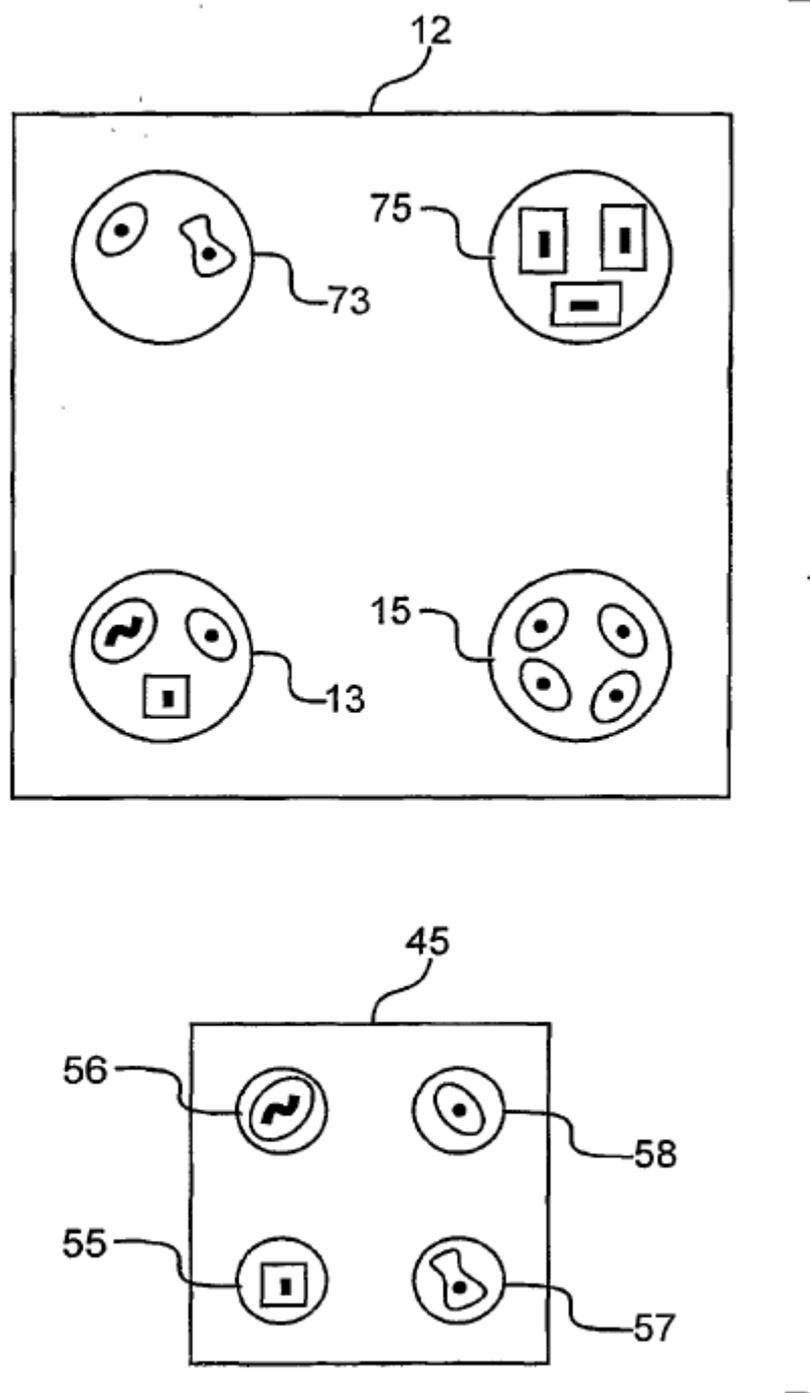


FIG. 1B



**FIG. 2A**



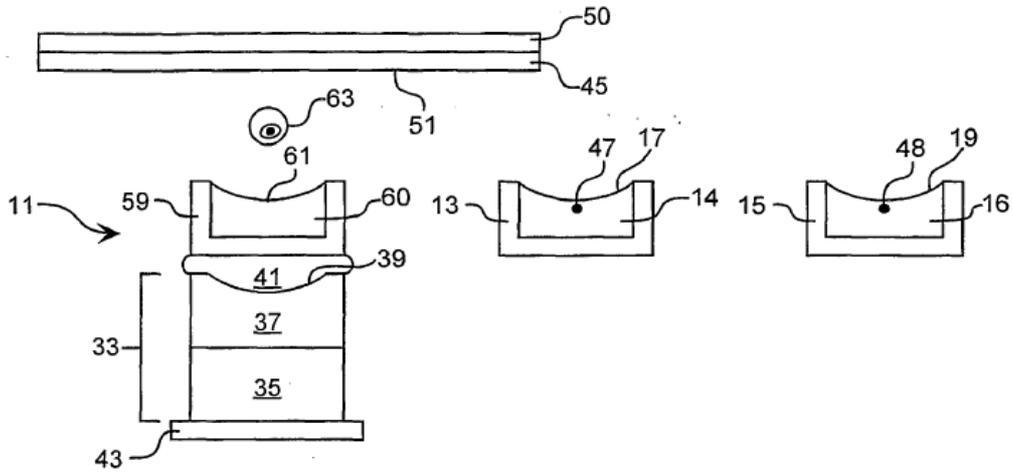


FIG. 3A

