

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 437**

51 Int. Cl.:

<b>C12M 1/34</b>	(2006.01)	<b>G01N 35/10</b>	(2006.01)
<b>C12M 3/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/00</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/02</b>	(2006.01)		
<b>C12N 5/07</b>	(2010.01)		
<b>C12N 5/16</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/569</b>	(2006.01)		
<b>G01N 33/574</b>	(2006.01)		
<b>C12Q 1/68</b>	(2006.01)		
<b>B01J 19/00</b>	(2006.01)		

12

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.06.2004 PCT/US2004/018505**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2004 WO04111610**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2004 E 04754938 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 1654346**

54 Título: **Método y sistema para el análisis de muestras de células de alta densidad**

30 Prioridad:

**12.06.2003 US 477807 P**

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

**05.12.2017**

73 Titular/es:

**ACCUPATH DIAGNOSTIC LABORATORIES, INC.  
(50.0%)  
2601 CAMPUS DRIVE  
IRVINE, CA 92612, US y  
BIODOT, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MOORE, MATHEW;  
REYES, MIRIAM;  
BAUNOCH, DAVID;  
TISONE, THOMAS y  
O'FARRELL, BRENDAN**

74 Agente/Representante:

**LLAGOSTERA SOTO, María Del Carmen**

**ES 2 645 437 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 para el Análisis de Muestras de Células de Alta Densidad

**Descripción**

5

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

Campo de la Invención.

10

La presente invención se refiere en general a un método para formar matrices de células en un sustrato para facilitar el análisis de diagnóstico de alto rendimiento de una pluralidad de muestras de células y, en particular, a matrices de células en las que las muestras de células discretas están dispuestas sustancialmente en una monocapa con controles negativos y positivos, así como muestras de prueba, dispuestas sobre el mismo sustrato. Más particularmente, la presente invención se refiere a matrices

15

celulares que comprenden múltiples muestras de ensayo y de control dispuestas sobre un único sustrato sobre el que se pueden realizar inmunohistoquímica, hibridación fluorescente in situ y análisis citogenéticos.

Descripción de la Técnica Relacionada

20

Los análisis clínicos de muestras de células obtenidas a partir de muestras de pacientes son realizados rutinariamente por parte de personal médico y son herramientas útiles para diagnosticar y tratar varias enfermedades y condiciones médicas. Las técnicas para realizar análisis clínicos se han hecho cada vez más sofisticadas, ya que los avances en medicina han llevado a métodos de detección y diagnóstico precoz de enfermedades y condiciones médicas. Dichas técnicas sofisticadas incluyen, por ejemplo,

25

inmunohistoquímica (IHC) e hibridación fluorescente in situ (FISH), que pueden ser útiles para diagnosticar enfermedades, como por ejemplo el cáncer. Además, los ensayos citogenéticos pueden ser útiles para diagnosticar enfermedades y afecciones médicas asociadas con aberraciones cromosómicas, tales como, por ejemplo, el síndrome de Down.

30

Dado que las técnicas cada vez más sofisticadas para detectar y diagnosticar enfermedades y condiciones médicas se han convertido en rutina, existe un mayor interés en los procedimientos simplificados para la realización de estas técnicas que no se basan en las habilidades altamente capacitadas del personal médico, lo que permite la posibilidad de aumentar dramáticamente el número de muestras que se pueden analizar al mismo tiempo. Tradicionalmente, los ensayos de diagnóstico tales como IHC, FISH y ensayos citogenéticos se realizan sobre un sustrato, habitualmente una lámina de microscopio de vidrio, que contiene una muestra por placa. La muestra individual por placa puede ser una muestra de paciente o una muestra de control, que se analiza conjuntamente con los resultados de la muestra de paciente para mitigar el riesgo de falsos positivos. Habitualmente, las muestras de células, ya sean muestras de control o de pacientes, se aplican a la placa del microscopio utilizando un método de soltado no estandarizado.

35

40

Desafortunadamente, los métodos actuales del estado de la técnica para dispensar gotas de células en placas de microscopio padecen una alta variabilidad debido a las técnicas individuales empleadas por diversos operadores. Habitualmente, se dejan caer gotas grandes en el intervalo de 10-100  $\mu$ l sobre una placa y se permite que fluyan a través de la superficie de la placa con la esperanza de que se produzca una distribución uniforme de las células. Con el fin de obtener resultados óptimos, el entorno en el que se aplican las gotas a las placas debe controlarse cuidadosamente con respecto a la temperatura y la humedad. Sin embargo, estos métodos se consideran más un arte que una ciencia y con frecuencia tienen como resultado un considerable solapamiento de células y una dispersión no uniforme de las células a través de la superficie del sustrato. La superposición y la no uniformidad pueden conducir a una interacción ineficiente o insuficiente entre un reactivo de ensayo y un objetivo, lo que en última instancia puede conducir a una detección deficiente y un diagnóstico erróneo.

45

50

WO-A-9934931 describe un método para formar un conjunto de un fluido en un sustrato. US-A-6168915 describe un método para formar un conjunto de células que comprende una pluralidad de muestras de células en un solo sustrato.

55

Los ensayos de diagnóstico para su uso con las matrices de células contemplados en el presente documento implican habitualmente el uso de anticuerpos, enzimas, fluoróforos, cromógenos y otros reactivos caros. En consecuencia, es ventajoso llevar a cabo el ensayo en un volumen tan pequeño como sea posible, para minimizar los costos. Por ejemplo, un ensayo de IHC de rutina requiere una serie de pasos, incluyendo la adquisición de células de una muestra biológica, el depósito de las células sobre un sustrato, y el procesamiento de la muestra de células de modo que esté lista para recibir un reactivo o sonda de prueba. La sonda se incuba generalmente con la muestra de células antes de la eliminación del exceso de sonda y la adición de un reactivo de detección, como por ejemplo un anticuerpo, que reconoce la interacción entre la sonda y la proteína de interés. Finalmente, se puede aplicar un recubrimiento de aceite al sustrato para evitar la evaporación y añadir una placa de cubierta con el fin de facilitar el análisis de

60

65

imágenes, ya sea a través de un microscopio o un sistema automatizado de imágenes. Un ensayo IHC habitual realizado sobre una placa de vidrio requiere generalmente un área de aproximadamente 25 x 50 mm, requiere el uso de entre aproximadamente 50-100  $\mu$ L de reactivo por ensayo, y requiere múltiples placas de vidrio para procesar muestras múltiples.

