

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 279**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)
C12Q 3/00 (2006.01)
G01N 15/00 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 15/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2012** **PCT/US2012/028951**
87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2012** **WO12148584**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2012** **E 12777632 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017** **EP 2702133**

54 Título: **Método y sistema clasificador de células**

30 Prioridad:

29.04.2011 US 201161480872 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
28.11.2017

73 Titular/es:

BECTON DICKINSON AND COMPANY (100.0%)
One Becton Drive
Franklin Lakes, NJ 07417-1880, US

72 Inventor/es:

VAN DEN ENGH, GER

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 644 279 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 clasificador de células

Referencia a las solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica prioridad a la fecha de presentación de la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/480.872, presentada el 29 de abril de 2011.

Introducción

- 5 La presente invención se refiere a citómetros de flujo e instrumentos para la identificación a alta velocidad y la clasificación de partículas, tales como células.

La citometría de flujo es un método valioso para el análisis y aislamiento de partículas biológicas tales como células y moléculas constituyentes. Como tal, tiene un amplio rango de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas. El método utiliza una corriente de fluido para separar linealmente las partículas de manera que puedan pasar, una detrás de otra, a través de un aparato de detección. Las células individuales se pueden distinguir de acuerdo con su ubicación en la corriente de fluido y la presencia de marcadores detectables. Por lo tanto, se puede utilizar un citómetro de flujo para dar un perfil de diagnóstico de una población de partículas biológicas.

El aislamiento de partículas biológicas se ha logrado añadiendo una capacidad de agrupación o clasificación a los citómetros de flujo. Las partículas en una corriente separada, detectadas como que tienen una o más características deseadas, se aíslan individualmente de la corriente de muestra por extracción mecánica o eléctrica. Este método de clasificación de flujo se ha utilizado para clasificar células de diferentes tipos, separar los cromosomas X e Y de esperma para la cría de animales, clasificar los cromosomas para análisis genético y aislar organismos particulares de poblaciones biológicas complejas.

Una técnica de clasificación de flujo común utiliza la clasificación por gotas en la que una corriente de fluido que contiene partículas separadas linealmente se rompe en gotas y las gotas que contienen las partículas de interés se cargan eléctricamente y se desvían en un tubo de recogida mediante el paso a través de un campo eléctrico. Los sistemas de clasificación por gotas actuales son capaces de formar gotas a una velocidad de 100.000 gotas/segundo en una corriente de fluido que pasa a través de una boquilla que tiene un diámetro inferior a 100 micrómetros. La clasificación por gotas requiere que las gotas se separen de la corriente a una distancia fija de la punta de la boquilla. La distancia es normalmente del orden de unos pocos milímetros desde la punta de la boquilla y se puede mantener en una corriente de fluido no perturbada haciendo oscilar la punta de la boquilla a una frecuencia predefinida.

Normalmente, las partículas separadas linealmente en la corriente se caracterizan a medida que pasan a través de un punto de observación situado justo debajo de la punta de la boquilla. Una vez que se identifica una partícula como que cumple uno o más criterios deseados, se puede predecir el momento en el que se alcanzará el punto de desprendimiento de la gota y la escisión de la corriente en una gota. Idealmente, se aplica una ligera carga a la corriente de fluido justo antes de que la gota que contiene la partícula seleccionada se escinda de la corriente y a continuación se pone a masa inmediatamente después de que la gota se desprenda. La gota que se va a clasificar mantiene una carga eléctrica, cuando se desprende de la corriente de fluido, y todas las otras gotas se dejan sin carga. La gota cargada es desviada lateralmente de la trayectoria descendente de las otras gotas mediante un campo eléctrico y recogida en un tubo de muestra. Las gotas no cargadas caen directamente en un drenaje.

Las perturbaciones en una corriente de fluido, que incluyen la turbulencia causada por la variabilidad en el tamaño de las partículas presentes en las muestras biológicas típicas o la deriva en los componentes del citómetro pueden afectar significativamente la capacidad de predecir que gota contendrá una partícula de interés. La predicción incorrecta de qué gota contiene una partícula puede conducir a la pérdida de partículas valiosas que a menudo están presentes en pequeñas cantidades en las muestras biológicas. Incluso un breve lapso en la capacidad para predecir con precisión el contenido de una gota puede contaminar una fracción de partículas deseadas con partículas no deseadas, comprometiendo de este modo la calidad de la fracción o volviéndola no apta para la administración terapéutica.

Aunque los citómetros de flujo para diagnóstico se han hecho disponibles para la utilización común en una variedad de configuraciones, la clasificación por flujo es más complicada y se ha limitado principalmente a instalaciones principales que tienen operadores dedicados. Actualmente, los clasificadores de flujo requieren procedimientos de configuración y alineación relativamente complicados que a menudo requieren operadores altamente cualificados. Mientras que los analizadores de flujo han visto muchas mejoras hacia la facilidad de utilización debido a la automatización y simplificación, la mayor parte de las mejoras en los clasificadores de flujo se han dirigido a aumentar la velocidad de clasificación y el número de parámetros utilizados. Los aumentos en velocidad y número de parámetros han tenido el efecto de aumentar la complejidad y precisión requerida en los clasificadores de flujo.

Por ejemplo, en un sistema clasificador de células típico, un operador tiene que establecer con precisión el tiempo de retardo entre un evento (por ejemplo, la detección de una célula) en la intersección de un láser y una corriente de

chorro (es decir, intersección-láser-chorro (LJI)) y la aplicación de un impulso de carga al chorro. El impulso de carga debe superponerse al punto en el momento cuando la gota que contiene la célula medida se separa del chorro principal en el punto de desprendimiento (BOP). Actualmente este ajuste del retardo de tiempo se realiza manualmente antes de la clasificación, haciendo que la precisión y pureza de la clasificación dependan de criterios subjetivos. Además, debido a que el retardo de tiempo se ajusta antes, la clasificación es propensa a la deriva debido a los cambios de presión y temperatura que se producen durante la duración de la clasificación.