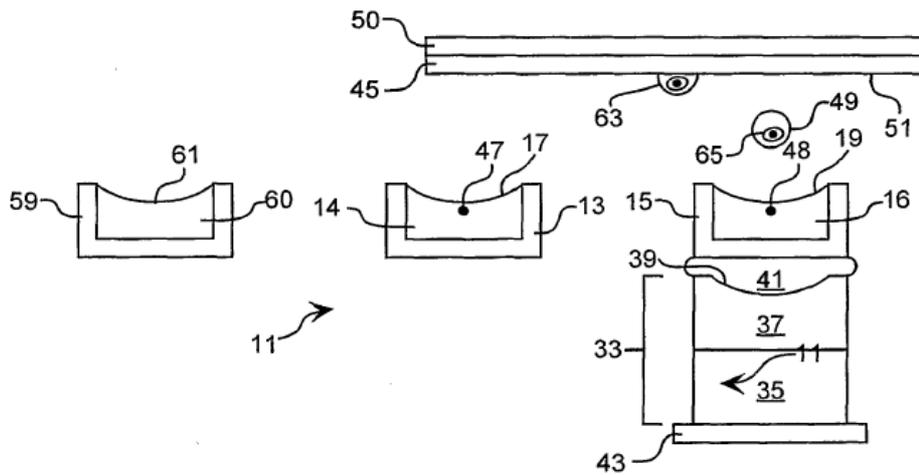


FIG. 3B

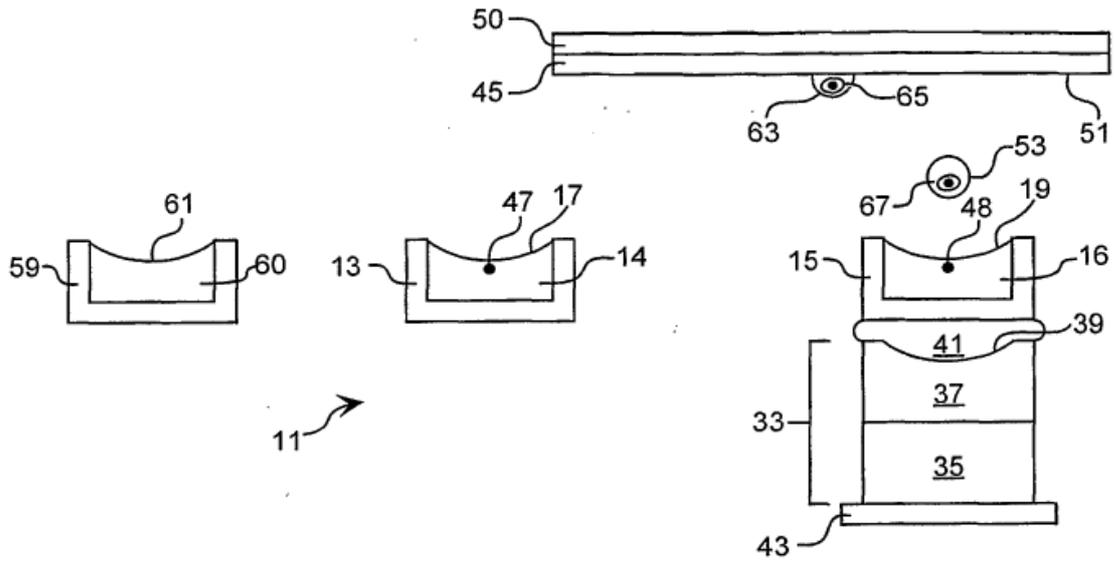


FIG. 3C