5

La variabilidad que surge de la aplicación de muestras de células a la superficie del sustrato puede conducir a un aumento de la variabilidad en los resultados de los ensayos clínicos y en última instancia a diagnósticos inexactos. Por el contrario, un resultado más ideal es la aplicación consistente de muestras de células (paciente y control) para proporcionar una distribución uniforme de células dispuestas sustancialmente en una monocapa en un lugar particular en el sustrato. Un resultado aún más ideal es la capacidad de miniaturizar el proceso de manera que se puedan incluir múltiples muestras en el mismo sustrato. De esta manera, por ejemplo, se pueden someter varias muestras de pacientes al ensayo deseado sobre la misma placa como las muestras de control. Un beneficio adicional del proceso de miniaturización es disminuir la cantidad de muestra y reactivo necesarios para llevar a cabo el ensayo de diagnóstico, disminuyendo así el coste de la prueba mientras que al mismo tiempo aumenta el número de ensayos que pueden realizarse con mayor fidelidad.

10

15

#### RESUMEN DE LA INVENCION

20

25

Las matrices celulares de la presente invención superan muchos de los inconvenientes asociados con los métodos actuales para llevar a cabo ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, las matrices de células formadas de acuerdo con la presente invención pueden comprender hasta aproximadamente 1000 muestras de células discretas adecuadas para el análisis de diagnóstico en un solo sustrato. Además, las matrices de células de la presente invención son particularmente adecuadas para análisis de diagnóstico de alto rendimiento, como por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC), hibridación fluorescente in situ (FISH) y análisis citogenéticos. Otra ventaja adicional de las matrices celulares de la presente invención es la capacidad para llevar a cabo el análisis de diagnóstico deseado en un solo sustrato, que incluye muestras de control positivo o negativo en el mismo sustrato que las muestras de ensayo.

30

35

40

45

50

En un aspecto innovador, se puede formar un conjunto de células que comprende una pluralidad de muestras de células discretas en un solo sustrato mezclando una suspensión de células en una fuente para obtener una distribución sustancialmente uniforme de las células dentro de la suspensión; aspirar la suspensión celular de la fuente; transportar de forma móvil la suspensión de células con respecto al sustrato; medir una cantidad predeterminada de la suspensión celular utilizando una bomba de desplazamiento positivo; dispensar una cantidad de la suspensión celular en un volumen de entre aproximadamente 1 nL a aproximadamente 500 nL, con una densidad de entre 200 y 400 células por cada 100 nL en forma de gotitas sobre el sustrato para formar una pluralidad de muestras de células discretas en las que cada muestra de células discretas está dispuesta sustancialmente en una monocapa sobre el sustrato individual; y dispersar de manera relativamente uniforme las células en el sustrato con un solapado mínimo lo suficientemente bajo entre las células de cada muestra de célula discreta, en que la distancia entre las muestras de células discretas se selecciona de manera que el perímetro externo de cada muestra de célula discreta está separado de la contigua con el perímetro de una muestra discreta adyacente, en que cada muestra de célula discreta dispensada ocupa un lugar en el sustrato que tiene un diámetro de aproximadamente 1 mm o menos. En otra forma de realización, el método incluye también las etapas de tratar la suspensión de células para minimizar el aglomerado celular y la lisis previa mezclando la suspensión celular. En ciertas formas de realización, pueden repetirse las etapas de dosificar una cantidad predeterminada de la suspensión de células y dispensar la suspensión de células mientras que, en otras formas de realización, las etapas de transportar la suspensión de células pueden repetirse junto con las etapas de dosificación y dispensación. En otras formas de realización, las etapas de mezcla, aspiración, transporte, dosificación y dispensación pueden repetirse para formar el conjunto de células.

55

60

65

En formas de realización adicionales, el método puede comprender además la etapa de dispensar una cantidad predeterminada de un fluido de cobertura suficiente para cubrir sustancialmente la pluralidad de muestras de células discretas dispuestas sobre el sustrato individual. El fluido de cobertura puede ser líquidos inertes, líquidos inmiscibles o aceite mineral. En formas de realización alternativas, el conjunto de células puede comprender al menos una muestra de ensayo y al menos una muestra de control. En ciertas formas de realización, el sustrato sobre el que se forma el conjunto de células puede ser una placa de vidrio, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de plástico, una membrana de nylon o una membrana de nylon sobre un rollo continuo. En ciertas formas de realización, el método puede comprender la etapa de revestir una superficie del sustrato con un modificador de superficie antes de dispensar la suspensión de células sobre el sustrato. El modificador de superficie puede ser poli-L-lisina, aminos, estreptavidina, epoxi, película de metal o materiales dieléctricos. En formas de realización adicionales, el sustrato puede ser una placa de vidrio que comprende una región de código de barras, una región de control y una región de prueba, en que la región de código de barras puede tener al menos un código de barras de seguimiento de placas o un código de barras de dispensación y bloqueo.

En otra forma de realización, el método puede comprender la etapa de revestir una superficie de la placa de vidrio con una capa hidrófoba en la región de control y la región de prueba antes de realizar la etapa de dispensación. La región hidrófoba puede estar configurada con una pluralidad de aberturas que pasan sustancialmente a través de la capa hidrófoba a la superficie de la placa de vidrio.

5

En el presente documento también se describe un método para llevar a cabo un análisis de diagnóstico en un conjunto de células. El método puede comprender las etapas de formar el conjunto de células que comprende una pluralidad de muestras de células discretas en un único sustrato; poner en contacto el conjunto de células con al menos un reactivo de ensayo suficiente para detectar la presencia de un analito predeterminado; permitir que se produzca una reacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado; y detectar la reacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado, de manera que la reacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado sea suficiente para proporcionar un diagnóstico. En el presente documento también se describe un método para formar el conjunto de células que puede comprender las etapas de mezclar una suspensión de células en una fuente; aspirar la suspensión celular de la fuente; transportar de forma móvil la suspensión de células con respecto al sustrato; medir una cantidad predeterminada de la suspensión celular utilizando una bomba de desplazamiento positivo; y dispensar la cantidad dosificada de la suspensión de células en forma de gotitas sobre el sustrato para formar una pluralidad de muestras de células discretas, de tal manera que cada muestra de células discretas esté dispuesta sustancialmente en una monocapa en el sustrato. El método también incluye las etapas de tratar la suspensión de células para minimizar el aglomerado celular y la lisis antes de mezclar la suspensión celular. Las etapas de medir una cantidad predeterminada de la suspensión de células y dispensar la suspensión de células pueden repetirse mientras que, en otros casos, las etapas de transportar la suspensión de células pueden repetirse junto con las fases de dosificación y dispensación. Las etapas de mezcla, aspiración, transporte, dosificación y dispensación pueden repetirse para formar el conjunto de células. La fase de permitir que se produzca la reacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado puede comprender calentar al menos una muestra de células discretas sobre el sustrato.