GEOFFREY W. OSBORNE: "Un método de cuantificación del rendimiento de clasificación de células en "tiempo real"", CITOMETRÍA PARTE A, vol. 77A, n.º 10, 26 de julio de 2010 (2010-07-26), páginas 983-989 describe métodos y medios para optimizar los tiempos de retardo de carga (el período de tiempo entre la interrogación de la muestra y la posterior carga en el punto de desprendimiento de gota que se conoce como el retardo de gota) en dispositivos de citometría de flujo y el ajuste automático basado en circuitos de retroalimentación.

El documento WO 92/17288 A1 presenta métodos y medios para controlar el retardo de carga en las gotitas en base al sistema de clasificación para células en base a unos circuitos de retroalimentación que comprenden la detección de eventos de gotitas.

El documento US 4 487 320 A describe un sistema de retroalimentación en un dispositivo de clasificación de células para controlar el punto de desprendimiento en la generación de gotitas estabilizando de este modo el (la deriva del) chorro de clasificación de gotitas.

Resumen

En la presente memoria se proporciona una mejora de un sistema clasificador de células de acuerdo con la reivindicación 1, un sistema de control del retardo de carga de acuerdo con la reivindicación 11 y los métodos asociados. Dichos sistemas y métodos proporcionan un chorro clasificador autoestabilizable para automatizar la calibración y abordar el problema de la deriva en los sistemas de clasificación de células. Los sistemas y métodos presentados hacen posible determinar y ajustar automáticamente el intervalo de retardo de carga (CDI) con los circuitos del clasificador de células. Estos circuitos pueden configurar, supervisar y ajustar el retardo de tiempo de forma continua, posibilitando un chorro de clasificación autónomo completamente automático, operativo y autoestabilizable.

En la presente memoria se presentan también sistemas y métodos para determinar automáticamente la fase del punto de desprendimiento del chorro (PBP), lo que hace posible conocer cuando la gota con la célula se separa del chorro. Mediante la combinación de los sistemas y métodos presentados con los métodos para determinar automáticamente la fase de la señal de accionamiento de gotas cuando un evento (por ejemplo, célula) pasa el punto de intersección del láser y el chorro de un clasificador de células (según se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.679.039), la distancia entre el punto de medición (por ejemplo, en la LJI) y el punto de desprendimiento del chorro (BOP) se puede configurar y mantener a un número entero (n) de gotas.

Por ejemplo, se presentan los métodos para determinar n una vez que LJI y BOP se han fijado. Todos los cálculos se pueden hacer con circuitos que realizan la detección de fase y distancia dentro de un lazo de retroalimentación cerrado. La combinación de las invenciones descritas en la presente memoria permite, por primera vez, la construcción de un aparato que puede establecer automáticamente y de forma autónoma su punto de desprendimiento, retardo de gota y la señal de carga de impulsos de temporización. Debido a que los cálculos se realizan dentro de un lazo de retroalimentación, un sistema de este tipo es estable y corrige de forma autónoma los cambios de temperatura y presión.

En una forma de realización de ejemplo, para medir el tiempo del BOP, en primer lugar, se aísla el drenaje que recoge la corriente de gotitas. A continuación, el drenaje se conecta con un convertidor de corriente a voltaje (CVC) a masa. Con las placas deflectoras apagadas, se coloca una carga sobre la corriente de gotitas. La carga será portada por las gotas al drenaje. La carga fluirá a masa a través del circuito CVC, generando una lectura de tensión fuera en el circuito. Las gotas sólo portarán carga si había un voltaje aplicado al chorro en el momento en que la gota se separa del chorro. Si se coloca una carga en la corriente como un impulso muy corto, cuya duración sólo ocupe una fracción del período del ciclo de gotas, la corriente de gotas sólo portará una carga si los impulsos de carga coinciden con el momento de desprendimiento de las gotas. La amplitud de la señal de accionamiento de gotas se puede ahora ajustar de tal manera que el punto de desprendimiento de gota y el punto de intersección láser chorro se separen por un número entero de ciclos de gotas (la señal LJI y el impulso de carga están sincronizados con la diferencia de fase cero) realizando periódicamente este procedimiento: (1) desacoplar las placas deflectoras; (2) aplicar carga instantánea sincronizada con la señal en el punto de intersección láser chorro; y (3) ajustar la amplitud de accionamiento para la corriente de drenaje máxima.

El instrumento puede ajustar automática y rápidamente su amplitud de accionamiento de gotas de tal manera que el tiempo entre la medición de un evento y la formación de gota permanezca constante. Una vez que el desprendimiento de gotas está sincronizado con la frecuencia de accionamiento de gotas en el punto LJI, debe determinarse la longitud del intervalo de tiempo entre una medición de un evento y el punto de desprendimiento. En una forma de realización, el accionamiento de gotas se configura a una frecuencia preferida f_1 . El retardo de tiempo

entre la medición de un evento y la carga instantánea se mantiene constante (δt). La frecuencia de accionamiento de gotas se aumenta manteniendo constante la amplitud de gotas hasta que el impulso de carga coincida de nuevo con el BOP (se puede detectar observando la corriente de drenaje). La frecuencia a la que esto ocurre, f_2 fue anotada. Las relaciones siguientes deben contener:

$$\delta t = n / f_1$$

$$\delta t = (n+1) / f_2$$

5

El número de ciclos de gotas, n , entre LJI y BOP por tanto debe ser:

$$n = f_1 / (f_2 - f_1)$$

10

Todas las señales relevantes se pueden ajustar por ordenador o se pueden mantener constantes en los lazos de retroalimentación cerrados. Por lo tanto, todas las propiedades del chorro se pueden mantener constantes mediante los circuitos en el instrumento. Para hacer el método más preciso el cálculo del retardo automático se puede realizar a múltiples frecuencias, por ejemplo, las de $n-2$, $n-1$, $n+1$ y $n+2$. Un valor exacto de n se puede determinar mediante un análisis de regresión.