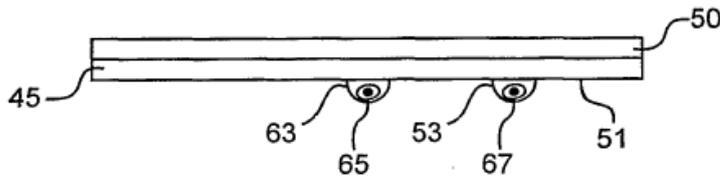
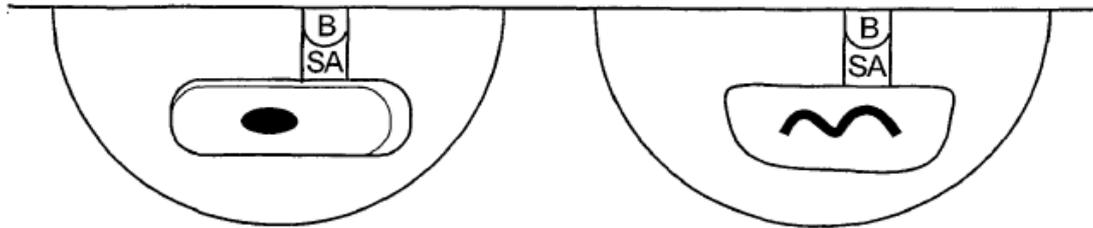
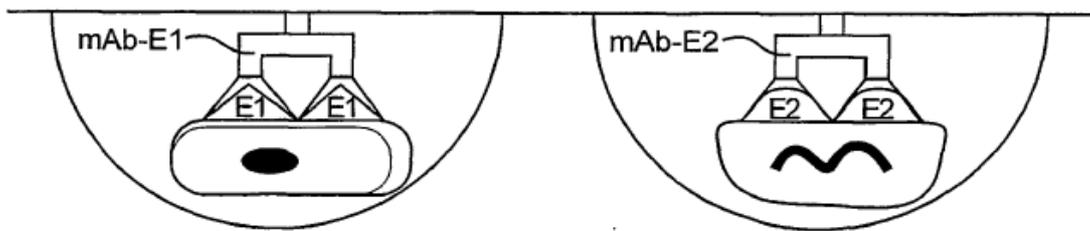