10

15

20

25

El método para llevar a cabo un análisis de diagnóstico puede comprender además la etapa de distribuir una cantidad predeterminada de un fluido de cobertura suficiente para cubrir sustancialmente la pluralidad de muestras de células discretas dispuestas sobre el sustrato individual. El líquido de cobertura puede ser líquidos inertes, líquidos inmiscibles o aceite mineral. El conjunto de células puede comprender al menos una muestra de ensayo y al menos una muestra de control. El sustrato sobre el que se forma el conjunto de células puede ser una placa de vidrio, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de plástico, una membrana de nylon o una membrana de nylon en un rollo continuo. El método puede comprender la etapa de revestir una superficie del sustrato con un modificador de superficie antes de dispensar la suspensión de células sobre el sustrato. El modificador de superficie puede ser poli-L-lisina, aminos, estreptavidina, epoxi, película metálica, o materiales dieléctricos. El sustrato puede ser una placa de vidrio que comprende una región de código de barras, una región de control y una región de prueba, en que la región de código de barras puede tener al menos un código de barras de seguimiento de placas o un código de barras de dispensar y cerrar. El análisis de diagnóstico es hibridación in situ fluorescente y el reactivo de ensayo es una sonda de ácido nucleico; en otros casos, el ensayo de diagnóstico es un ensayo de inmunohistoquímica y el reactivo de ensayo es una sonda de anticuerpo; en otros casos más, el ensayo de diagnóstico es un ensayo citogenético y el reactivo de prueba es una mancha cromosómica.

30

35

40

En otras formas de realización, un conjunto de células de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas sobre la que se puede realizar un ensayo de diagnóstico de acuerdo con la presente invención puede comprender una pluralidad de muestras de células discretas en un solo sustrato, con las células de cada muestra de células discretas dispuestas sustancialmente en una monocapa sobre el sustrato. En otra forma de realización, el sustrato único puede también comprender una región de código de barras, una región de prueba y una región de control. La región de código de barras puede comprender al menos uno de un código de barras de seguimiento de placas y un código de barras de dispensación y bloqueo. En otra forma de realización más, una reacción entre un reactivo de ensayo y un analito predeterminado dentro de la pluralidad de muestras de células discretas de la región de control puede generar un patrón detectable por un sistema de formación de imágenes de tal manera que el patrón sea suficiente para identificar de forma exclusiva el sustrato sobre el cual está formado el conjunto de células. En una forma de realización, la región de control del conjunto de células puede comprender entre aproximadamente 1, y hasta aproximadamente 1000 muestras de células discretas.

45

50

55

En ciertas formas de realización, la pluralidad de muestras de células discretas puede comprender al menos una muestra de ensayo y al menos una muestra de control en el sustrato único. En otra forma de realización más, el ensayo de diagnóstico puede ser inmunohistoquímica, hibridación fluorescente in situ o análisis citogenético. En todavía otra forma de realización, cada muestra de células discreta del conjunto de células puede tener un diámetro de menos de aproximadamente 1 mm y puede formarse a partir de una gotita dispensada que tiene un volumen de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 nL. En otra forma de realización más, el sustrato puede comprender una placa de vidrio, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de plástico, una membrana de nylon o una membrana de nylon sobre un rollo continuo. En

60

65

algunas formas de realización, el conjunto de células puede estar cubierto con un fluido de cobertura. El fluido de cobertura puede ser líquidos inertes, líquidos inmiscibles o aceite mineral.

5 En otra forma de realización, el sustrato sobre el que se forma el conjunto de células es una placa de vidrio que tiene una superficie que puede comprender una capa hidrófoba configurada con una pluralidad de  
 10 aberturas para aceptar las muestras de células discretas en la región de ensayo y la región de control, en que la pluralidad de aberturas pasan sustancialmente a través de la capa hidrofóbica a una superficie de la placa de vidrio. En otra forma de realización más, la capa hidrófoba sobre la placa de vidrio tiene aproximadamente 105 aberturas para aceptar las muestras de células discretas en la región de muestra y la región de control en que cada abertura es capaz de aceptar un volumen entre aproximadamente 1 nL a aproximadamente 500 nL y cada abertura tiene un diámetro de aproximadamente 1 mm o menos.

15 En el presente documento también se describe un sustrato sobre el que puede formarse un conjunto de células que puede comprender una región de código de barras, una región de control y una región de prueba, en que el conjunto de células puede comprender una pluralidad de muestras de células discretas dispuestas sustancialmente en una monocapa, y la región de código de barras puede comprender al menos uno de un código de barras de seguimiento de placas y un código de barras de distribución y bloqueo. La densidad de las muestras de células discretas en el sustrato está entre aproximadamente 50 a aproximadamente 105 muestras de células discretas por sustrato y cada muestra de células discretas ocupa  
 20 una posición en el sustrato que tiene un diámetro de aproximadamente 1, mm o menos. Las muestras de células discretas se forman a partir de una gotita de una suspensión de células que tiene un volumen entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 nL. El sustrato puede ser una placa de vidrio, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de plástico, una membrana de nylon o una membrana de nylon en un rollo continuo. El sustrato puede ser una placa de vidrio que tiene una superficie que está recubierta con una capa hidrófoba en la región de control y la región de prueba y la capa hidrófoba está configurada con una pluralidad de aberturas que pasan sustancialmente a través de la capa hidrófoba a la superficie de la placa de vidrio, en que cada una es capaz de aceptar las muestras de células discretas dispuestas sustancialmente en una monocapa. La capa hidrófoba tiene una densidad de aproximadamente 1500  
 25 aberturas, cada abertura es de aproximadamente 1, mm o menos de diámetro y es capaz de aceptar un volumen de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200 nL. El sustrato se recubre con un modificador de superficie que puede comprender poli-L-lisina, aminos, estreptavidina, epoxi, película metálica o materiales dieléctricos. El sustrato está adaptado para proporcionar calentamiento a al menos una muestra de células discretas.