Breve descripción de las figuras

15

Los dibujos adjuntos, que se incorporan en la presente memoria, forman parte de la memoria. Junto con esta descripción escrita, los dibujos sirven además para explicar los principios de, y para permitir a un experto en la(s) técnica(s) relevante(s), realizar y utilizar los sistemas y métodos de acuerdo con la presente invención.

La FIG. 1 es un dibujo esquemático de un sistema clasificador de células.

La FIG. 2 es un diagrama de flujo que describe un método, de acuerdo con una forma de realización presentada en la presente memoria.

20

La FIG. 3 es un diagrama de flujo que describe un método, de acuerdo con una forma de realización presentada en la presente memoria.

Descripción detallada

La siguiente descripción detallada de las figuras se refiere a los dibujos adjuntos que ilustran una forma de realización de ejemplo de un sistema clasificador de células. Son posibles otras formas de realización. Se pueden hacer modificaciones a la forma de realización descrita en la presente memoria sin apartarse del espíritu y alcance de la presente invención. Por lo tanto, la siguiente descripción detallada no tiene la intención de ser limitante.

25

La FIG. 1 es un dibujo esquemático de un sistema clasificador de células 100, de acuerdo con una forma de realización presentada en la presente memoria. Según se muestra en la FIG. 1, un transductor de formación de gotas (por ejemplo, oscilador piezoeléctrico) 102 se acopla a un conducto de fluido, tal como la boquilla 101. Dentro de la boquilla 101, el fluido vaina 104 enfoca hidrodinámicamente un fluido de muestra 106 en una corriente 108. Dentro de la corriente 108, las partículas (por ejemplo, células) se alinean una detrás de otra para cruzar una intersección corriente láser 110 (por ejemplo, la LJI), irradiada por una fuente de irradiación (por ejemplo, el láser) 112. La vibración del oscilador piezoeléctrico 102 provoca que la corriente 108 se rompa en varias gotas 109.

30

35

En funcionamiento, un detector de eventos 114 identifica cuando una partícula de interés (o célula de interés) cruza la intersección láser-corriente 110. El detector de eventos 114 alimenta el circuito de temporización 128, que a su vez alimenta el circuito de carga instantánea 130. En el punto de desprendimiento de gota, comunicado por un retardo de gota temporizado (Δt), se aplica una carga instantánea a la corriente de tal manera que la gota de interés porte una carga. La gota cargada puede entonces ser clasificada activando las placas deflectoras (no mostradas) para desviar la gota en un tubo de recogida. Según se muestra en la FIG. 1, sin embargo, las gotas se recogen en un receptáculo de drenaje 138.

40

El detector de contorno de gota 116 sirve para determinar automáticamente la fase de la señal de accionamiento de gotas cuando una partícula de interés pasa la intersección láser-corriente 110. Un detector de contorno de gota de ejemplo se describe en la patente de Estados Unidos n.º 7.679.039. El detector de contorno de gota 116 permite al instrumento calcular con precisión el lugar de cada partícula detectada en una gota. El detector de contorno de gota 116 alimenta una señal de amplitud 120 y una señal de fase 118, que a su vez alimenta (a través del amplificador 122) a un circuito de control de amplitud 126 y/o circuito de control de frecuencia 124. El circuito de control de amplitud 126 y/o circuito de control de frecuencia 124, a su vez, controla el oscilador piezoeléctrico 102.

45

El sistema clasificador de células 100 incluye además un convertidor de corriente-a voltaje (CVC) 134 acoplado al receptáculo 138. El CVC 134 se configura para detectar la presencia de una partícula cargada que entra al

receptáculo 138. La resistencia 136 configura la amplificación por voltio del CVC 134 y proporciona un voltaje que es proporcional a la corriente observada en el receptáculo (por ejemplo, el drenaje) 138. La corriente de drenaje se mide en la unidad de circuito 132 y se proporciona a un procesador 140. El procesador 140 alimenta a continuación al circuito de control de frecuencia 124.

- 5 El sistema clasificador de células 100 se puede emplear para proporcionar un chorro clasificador autoestabilizable para automatizar la calibración, y abordar el problema de la deriva en los sistemas de clasificación de células. El sistema hace posible determinar y configurar automáticamente el intervalo de retardo de carga con los circuitos presentados. Estos circuitos pueden configurar, supervisar y ajustar el retardo de tiempo de forma continua, posibilitando un chorro de clasificación autónomo completamente automático, operativo y autoestabilizable. El sistema clasificador de células 100 se puede utilizar de diversas maneras, tal como en la práctica de los métodos descritos adicionalmente más adelante.

15 En otra forma de realización, se proporciona un sistema de clasificación de células, comprendiendo el sistema: un conducto de fluido; una fuente de irradiación dispuesta para irradiar una corriente de fluido presente en el conducto de fluido; un circuito de carga que proporciona una carga eléctrica a la corriente de fluido; un receptáculo dispuesto para recibir una o más gotas formadas a partir de la corriente de fluido; y un circuito de detección de corriente acoplado al receptáculo. El sistema puede incluir además una unidad de control del retardo de carga que controle el circuito de carga, en donde la unidad de control del retardo de carga recibe una señal del circuito de detección de corriente y determina un retardo de carga en base a la señal recibida del circuito de detección de corriente. El sistema puede comprender además un convertidor de corriente a voltaje para detectar la presencia de una gota cargada que entra en el receptáculo. El sistema puede comprender además un integrador para detectar un número de gotas por unidad de tiempo que entran en el receptáculo. En una forma de realización, el receptáculo es un drenaje. El drenaje puede estar aislado eléctricamente. En otra forma de realización, el receptáculo es un tubo de recogida de gotas. El tubo de recogida de gotas puede estar aislado eléctricamente.