FIG. 3D



**FIG. 4A**



**FIG. 4B**

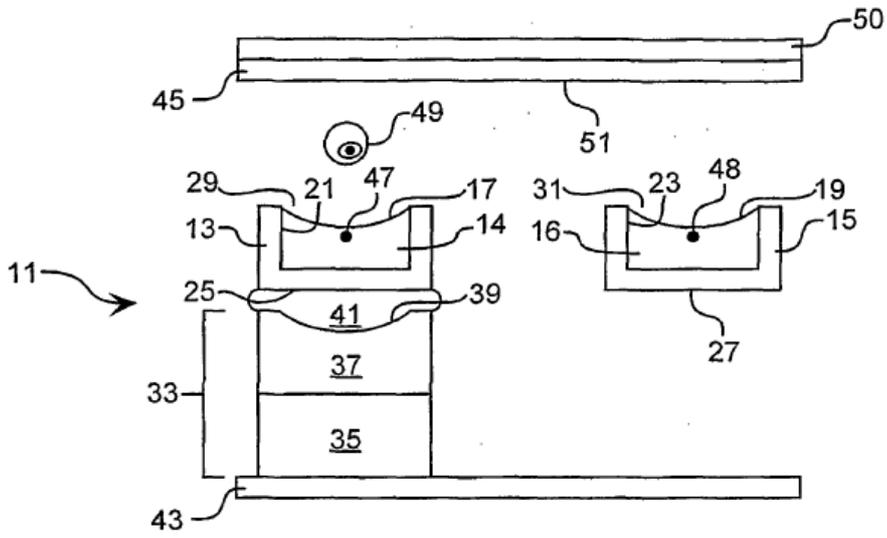


FIG. 5A

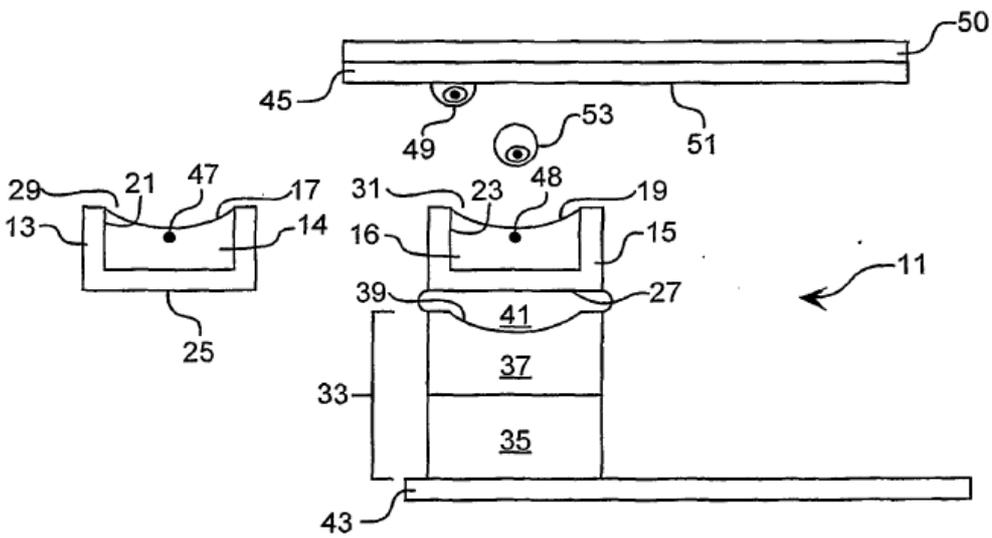