35 En el presente documento también se describe un método para formar un conjunto de células bajo un fluido de cobertura, en el que el conjunto de células puede comprender una pluralidad de muestras de células discretas en un único sustrato. El método puede comprender cubrir el sustrato con un fluido de cobertura de manera que una superficie del fluido de cobertura está expuesto; mezclar una suspensión de células dentro de una fuente; aspirar la suspensión celular de la fuente; transportar de forma móvil la suspensión de células con respecto al sustrato; medir una cantidad predeterminada de la suspensión celular utilizando  
 40 una bomba de desplazamiento positivo; y dispensar la cantidad dosificada de la suspensión celular en forma de gotitas desde un dispensador sin contacto a una velocidad controlada sobre la superficie del fluido de cobertura de manera que las gotitas penetren en la superficie del fluido de cobertura y formen una pluralidad de muestras de células discretas, en las que cada muestra de células discretas está dispuesta sustancialmente en una monocapa sobre el sustrato. El método puede comprender adicionalmente aspirar al menos un reactivo de ensayo de una fuente; y dispensar el reactivo de ensayo sobre una pluralidad de muestras de células discretas del conjunto de células. El método puede incluir también la detección de una reacción entre el reactivo de ensayo y un analito predeterminado dentro de las muestras de células discretas del conjunto de células. El método puede comprender la etapa del tratamiento de la suspensión celular para  
 45 minimizar la aglutinación y la lisis antes de llevar a cabo la etapa de mezclado.

50 En el presente documento también se describe un método para formar un conjunto de células para análisis citogenético que comprende una pluralidad de 5 células dispuestas sustancialmente en monocapa sobre un solo sustrato. El método puede comprender las etapas de mezclar una suspensión de células en una fuente para obtener una distribución sustancialmente uniforme de las células dentro de la fuente; aspirar la suspensión celular de la fuente; transportar de forma móvil la suspensión de células en relación con el sustrato; medir una cantidad predeterminada de la suspensión celular utilizando una bomba de desplazamiento positivo; y distribuir la cantidad dosificada de la suspensión de células en forma de gotitas sobre el sustrato para formar una pluralidad de muestras de células discretas, estando cada muestra de células discretas dispuesta sustancialmente en una monocapa sobre el sustrato y la distancia entre las muestras de células discretas se minimiza de manera que el perímetro de cada muestra de células discretas es contiguo al perímetro de una muestra de células discretas adyacentes. El método puede comprender también la etapa de tratar la suspensión de células para minimizar el aglutinamiento celular y la lisis antes de llevar a cabo la etapa de mezclado. El método puede comprender la etapa de repetir al menos el paso de la etapa de dispensación para formar el conjunto de células. El método puede comprender la etapa de repetir al menos las etapas de transporte, dosificación y dispensación para formar el conjunto de células. El  
 55  
 60  
 65

método puede comprender las etapas de repetir la mezcla, aspirar, transportar, dosificar y dispensar desde el conjunto de células.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

5

La FIG. 1 es una generalización esquemática de un aparato dispensador que tiene características y ventajas de acuerdo con la presente invención.

10

La FIG. 2 es un esquema que ilustra un conjunto de células que comprende una pluralidad de muestras de células discretas sobre un único sustrato que tiene características y ventajas de acuerdo con la presente invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERENTES

15

##### Visión General del Sistema

Un aparato dispensador de la presente invención es particularmente adecuado para formar conjuntos de células que tienen una pluralidad de muestras de células dispuestas sustancialmente en una monocapa sobre un solo sustrato. Las células dispuestas sustancialmente en una monocapa son células que están dispersadas de forma relativamente uniforme con un solapamiento mínimo suficientemente bajo sobre la superficie del sustrato de tal manera que un sistema de formación de imágenes pueda inspeccionar de manera precisa y rápida la morfología tridimensional de células individuales y detectar la señal resultante de la interacción de un reactivo de ensayo y un analito u objetivo predeterminado dentro de las células. El aparato dispensador también es adecuado para dispensar reactivos de ensayo sobre la pluralidad de muestras de células después de la formación del conjunto de células. Habitualmente, las muestras de pacientes o de ensayo, así como las muestras de control positivo y negativo, comprenden el conjunto de células formado en el sustrato individual.

Tal como se muestra en la FIG. 1, el aparato dispensador 108 comprende generalmente un cabezal dispensador o dispensador 128 que tiene una válvula u otros medios dispensadores 204 accionados por un accionador, tal como, por ejemplo, un solenoide que dispensa gotas sobre un sustrato 111 sin contacto. El dispensador 128 está acoplado hidráulicamente o en comunicación de fluido con una bomba de desplazamiento positivo 120 para dosificar cantidades precisas de fluido o líquido 130 a o hacia el dispensador 128. El cabezal dispensador 128 está montado sobre o en asociación con una plataforma X-Y-Z 112. El término "plataforma X-Y-Z" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una plataforma que es capaz de moverse en la dirección X, Y, y/o Z en cualquier combinación. La plataforma X-Y-Z 112 puede incluir uno o más motores paso a paso de posición 123, 124, 125 o similares que son operables para desplazar el cabezal dispensador 128 y/o la plataforma X-Y-Z 112 entre sí en las direcciones X, X-Y o X-Y-Z. Debe hacerse notar también que aunque esta descripción puede referirse solamente a un solo cabezal dispensador 128, se contempla que también pueden utilizarse múltiples cabezales de dispensación en matrices lineales (1xN) o bidimensionales (MxN) con una eficacia igual o superior. Dichos múltiples cabezales dispensadores pueden ser operados en paralelo, es decir, para el funcionamiento de múltiples segmentos o de otra manera coordinada, según se desee.

Uno o más sustratos 111 pueden estar montados en la plataforma X-Y-Z 112 para recibir el reactivo dispensado desde el dispensador 128. Adicionalmente, un depósito fuente 175 puede estar montado en la plataforma X-Y-Z 112 desde la cual los reactivos pueden ser aspirados por el dispensador 128 y distribuidos sobre el sustrato 111. Debe entenderse que mientras que un depósito de fuente única 175 y un único sustrato 111 están representados en la FIG. 1, múltiples fuentes y múltiples sustratos pueden estar montados o dispuestos en la plataforma X-Y-Z 112 según se desee. Frecuentemente, el depósito de fuente 175 será una microplaca, pero puede ser cualquier depósito adecuado que almacene temporalmente reactivos para dispensar sobre el sustrato 111 mediante el dispensador 128. De manera similar, debe entenderse que el término "reactivo" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a suspensiones celulares o reactivos de ensayo que serán dispensados por el dispensador 128 sobre el sustrato 111.