25 En todavía otra forma de realización, se proporciona un sistema de control del retardo de carga para un citómetro de flujo, comprendiendo el sistema: un circuito de carga que proporciona una carga eléctrica a una corriente de fluido en el citómetro de flujo; un circuito de detección de corriente acoplado a un receptáculo, en donde el receptáculo se coloca para recibir una o más gotas formadas a partir de la corriente de fluido; y una unidad de control del retardo de carga acoplada operativamente al circuito de detección de corriente, en donde la unidad de control del retardo de carga se configura para determinar un retardo de carga en base a una corriente medida por el circuito de detección de corriente. El sistema puede incluir, además: un convertidor de corriente a voltaje para detectar la presencia de una gota cargada que entra en el receptáculo; y/o un integrador para detectar un número de gotas por unidad de tiempo que entran en el receptáculo. La unidad de control del retardo de carga puede configurarse además para: (a) aplicar una carga instantánea a la corriente de fluido a una primera frecuencia de accionamiento de un transductor de formación de gotas del citómetro de flujo; (b) identificar una amplitud de accionamiento óptima variando la amplitud de accionamiento del transductor de formación de gotas hasta que se detecte una corriente máxima en el receptáculo; (c) identificar una segunda frecuencia de accionamiento aumentando la frecuencia de accionamiento del transductor de formación de gotas, mientras se continúa aplicando la carga instantánea a la primera frecuencia de accionamiento hasta que la corriente medida en el receptáculo regrese a la corriente máxima; y/o (d) calcular un retardo de gota en base a las frecuencias de accionamiento primera y segunda.

40 La FIG. 2 es un diagrama de flujo que describe un método 200 de ejemplo para calibrar un clasificador de células y más específicamente para determinar una amplitud de accionamiento óptima para un oscilador acoplado a una boquilla de fluido. En la etapa 202, se desactiva cualquier placa deflectora. La etapa 202 es una etapa opcional para simplificar el método presentado. Se pueden emplear métodos alternativos con placas deflectoras activadas. En la etapa 204, la frecuencia de accionamiento de la unidad de oscilador se configura a una frecuencia constante (f_1). Se aplica una carga instantánea a la corriente a la frecuencia (f_1), en la etapa 206. A continuación, se mide la corriente en un receptáculo, en la etapa 208. Si la corriente medida a lo largo del tiempo es una corriente máxima (o de pico), se identifica la amplitud como una amplitud de accionamiento óptima, como en la etapa 214. Sin embargo, si la corriente medida en el receptáculo no es una corriente máxima (o de pico), se ajusta la amplitud de accionamiento, en la etapa 212, y la etapa 208 se repite hasta que se identifique una amplitud de accionamiento óptima.

50 La FIG. 3 es un diagrama de flujo que describe un método 300 de ejemplo para calibrar un clasificador de células y, más específicamente, para determinar los ciclos de gotas y/o la frecuencia de accionamiento óptima para una unidad de oscilador. En la etapa 302, la amplitud de accionamiento óptima (tal como la identificada en la etapa 214) se mantiene constante. En la etapa 304, se aplica una carga instantánea a la frecuencia (f_1). La frecuencia de accionamiento se incrementa a continuación a la frecuencia (f_2), en la etapa 306. La corriente se mide de nuevo en el receptáculo, en la etapa 308. En la etapa 310, se hace una determinación en cuanto a si la corriente medida en el receptáculo ha regresado a la "corriente máxima", es decir, regresó a la corriente vista cuando la frecuencia de accionamiento era f_1 . Hasta que la corriente regresa a un máximo, la frecuencia de accionamiento se ajusta de forma continua a una frecuencia superior, f_2 . Cuando una corriente máxima se detecta de nuevo en el receptáculo, los ciclos de gotas se calculan como una función de $(f_1)/(f_2 - f_1)$.

60 En otra forma de realización, se proporciona un método para calibrar un sistema clasificador de células, comprendiendo el método: (a) configurar una frecuencia de accionamiento de un transductor de formación de gotas;

(b) aplicar una carga instantánea a la corriente de fluido a la frecuencia de accionamiento; (c) medir una corriente en un receptáculo que recibe las gotitas formadas a partir de la corriente de fluido; y (d) identificar una amplitud de accionamiento óptima variando la amplitud de accionamiento del transductor de formación de gotas hasta que se detecte una corriente máxima en el receptáculo. El método puede incluir además (e) identificar una segunda frecuencia de accionamiento aumentando la frecuencia de accionamiento del transductor de formación de gotas, mientras se continúa aplicando la carga instantánea a la frecuencia de accionamiento de la etapa (a), hasta que la corriente medida en el receptáculo regrese a la corriente máxima. El método puede incluir, además: (1) calcular un retardo de gota en base a la frecuencia de accionamiento identificada en la etapa (e) y la frecuencia de accionamiento de la etapa (a); (2) mantener constante la amplitud de accionamiento del transductor de formación de gotas en la amplitud de accionamiento óptima; (3) desactivar una placa deflectora antes de la etapa (a); y/o (4) aislar eléctricamente el receptáculo.