FIG. 5B

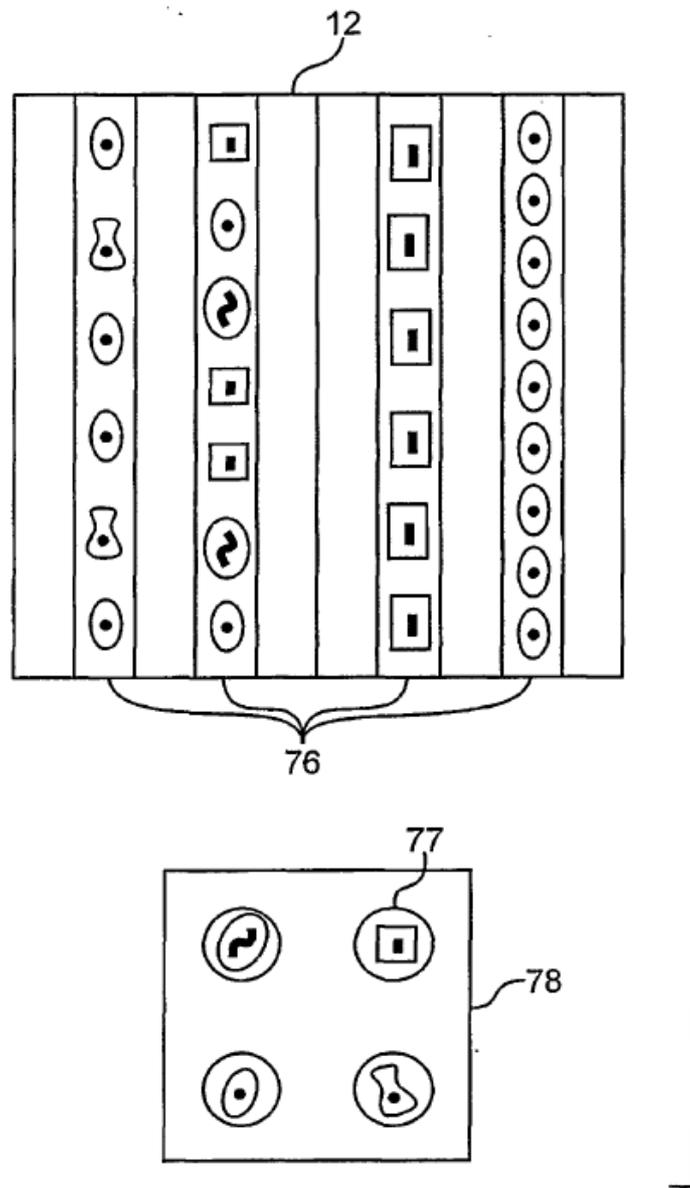
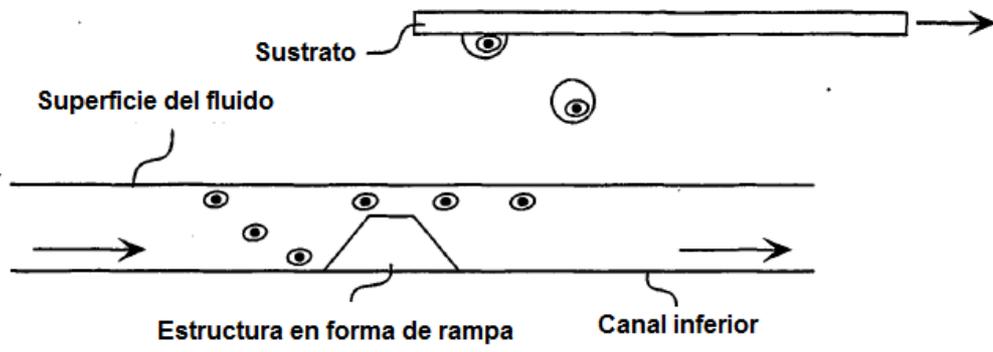
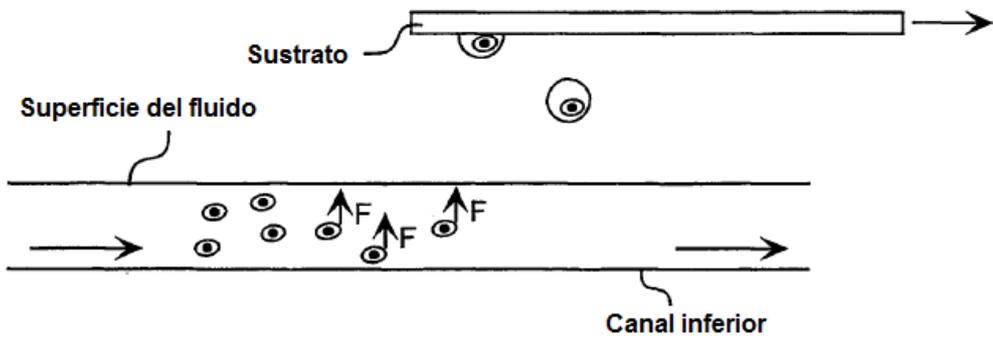