55

El sustrato 111 puede comprender cualquier superficie adecuada sobre la que se puede formar un conjunto de células y se puede realizar un ensayo de diagnóstico. Los sustratos ejemplares incluyen, pero no se limitan a, membranas de nylon, membranas de plástico, membranas de nitrocelulosa y placas de vidrio. En ciertas formas de realización, el sustrato 111 puede comprender una membrana, como por ejemplo nylon, que se alimenta desde un rollo continuo.

60

La bomba de desplazamiento positivo 120 preferiblemente comprende una bomba de jeringa, aunque pueden usarse otras fuentes de fluido de corriente continua. La bomba de jeringa 120 está acoplada hidráulicamente a o en comunicación de fluido con un depósito de fluido 116 a través de una primera línea de suministro 150 y una válvula de conmutación 145. La bomba de jeringa 120 extrae el fluido 130 desde el depósito de fluido 116 y lo proporciona a o hacia el cabezal dispensador 128 a través de una segunda línea de suministro 152 también en comunicación con la válvula de conmutación 145.

65

La bomba de jeringa 120 tiene un pistón movable 118 dentro de un cilindro de jeringa 162. La bomba de jeringa 120 es accionada por un accionador de bomba de jeringa 142 que comprende, por ejemplo, un motor paso a paso y un tornillo conductor asociado, para extender y retraer el pistón (118) dentro del cilindro de la jeringa 162. Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que cuando el pistón 118 se retrae, el fluido 130 se extrae del depósito 116 a través de la válvula de conmutación 145 hacia la bomba de jeringa 120. Cuando el pistón se extiende de nuevo, el fluido 130 es obligado a fluir desde el cilindro de jeringa 162 al cabezal dispensador 128 a través del segundo tubo de suministro 152, después de lo cual es expulsado por el cabezal dispensador 128 sobre el sustrato 111 en forma de gotitas.

En una forma de realización, el fluido 130 comprende el reactivo que se dispensa sobre el sustrato 111. Así, el depósito 116, el cilindro de bomba 162, el dispensador 128 y las líneas de suministro 150 y 152 se llenan con el fluido 130 que se va a dispensar. Esta disposición es particularmente ventajosa cuando se van a dispensar grandes cantidades del mismo reactivo sobre el sustrato 111. Por ejemplo, puede ser deseable fabricar un gran número de sustratos que tengan cada uno un patrón idéntico de controles positivos y negativos dispuestos sobre el mismo para su uso por un laboratorio de referencia, que puede añadir posteriormente muestras de pacientes o de prueba y realizar análisis de diagnóstico.

En otra forma de realización, el fluido 130 comprende un reactivo de soporte, como por ejemplo agua destilada, y el aparato dispensador 108 funciona en un modo de aspiración/dispensación. En esta forma de realización, el dispensador 128 se utiliza para aspirar una cantidad predeterminada de reactivo desde el depósito de fuente 175, transportar de forma móvil el reactivo relativo al sustrato 111, medir la cantidad predeterminada del reactivo y dispensar el reactivo aspirado sobre o dentro del sustrato 111. El reactivo se aspira aspirando o disminuyendo el pistón de la bomba 118 con la válvula de conmutación 145 abierta para crear una presión reducida o un vacío parcial a lo largo de la línea de suministro 152 para extraer el reactivo desde el depósito de fuente 175 al dispensador 128 a través de una punta o boquilla adecuada 205 sobre el mismo. En ciertas formas de realización, este mismo proceso puede repetirse a menor escala para mezclar el reactivo, en particular las células que pueden haberse asentado fuera de la solución para proporcionar una suspensión de células relativamente homogénea que a continuación se puede aspirar y dispensar posteriormente sobre el sustrato 111. Tal como se apreciará, puede ser necesario repetir algunas o todas las etapas para formar el conjunto de células deseada y/o dispensar los reactivos de ensayo deseados necesarios para el análisis de diagnóstico sobre el conjunto de células después de que se forme.

Un controlador 114 supervisa el funcionamiento de la bomba de jeringa 120, la plataforma X-Y-Z 112, y el cabezal dispensador 128. Específicamente, el controlador 114 coordina y controla el movimiento de cada uno de los motores paso a paso. 123,124, 125 y el accionador 142 de la bomba de jeringa, así como la apertura y cierre de la válvula dispensadora 204 para medir y distribuir con precisión una cantidad de reactivo en una o más ubicaciones predeterminadas sobre el sustrato 111. Según sea necesario, el controlador 114 también controla y coordina la mezcla y la aspiración del reactivo desde el depósito de fuente 175. Un programa de software está interconectado con el controlador 114 para guiar la mezcla, dispensación y aspiración para diferentes modos de funcionamiento y diferentes aplicaciones. Tal como se describe más detalladamente a continuación, se genera preferentemente un archivo de texto definido por el usuario, por ejemplo, a partir de una hoja de cálculo de valores o una plantilla, con listas de números de volúmenes de dispensación definidos por el usuario para uno o más reactivos y coordenadas correspondientes de la operación de mezcla, aspiración y dispensación. El controlador 114 utiliza estos datos de archivo de texto en cooperación con el programa de software para controlar y coordinar con precisión el funcionamiento del aparato dispensador 108.

El aparato dispensador 108 puede operar en modo de "paso y repetición" o, alternativamente, "sobre la marcha", es decir, sin parar el movimiento de la plataforma X-Y-Z 112. Para acomodar la dispensación sobre la marcha sin sacrificar la exactitud, precisión o repetibilidad, el controlador 114 calcula un ajuste de fase para cada ciclo de dispensación. El ajuste de fase es tal que avanza o retarda el momento en que se abre y se cierra la válvula 204 de manera que la gotita dispensada del reactivo caiga en la posición deseada sobre el sustrato 111 (o en un lugar deseado desplazado), teniendo en cuenta su trayectoria anticipada.

Los expertos en la técnica apreciarán que la magnitud del ajuste de fase necesario o deseado dependerá, entre otras cosas, de una serie de parámetros de entrada y salida del sistema y características de comportamiento, incluyendo el desplazamiento deseado de la gota (si existe), la distancia vertical entre la tobera del cabezal dispensador 205 y la superficie del sustrato 111, la velocidad y/o la aceleración del cabezal dispensador 128 y/o el sustrato 111 entre sí, la velocidad de las gotitas dispensadas, la temperatura y la humedad ambiente, y otros factores controlados y/o incontrolados. Mientras que algunos de estos parámetros o características pueden aislarse y estudiarse de forma que su impacto en el ajuste de fase necesario sea bastante predecible, otros parámetros o características no se pueden aislar ni predecir. Los ajustes precisos de fase pueden determinarse experimentalmente para una configuración de producción determinada, ya sea antes o durante la producción, de modo que se alcance un alto grado de precisión, precisión y repetibilidad durante ciclos de producción largos.