En una forma de realización, se proporciona un método de sincronización de la frecuencia de accionamiento de un clasificador de células con la frecuencia de formación de gotas (o desprendimiento). La "frecuencia de accionamiento" es la frecuencia a la que se acciona el transductor (por ejemplo, elemento piezoeléctrico). La "frecuencia de formación de gotas" o "frecuencia de desprendimiento" es la frecuencia a la que las gotas se desprenden en realidad de la corriente. La frecuencia de accionamiento y la frecuencia de formación de gotas pueden quedar fuera de sincronización debido a factores externos (por ejemplo, cambios de temperatura, presión, etc.). Sin embargo, cuando la frecuencia de accionamiento y la frecuencia de formación de gotas están sincronizadas, hay un número entero de gotas entre la intersección chorro láser (LJI) y el punto de desprendimiento (BOP). La frecuencia de accionamiento del sistema es una variable "conocida" (es decir, configurada), pero la frecuencia de formación de gotas es una variable "desconocida" (es decir, sujeta a fluctuaciones externas).

Un método de ejemplo para sincronizar la frecuencia de accionamiento con la frecuencia de formación de gotas comprende: (a) (si es necesario) las placas deflectoras se apagan; (b) se aplica una carga instantánea a la corriente a la frecuencia de accionamiento (f_1); (c) con la frecuencia de accionamiento y la frecuencia de carga mantenidas constantes a f_1 , se varía la amplitud de accionamiento. Al cambiar la amplitud de accionamiento al tiempo que se mantiene constante la frecuencia de accionamiento, se varía la frecuencia de formación de gotas. Cuando se mide una corriente de drenaje máxima con el drenaje (o tubo de recogida) modificado, entonces se sabe que se ha alcanzado una amplitud de accionamiento óptima.

A continuación, se determina el retardo de gota. Para determinar el retardo de gota: (1) la amplitud de accionamiento se mantiene constante a la amplitud de accionamiento óptima determinada en la etapa (c) anterior; (2) con la frecuencia de carga mantenida constante a f_1 , la frecuencia de accionamiento del sistema se aumenta hasta que reaparece una corriente máxima en el drenaje, que es a una frecuencia de accionamiento f_2 ; (3) el número de gotas entre la LJI y el BOP es $n = f_1/(f_2 - f_1)$; (4) entonces el retardo de gota se calcula en base al número de gotas entre la LJI y el BOP.

Conclusión

La descripción anterior de la invención se ha presentado con fines de ilustración y descripción. No pretende ser exhaustiva ni limitar la invención a la forma precisa descrita. Otras modificaciones y variaciones pueden ser posibles a la luz de las enseñanzas anteriores. Las formas de realización se eligieron y describieron con el fin de explicar mejor los principios de la invención y su aplicación práctica y para permitir de este modo a otros expertos en la técnica utilizar mejor la invención en diversas formas de realización y diversas modificaciones que son adecuadas para el uso particular contemplado. Se pretende que las reivindicaciones adjuntas se interpreten para incluir otras formas de realización alternativas de la invención; que incluyen estructuras, componentes, métodos y medios equivalentes.

Se debe apreciar que la sección Descripción detallada, y no las secciones Resumen y Extracto, está destinada a ser utilizada para interpretar las reivindicaciones. Las secciones Resumen y Extracto pueden describir una o más, pero no todas las formas de realización de ejemplo de la presente invención, tal como se contempla por el inventor o inventores y, por lo tanto, no pretenden limitar la presente invención y las reivindicaciones adjuntas de ninguna manera.

Se debe entender que esta invención no se limita a las formas de realización particulares descritas, como tal pueden, por supuesto, variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria es con el propósito de describir únicamente formas de realización particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto dicte claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro indicado o valor intermedio en ese intervalo indicado, está comprendido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden incluirse independientemente en los intervalos más pequeños y también están comprendidos dentro de la invención, sujeta a cualquier límite excluido de forma específica en el intervalo indicado. Cuando el intervalo indicado incluye uno o ambos de los límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen uno o ambos de esos límites incluidos.

Determinados intervalos se presentan en la presente memoria con valores numéricos que están precedidos por el término "aproximadamente". El término "aproximadamente" se utiliza en la presente memoria para proporcionar soporte literal para el número exacto que precede, así como un número que está cerca de o aproximadamente el número que el término precede. Para determinar si un número está cerca de o aproximadamente un número enumerado de forma específica, el número no enumerado cerca o aproximadamente puede ser un número que, en el contexto en el que se presenta, proporciona el equivalente principal del número enumerado de forma específica.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar también cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales ilustrativos representativos.

La citación de cualquier publicación es para su descripción antes de la fecha de presentación y no debe interpretarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a anteceder a dicha publicación en virtud de invención anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas reales de publicación que pueden necesitar ser confirmadas independientemente.

Se observa que, según se utilizan en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Se observa además que las reivindicaciones pueden redactarse para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración está destinada a servir como base previa para la utilización de la terminología exclusiva como "únicamente", "sólo" y similares en relación con la lectura de los elementos reivindicados o la utilización de una limitación "negativa".

Se aprecia que determinadas características de la invención, que son, para mayor claridad, descritas en el contexto de formas de realización diferentes, también pueden proporcionarse en combinación en una única forma de realización. Por el contrario, varias características de la invención, que son, para mayor brevedad, descritas en el contexto de una única forma de realización, pueden proporcionarse también por separado o en cualquier subcombinación adecuada. Todas las combinaciones de las formas de realización están específicamente incluidas por la presente invención y se describen en la presente memoria como si todas y cada combinación se describiera individual y explícitamente, en la medida en que dichas combinaciones incluyen procesos y/o dispositivos/sistemas/kits operables. Además, todas las subcombinaciones enumeradas en las formas de realización que describen dichas variables también se incluyen específicamente en la presente invención y se describen en la presente memoria como si todas y cada una de dichas subcombinaciones de grupos químicos estuvieran individual y explícitamente descritas en la presente memoria.

Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las formas de realización individuales descritas e ilustradas en la presente memoria tiene componentes y características distintos que pueden separarse fácilmente a partir de o combinadas con las características de cualesquiera de las otras varias formas de realización. Cualquier método enumerado se puede llevar a cabo en el orden de los eventos enumerados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema clasificador de células (100), comprendiendo el sistema:
un conducto de fluido (101);
una fuente de irradiación (112) dispuesta para irradiar una corriente de fluido (108) presente en el conducto de fluido (101);
un circuito de carga (130) que proporciona una carga eléctrica a la corriente de fluido (108);
un receptáculo (138) dispuesto para recibir una o más gotas (109) formadas a partir de la corriente de fluido (108); y
caracterizado por
un circuito de detección de corriente (134) acoplado al receptáculo (138);
- 10 una unidad de control del retardo de carga (128) que controla el circuito de carga (130), en donde la unidad de control del retardo de carga (128) recibe una señal del circuito de detección de corriente (134) y determina un retardo de carga en base a la señal recibida del circuito de detección de corriente (134).
2. El sistema clasificador de células (100) de la reivindicación 1, en donde el circuito de detección de corriente (134) comprende, además:
- 15 un convertidor de corriente a voltaje para detectar la presencia de una gota cargada (109) que entra en el receptáculo (138).
3. El sistema clasificador de células (100) de la reivindicación 1, en donde el circuito de detección de corriente (134) comprende, además:
un integrador para detectar un número de gotas (109) por unidad de tiempo que entran en el receptáculo (138).
- 20 4. El sistema clasificador de células (100) de la reivindicación 1, en donde el receptáculo (138) es un drenaje o tubo de recogida de gotas.
5. El sistema clasificador de células (100) de la reivindicación 4, en donde el drenaje o tubo de recogida de gotas está aislado eléctricamente.
6. Un método para calibrar un sistema clasificador de células (100), comprendiendo el método:
- 25 (a) configurar una frecuencia de accionamiento de un transductor de formación de gotas (102);
(b) aplicar una carga instantánea a la corriente de fluido (108) a la frecuencia de accionamiento;
(c) medir una corriente en un receptáculo (138) que recibe gotitas (109) formadas a partir de la corriente de fluido (108); y
(d) identificar una amplitud de accionamiento óptima variando la amplitud de accionamiento del transductor de formación de gotas (101) hasta que se detecte una corriente máxima en el receptáculo (138).
- 30 7. El método de la reivindicación 6 que comprende, además:
(e) identificar una segunda frecuencia de accionamiento aumentando la frecuencia de accionamiento del transductor de formación de gotas (102), mientras se continúa aplicando la carga instantánea a la frecuencia de accionamiento de la etapa (a), hasta que la corriente medida en el receptáculo (138) regresa a la corriente máxima.
- 35 8. El método de la reivindicación 7 que comprende, además:
calcular un retardo de gota en base a la frecuencia de accionamiento identificada en la etapa (e) y la frecuencia de accionamiento de la etapa (a).
9. El método de la reivindicación 7 que comprende, además:
mantener la amplitud de accionamiento del transductor de formación de gotas (102) constante a la amplitud de accionamiento óptima.
- 40 10. Un sistema de control del retardo de carga para un citómetro de flujo (100), comprendiendo el sistema:
un circuito de carga (130) que proporciona una carga eléctrica a una corriente de fluido (108) en el citómetro de flujo; caracterizado por

un circuito de detección de corriente (134) acoplado a un receptáculo (138), en donde el receptáculo (138) se dispone para recibir una o más gotas (109) formadas a partir de la corriente de fluido (108); y

una unidad de control del retardo de carga (128) acoplada operativamente al circuito de detección de corriente (134), en donde la unidad de control del retardo de carga (128) se configura para determinar un retardo de carga en base a una corriente medida por el circuito de detección de corriente (134).

5

11. El sistema de control del retardo de carga de la reivindicación 10, en donde el circuito de detección de corriente (134) comprende además al menos uno de:

un convertidor de corriente a voltaje para detectar la presencia de una gota cargada (109) que entra en el receptáculo (138); y

10

un integrador para detectar un número de gotas por unidad de tiempo que entran en el receptáculo (138).

12. El sistema de control del retardo de carga de la reivindicación 10, en donde la unidad de control del retardo de carga (128) se configura además para:

(a) aplicar una carga instantánea a la corriente de fluido a una primera frecuencia de accionamiento de un transductor de formación de gotas (102) del citómetro de flujo (100); y

15

(b) identificar una amplitud de accionamiento óptima variando una amplitud de accionamiento del transductor de formación de gotas (102) hasta que se detecta una corriente máxima en el receptáculo (138).

13. El sistema de control del retardo de carga de la reivindicación 12, en donde la unidad de control del retardo de carga (128) se configura además para identificar una segunda frecuencia de accionamiento aumentando la frecuencia de accionamiento del transductor de formación de gotas (102), mientras se continúa aplicando la carga instantánea a la primera frecuencia de accionamiento, hasta que la corriente medida en el receptáculo (138) regresa a la corriente máxima.

20

14. El sistema de control del retardo de carga de la reivindicación 13, en donde la unidad de control del retardo de carga (128) se configura además para calcular un retardo de gota en base a las frecuencias de accionamiento primera y segunda.