FIG. 5C



**FIG. 5D**



**FIG. 5E**

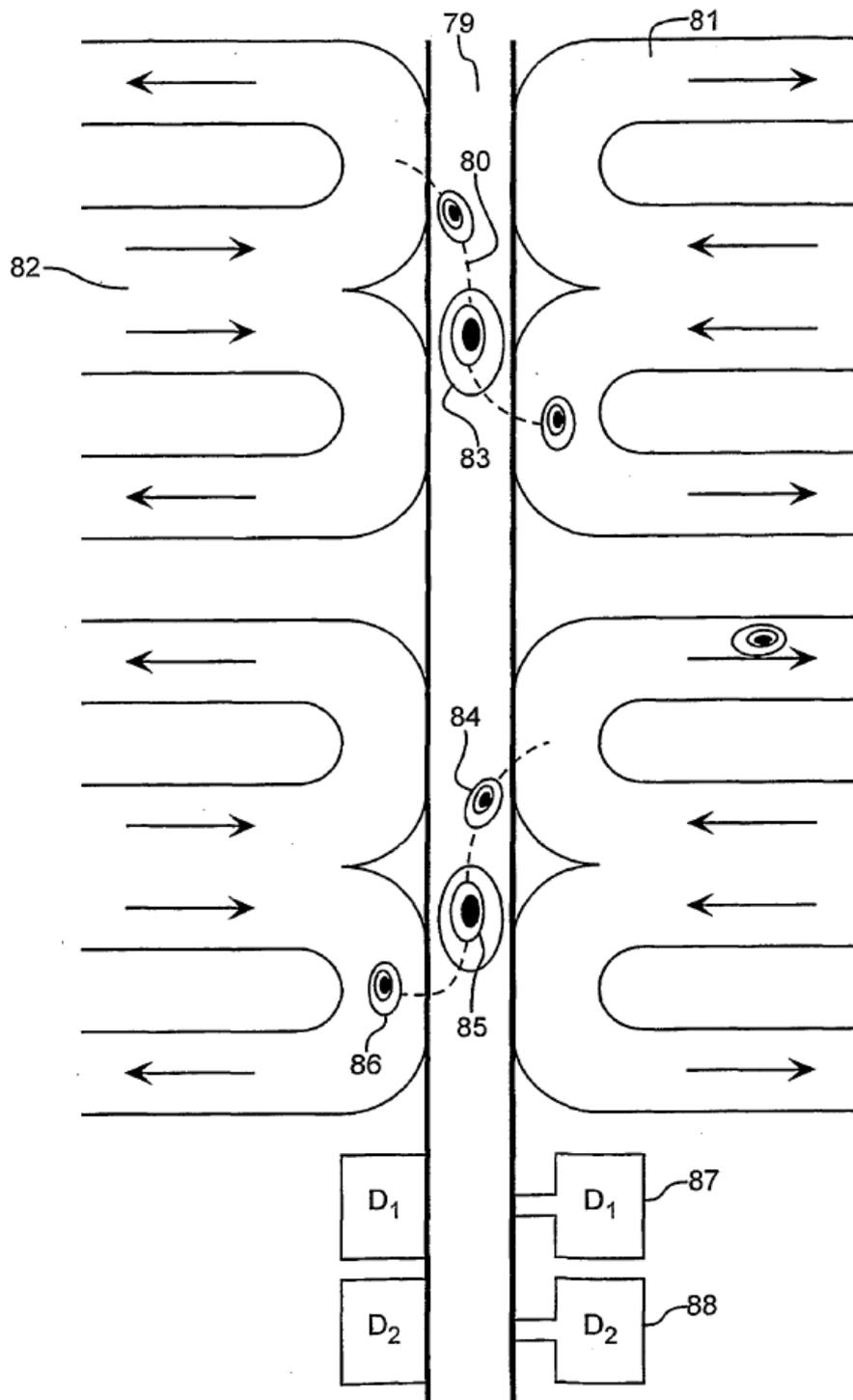
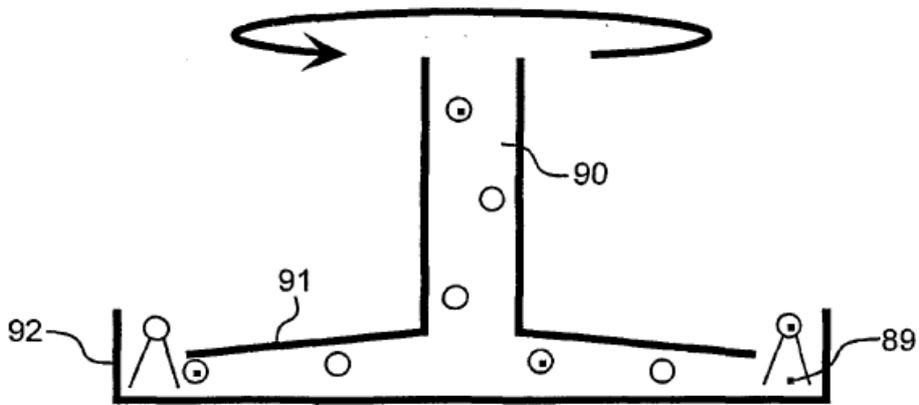