Una de las ventajas de formar un conjunto de células utilizando el aparato dispensador 108 que se describe en la presente memoria es un conjunto de células en que cada muestra de células discretas se asigna su propia dirección en el sustrato 111. Una vez que el conjunto es contactado con los reactivos de ensayo deseados, se puede implementar un sistema de formación de imágenes para desplazarse con precisión y rapidez alrededor del sustrato 111 para detectar una reacción entre el reactivo o reactivos de ensayo en contacto con el conjunto de células y un (los) analito (s) u objetivo (s) dentro de las células del conjunto. El sistema de imagen utilizado para analizar las matrices de células de la presente invención puede ser un microscopio o una máquina automatizada capaz de detectar una reacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado. Dicha reacción puede incluir la emisión de fluorescencia, luz, radiactividad, o similares.

Tal como apreciará un experto en la técnica, si el conjunto de células se va a utilizar para diagnósticos basados en el ensayo de hibridación in situ fluorescente, el analito u objetivo predeterminado dentro de las muestras de células puede ser un gen particular que puede ser detectado con una sonda de ácido nucleico disponible comercialmente. De forma similar, si se va a utilizar el conjunto de células para diagnósticos basados en un ensayo de inmunohistoquímica, el analito u objetivo predeterminado dentro de las muestras de células puede ser una proteína particular que se puede detectar con un anticuerpo comercialmente disponible. El anticuerpo 5 puede estar marcado principalmente o ser capaz de ser detectado con un reactivo subsiguiente. Adicionalmente, si el conjunto de células debe ser utilizada para el diagnóstico basado en un ensayo citogenético, el analito predeterminado es un cromosoma que puede teñirse con un reactivo de tinción de cromosomas disponible comercialmente. Un experto en la técnica apreciará que la presente invención no se limita a ensayos de diagnóstico particulares que pueden ser realizados en un conjunto de células, y tampoco se pretende que la presente invención se limite a cualquier analito predeterminado particular, ya sea comercialmente disponible o no. De hecho, las matrices de células formadas de acuerdo con los métodos descritos en este documento son susceptibles a cualquier tipo de diagnóstico que se beneficia de muestras de células discretas dispuestas sustancialmente en una monocapa en un único sustrato.

#### Dispositivos de Dispensación

La presente invención incorpora el uso de métodos y dispositivos para gotas dispensadoras de reactivo sin contacto sobre un sustrato 111 para formar un conjunto de células sobre la cual se pueden realizar ensayos de diagnóstico, tales como, por ejemplo, inmunohistoquímica (IHC), hibridación fluorescente in situ (FISH) y análisis citogenético. Los métodos y dispositivos utilizados para dispensar la suspensión de células y cualquier reactivo de ensayo subsiguiente en una forma sin contacto sobre el sustrato no son críticos para la presente invención, y un experto en la técnica apreciará que se pueden utilizar muchos métodos y dispositivos para generar dichos conjuntos de células y dispensar dichos reactivos de ensayo.

Tal como se muestra en la FIG. 1, el aparato dispensador 108 se puede implementar utilizando cualquiera de un número de dispensadores de reactivos, dispensadores piezoeléctricos, distribuidores de válvula solenoide y similares disponibles comercialmente, aunque se prefiere un distribuidor de válvula solenoide para aplicaciones generales. Aunque la selección del cabezal dispensador 128 no es crítica para poner en práctica la presente invención, se ha encontrado que un distribuidor de válvula accionado por solenoide proporciona buenos resultados cuando se utiliza de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. Los expertos en la técnica apreciarán que existen otros tipos de dispensadores y dispositivos de accionamiento de válvulas que pueden utilizarse eficazmente. Los ejemplos de dispensadores que pueden ser utilizados en la presente invención incluyen, por ejemplo, dispensadores de cepillos de aire, distribuidores piezoeléctricos, dispensadores de impulsos de fluido, distribuidores accionados por calor y similares.

Una bomba de desplazamiento positivo 120 proporcionada en serie con el dispensador 128 permite la dosificación de una cantidad predeterminada del reactivo dispensado (que puede medirse por la cantidad o el caudal) a controlar independientemente de las características de flujo particulares del líquido que se dispensa y / o de los parámetros de funcionamiento del dispensador particular 128. Por ejemplo, el tamaño de las gotitas formadas por el dispensador 128 y, por tanto, el número de células distribuidas sobre el sustrato 111, se puede ajustar cambiando la frecuencia de funcionamiento (para una válvula solenoide o distribuidor piezoeléctrico) o ajustando la presión de aire o el tamaño del orificio de salida (para un dispensador de vaporizador) sin afectar el caudal del reactivo. Además, el caudal de reactivo puede ser controlado independientemente de los parámetros de funcionamiento del sistema requeridos de otro modo para conseguir operaciones de dispensación estables. La cantidad de reactivo dispensado, en términos de cantidad o caudal, es controlada independientemente por la bomba de desplazamiento positivo 120. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "reactivo" puede significar una suspensión de células o un reactivo de ensayo que se distribuirá sobre el conjunto de células que se forma.

Siguiendo con referencia a la FIG. 1, la bomba 120 es preferiblemente una bomba de jeringa 120 de desplazamiento positivo de alta resolución, acoplada hidráulicamente al dispensador 128. Alternativamente, la bomba 120 puede ser cualquiera de varias variedades de dispositivos de bombeo disponibles



comercialmente para medir cantidades precisas de líquido. Se prefiere una bomba de tipo jeringa 120, tal como se muestra por ejemplo en la FIG. 1, debido a su conveniencia y disponibilidad comercial. Sin embargo, se puede utilizar una amplia variedad de otros medios de fuente de fluido de corriente continua para conseguir los beneficios y ventajas descritos en la presente memoria. Estos pueden incluir, sin limitación, bombas rotatorias, bombas peristálticas, bombas oscilantes, y similares, o una fuente de corriente de fluido regulada electrónicamente.