25

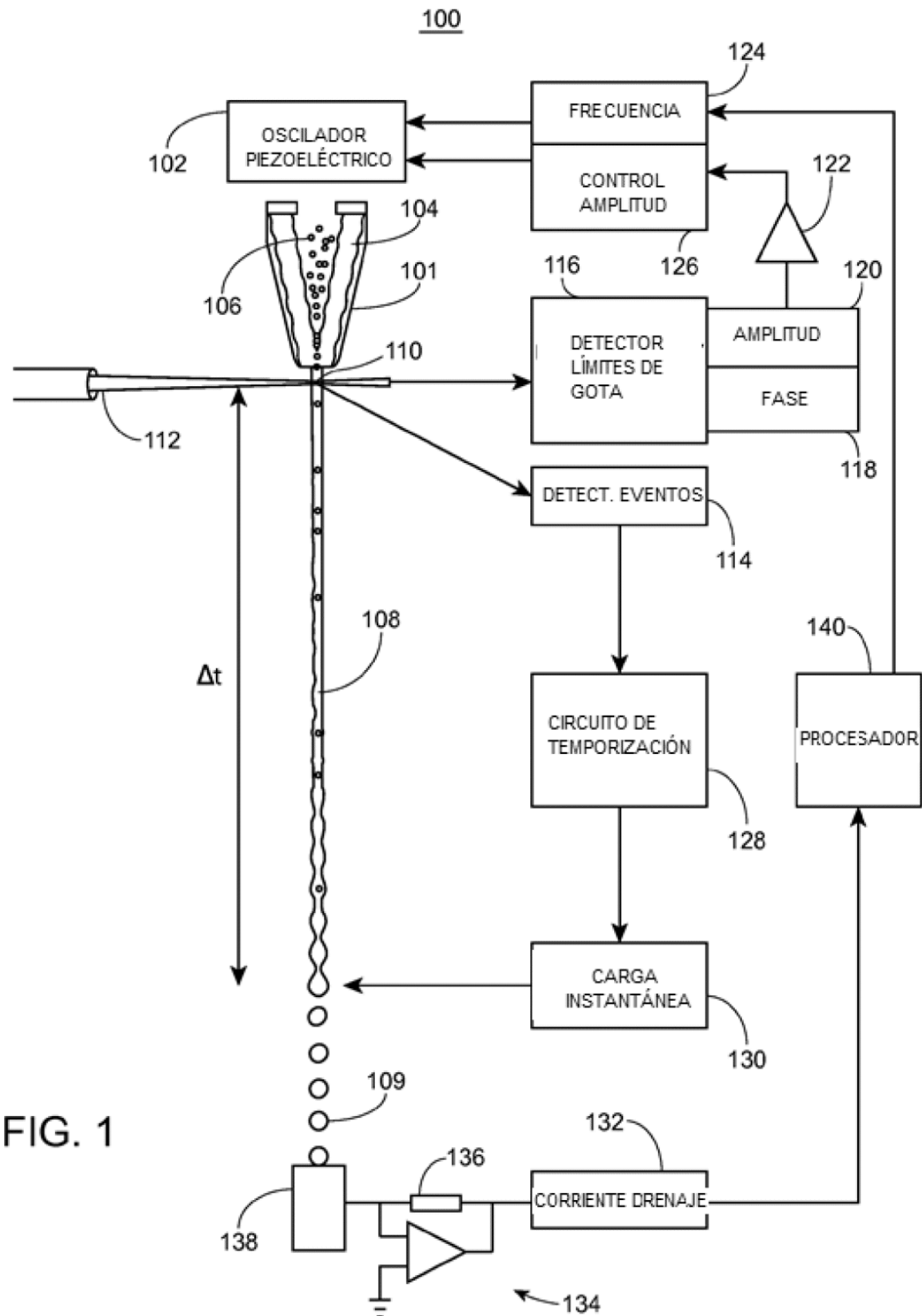


FIG. 1

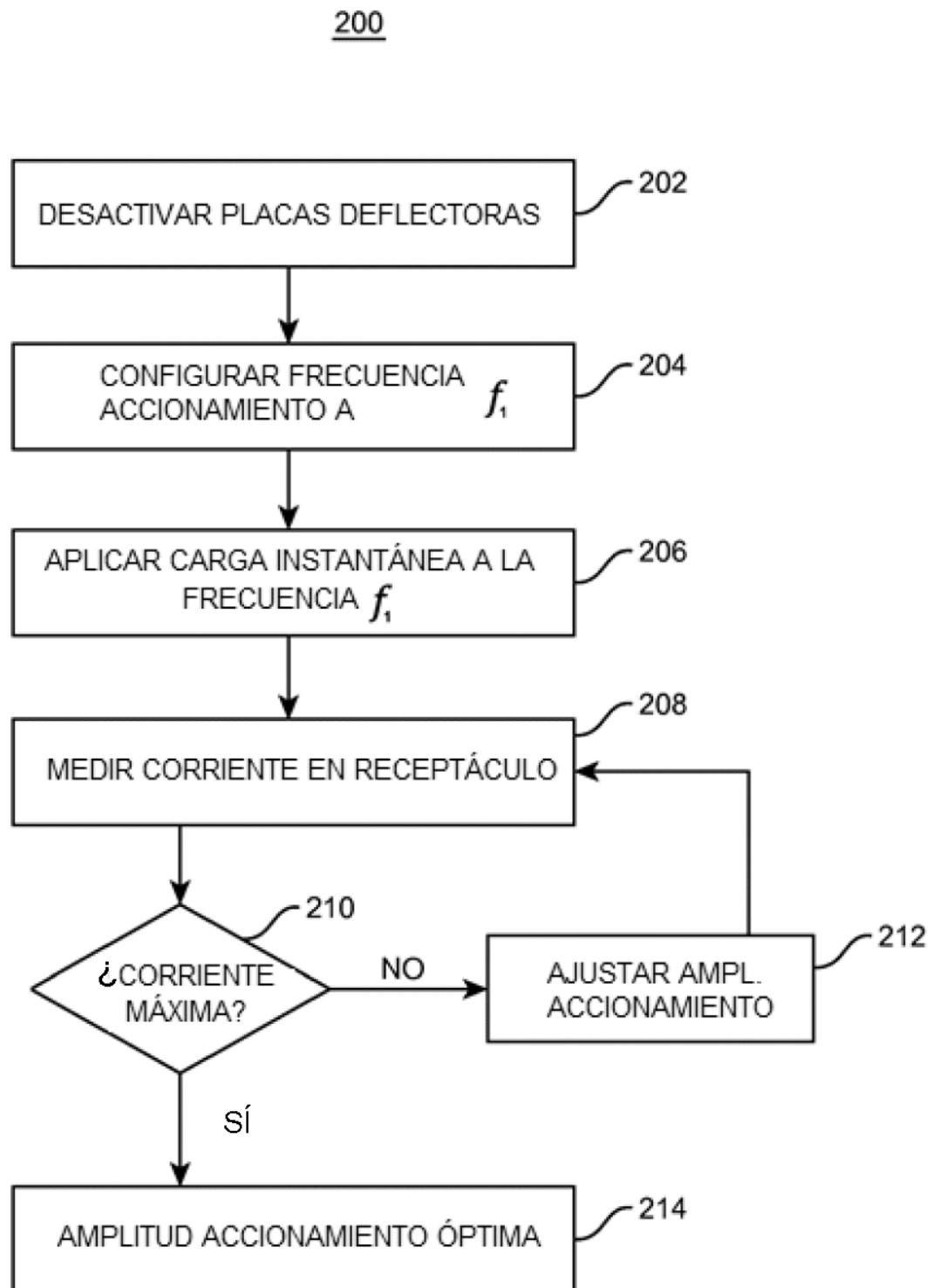