FIG. 6



**FIG. 7A**

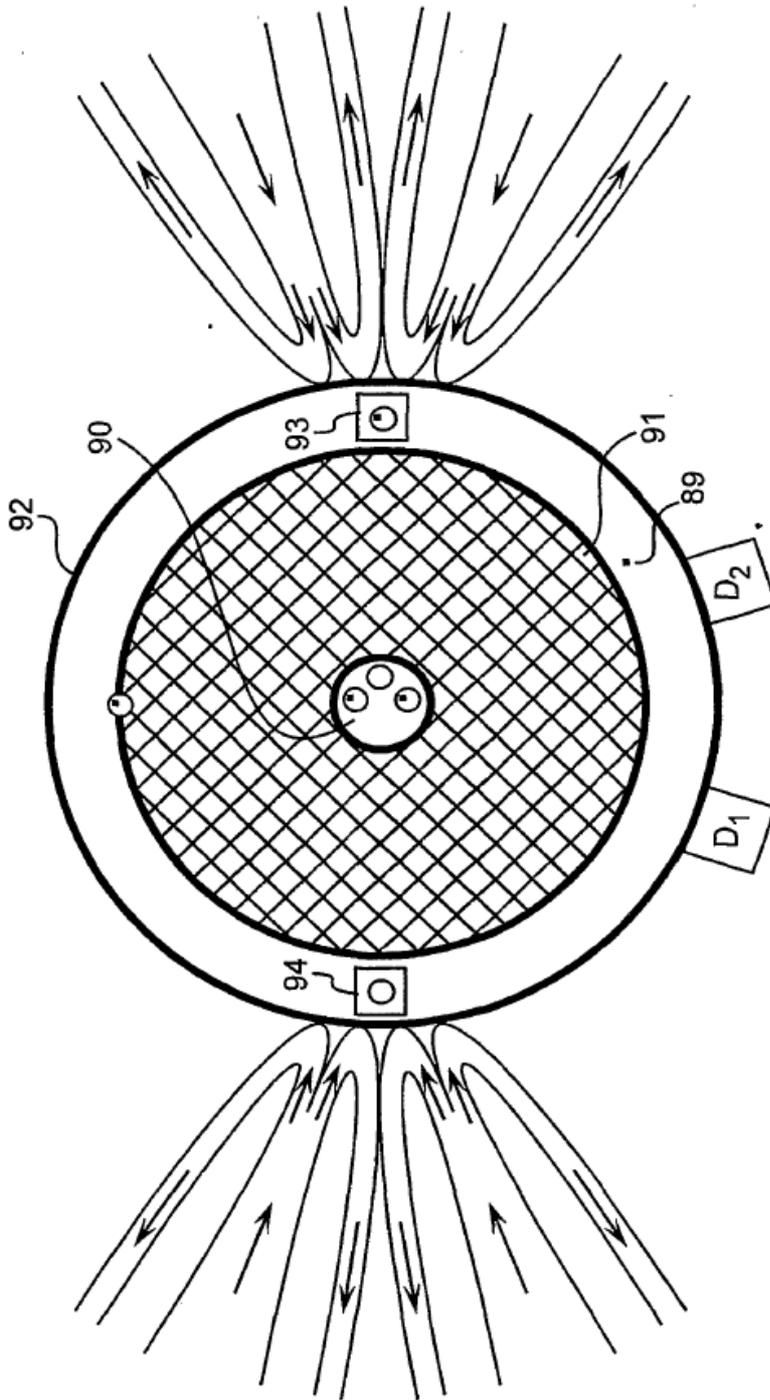


FIG. 7B