Varias bombas de jeringa adecuadas se encuentran disponibles comercialmente. Por ejemplo, el Dispensador de Bomba de Jeringa Biodot CV1000, disponible en Biodot, Inc. (Irvine, CA) incorpora un motor paso a paso controlado electrónicamente para proporcionar una gestión precisa del líquido utilizando una variedad de tamaños de jeringas. Los 1000 CV son accionados por una sola fuente de alimentación de 24 voltios de CC y se controlan a través de una interfaz de bus RS232 o RS485 estándar industrial. La bomba de jeringa 120 puede tener de 3,000 a 24,000 pasos, aunque pueden usarse bombas de mayor resolución con 48,000-768,000 pasos, utilizadas con la presente invención. Se pueden utilizar también bombas de mayor resolución, tales como, por ejemplo, bombas piezoeléctricas, para proporcionar resoluciones aún más finas, si se desea.

Pueden emplearse varias bombas de jeringa en paralelo, por ejemplo, para suministrar concentraciones variables de reactivos y/u otros líquidos al dispensador o para alternar operaciones de dosificación entre dos o más reactivos según se desee al llevar a cabo los ensayos de diagnóstico contemplados por la presente invención.

El depósito de reactivo 116 puede ser uno cualquiera de un número de receptáculos adecuados capaces de permitir que un reactivo líquido sea sifonado en la bomba 120. El depósito 116 puede estar presurizado tal como se desee, pero preferiblemente se ventila a la atmósfera. El tamaño y forma particulares del depósito 116 son relativamente poco importantes. Las suspensiones de células que se dispensan sobre o dentro del sustrato 111 pueden colocarse en una microplaca o fuente similar 175 antes de ser distribuidas a través del dispensador 128 sobre o dentro del sustrato 111 para formar el conjunto de células.

Controlador

En una forma de realización preferente de la presente invención, el aparato dispensador 108 utiliza un controlador 114 que generalmente comprende una CPU u ordenador host que interactúa con alguna forma de memoria de datos. En particular, el controlador puede dividirse en cinco subsistemas básicos: CPU host, circuitos de control de coordenadas, circuitos de memoria y lógica, circuitos de conteo de parada de jeringa y circuitos de disparo de válvulas. Los expertos en la técnica apreciarán que cada subsistema trabaja en cooperación con los otros subsistemas para controlar y coordinar simultáneamente los motores paso a paso 123, 124, 125, el motor de bomba de jeringa 142 y el dispensador de válvula 128 para mezclar, aspirar, transportar, medir y dispensar con precisión una cantidad de reactivo en uno o más lugares predeterminados sobre o en el sustrato 111. El controlador 114 también puede coordinar y controlar las operaciones de lavado/purga y rellenar el aparato dispensador con fluido desde el depósito de fluido 116, según sea necesario o deseado.

En otra forma de realización preferente, descrita con más detalle en la Solicitud de Patente No. US 09/945,388, presentada el 30 de agosto de 2001, publicada bajo la Publicación No. US 2002/0159919 el 31 de octubre de 2002 y titulada METHOD AND APPARATUS FOR HIGH SPEED MICROFLUIDIC DISPENSING USING TEXT FILE CONTROL (MÉTODO Y APARATO PARA LA ADMINISTRACIÓN DE MICROFLUÍDOS DE ALTA VELOCIDAD UTILIZANDO UN CONTROL DE ARCHIVO DE TEXTO) el aparato dispensador 108 está equipado con un controlador 114 que está en conexión con un programa informático para guiar la dispensación y/o aspiración para diferentes modos de funcionamiento del sistema y diferentes aplicaciones. Preferentemente, se genera un archivo de texto definido por el usuario, por ejemplo, a partir de una hoja de cálculo de valores o plantilla, con listas de número de volúmenes de dispensación definidos por el usuario de uno o más reactivos y coordenadas correspondientes de la operación de dispensar y/o aspirar. El controlador 114 utiliza estos datos de archivo de texto en cooperación con el programa de software para controlar y coordinar con precisión el funcionamiento del aparato dispensador 108.

Una ventaja de utilizar el control de archivo de texto en conjunción con el aparato de aspirado/dispensador y las operaciones de las formas de realización descritas en el presente documento es que los patrones complejos de ubicación de dispensación y volumen de gotita se pueden lograr fácilmente a través, por ejemplo, de una plantilla de hoja de cálculo. Esto es particularmente útil para aplicaciones de dispensación "combinatoria" en las que el número "n" de reactivos de ensayo se combinan en diferentes proporciones y se aplican a las muestras de células discretas del conjunto de células. Por ejemplo, el usuario puede desear distribuir dos o más reactivos de ensayo a un conjunto particular de muestras de células discretas que comprenden el conjunto de células. El usuario puede diseñar de forma personalizada el experimento combinatorio utilizando el formato de archivo de texto o de hoja de cálculo y a continuación descargar fácilmente el experimento al software que será ejecutado por el controlador 114. En situaciones en que se

desea la dispensación "combinatoria", más que un dispensador, se puede utilizar un sistema colector, o una combinación de los mismos para facilitar la eficiencia del proceso. Las configuraciones que emplean múltiples distribuidores pueden ser operadas en paralelo o en coordinación sincrónica.

5 Funcionamiento

10 Conceptualmente, el sustrato 111 sobre el cual se encuentra el conjunto de células que se va a formar y sobre la cual se van a realizar los ensayos de diagnóstico se divide en filas (eje X) y columnas (eje Y) que tienen una resolución predeterminada en términos de un número de ubicaciones objetivo por distancia lineal "d". Por lo tanto, una distancia lineal d igual a una pulgada (2.54 cm) del sustrato 111 que se desplaza a lo largo de un eje puede, por ejemplo, contener 100-500 o más posiciones objetivo direccionables individualmente. Cada posición objetivo correspondería a un número de incrementos del motor paso a paso del eje X 123 y un número de incrementos del motor paso a paso del eje Y 124 en relación con una posición "cero" predeterminada.

15 Debido a que cada ubicación objetivo tiene una dirección exclusiva, el controlador 114 es capaz de seleccionar con precisión una o varias localizaciones objetivo concretas en las que se pueden dispensar cantidades predeterminadas o gotitas de una suspensión celular o reactivo (s) de ensayo. En una forma de realización, un patrón preferido de movimiento de dispensación con relación al sustrato 111 disminuye ventajosamente el tiempo para completar una operación de dispensación particular. Al ejecutar un primer paso lineal a lo largo de una primera fila, el cabezal dispensador 128 invierte la dirección y ejecuta un segundo paso a lo largo de una segunda fila adyacente. Dicha distribución bidireccional disminuye ventajosamente el tiempo requerido para completar una operación de dispensación en comparación con una operación de dispensación unidireccional. También se prevé que para la dispensación no secuencial o intermitente el controlador 114 aceleraría la operación enviando el cabezal dispensador 128 directamente a o adyacente a la siguiente posición objetivo deseada sin completar necesariamente cada paso sucesivo o cada fila intermedia.