FIG. 2

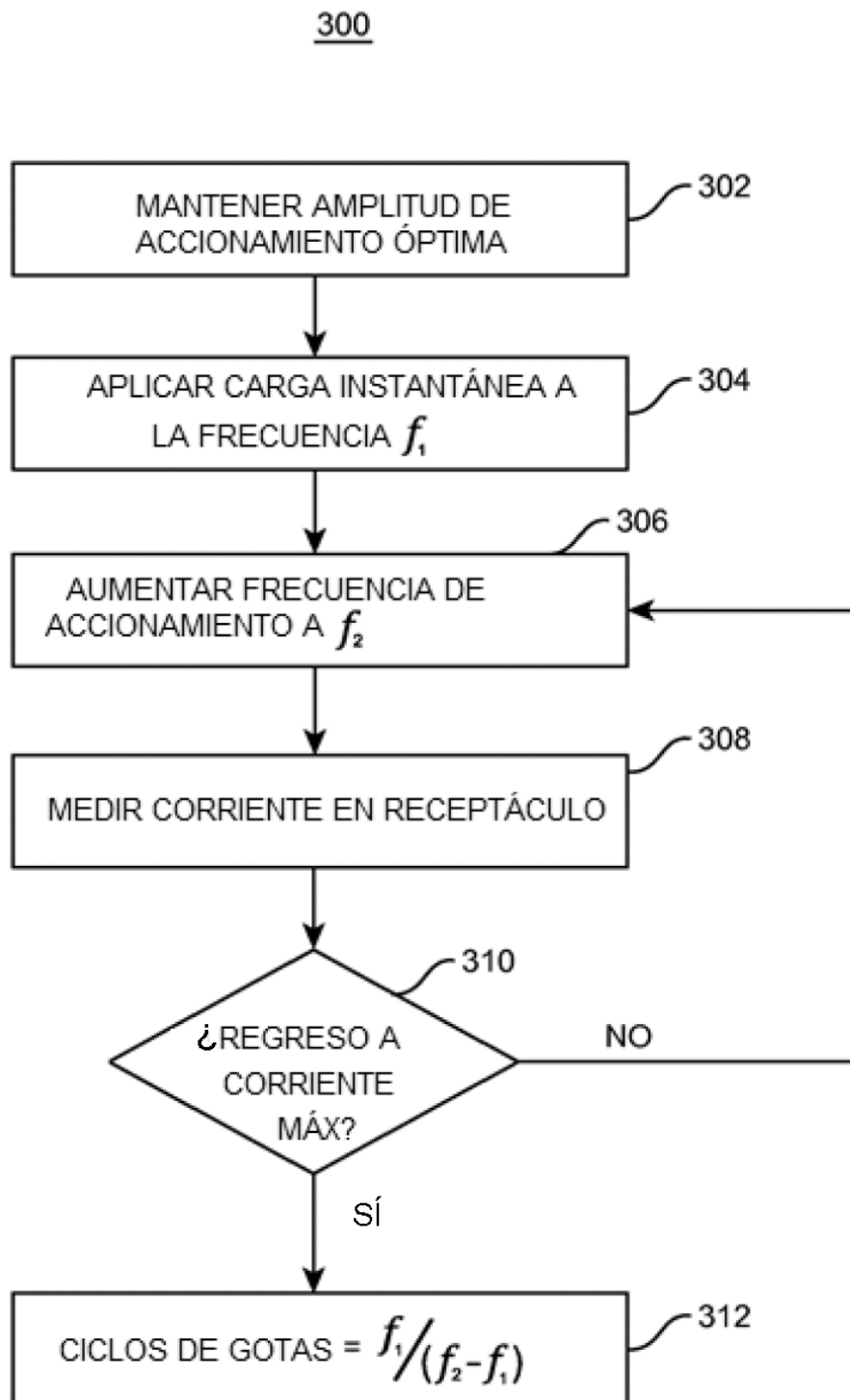


FIG. 3