30 Las coordenadas de las ubicaciones objetivo pueden ser utilizadas por el sistema de formación de imágenes que puede desplegarse rápidamente a, una posición X-Y particular sobre el sustrato 111 y detectar la reacción, si se produce, entre el (los) reactivo (s) de ensayo y el (los) analito (s) predeterminado (s) para cada célula dentro de las muestras de células discretas que forman el conjunto de células. Se podrá apreciar que el sistema de formación de imágenes también puede explorar la presencia de una reacción en múltiples posiciones Z dentro de una célula determinada. La disposición de las células sustancialmente en una monocapa facilita no sólo el acceso del reactivo o reactivos de ensayo a cada célula, sino también la detección de cualquier reacción por el sistema de formación de imágenes.

40 Tal como se describe más detalladamente en la Patente No. US 6,576,295, el aparato dispensador 108 puede operar para dispensar cantidades relativamente grandes del mismo reactivo en un modo de dispensación continuo, en el que la bomba de jeringa 120 se ajusta a un caudal prescrito para suministrar una cantidad dosificada predeterminada de reactivo expresado como volumen por unidad de tiempo. Por ejemplo, el caudal podría programarse para entregar 1 µl por segundo. La bomba de jeringa 120 bombeará entonces el reactivo a la válvula solenoide 204 a la velocidad predeterminada. Al abrir y cerrar la válvula 204 durante este flujo, se formarán gotitas de acuerdo con el tiempo de abertura y la frecuencia de funcionamiento de la válvula 204. De este modo, en el modo de dispensación continua, el aparato dispensador 108 no sólo es capaz de proporcionar precisión en el caudal de reactivo, sino que la administración se puede llevar a cabo con control independiente de la velocidad de la plataforma X-Y-Z 112, la concentración de reactivo por unidad de longitud y el tamaño de gotita. El modo de dispensación continua puede ser particularmente útil para un gran número de sustratos, cada uno de los cuales tiene patrones idénticos de controles positivos y negativos, a los que se pueden añadir muestras de pacientes o de ensayo en un momento posterior. Este modo de dispensación también se conoce como dispensación "al vuelo".

55 El aparato dispensador 108 también puede operar en modo de dispensación de puntos, en el que se pueden dispensar gotitas individuales en posiciones preprogramadas. Esto puede lograrse sincronizando la válvula solenoide 204 y la bomba de jeringa 120 con la plataforma X-Y-Z 112. La bomba de jeringa 120 se incrementa para generar una onda de presión hidráulica. La válvula solenoide 204 está coordinada para abrirse y cerrarse en tiempos predeterminados con relación al incremento de la bomba 120. La válvula 204 puede inicialmente abrirse antes o después de que se incremente la bomba 120. Mientras la válvula 204 está abierta, la onda de presión empuja un volumen de fluido por la boquilla 205 formando una gotita en el orificio de salida en el momento de la amplitud de presión máxima. La gotita tendrá un tamaño determinado por el volumen incremental proporcionado por la bomba de jeringa 120. Dicha gota será dispensada sobre el sustrato 111 sin la necesidad de que la boquilla 205 contacte con el sustrato 111. Este modo de dispensación se denomina a veces modo de "paso y repetición".

65 En otra forma de realización más, el aparato dispensador 108 funciona en modo de aspiración y dispensación. En este modo, cantidades precisas de fluido, suspensión celular o reactivo de ensayo son

aspiradas, es decir, "succionadas" desde una fuente 175, tal como, por ejemplo, una microplaca. Particularmente cuando el aparato dispensador 108 está dispensando células al sustrato 111, el modo de aspiración y de dispensación puede mezclar la suspensión de células para formar una suspensión sustancialmente homogénea dentro del depósito de fuente 175 antes de la aspiración desde el depósito de fuente 175 sobre el sustrato 111. El dispensador 128 puede ser una simple boquilla o aguja o, más preferiblemente, puede ser un dispensador de válvula solenoide 204. La bomba de jeringa 120 y el dispensador 128 están preferiblemente sincronizados o coordinados con la plataforma móvil X-Y-Z 112. El mismo dispensador 128 puede utilizarse además para aspirar uno o más reactivos de ensayo precisamente en los mismos lugares que las suspensiones celulares. Se puede implementar un ciclo de lavado en el proceso para limpiar el dispensador 128 con el fin de minimizar la posibilidad de contaminación.

Generalmente, la bomba de jeringa 120 se llena con un fluido de lavado, como por ejemplo agua destilada. La punta 205 del dispensador 128 es colocada en el depósito de fuente de suspensión de células 175 y la bomba de jeringa 120 se decreta para extraer una cantidad precisa y medida de la suspensión de células en la punta 205 del dispensador 128. En general, sólo es deseable aspirar un pequeño volumen de suspensión de células en la punta 205 del distribuidor de válvula solenoide 128 de modo que la suspensión de células no pase a la válvula 204. La bomba de jeringa 120 se incrementa entonces para dispensar una cantidad precisa de la suspensión celular en un lugar predeterminado sobre el sustrato 111. La suspensión celular restante puede dispensarse a la siguiente posición predeterminada o dispensarse en un receptáculo de desechos junto con una cantidad predeterminada del lavado. Esto asegura que la muestra de suspensión de células no se diluye con el líquido de lavado y la suspensión de células es aclarada después de cada modo de aspiración y dispensación. Puede ser necesario repetir algunos o todos los pasos de mezclar, aspirar, transportar, dosificar y dispensar, con el fin de conseguir un conjunto de células que tenga las dimensiones deseadas. Una vez que el conjunto de células se forma de esta manera, el dispensador 128 es capaz de mezclar, aspirar y dispensar uno o más reactivos de ensayo a la pluralidad de muestras de células discretas que comprenden el conjunto de células según sea necesario o deseado siguiendo sustancialmente el mismo proceso.

En otra forma de realización preferente, descrita con mayor detalle en la solicitud de patente pendiente número US 60/359.471, presentada el 22 de febrero de 2002, publicada con la publicación internacional N° WO 03/072258 de 4 de septiembre de 2003, se pueden dispensar gotitas de la suspensión de células utilizadas para formar el conjunto de células y/o gotitas de los reactivos de ensayo utilizados para realizar los ensayos de diagnóstico debajo de la superficie de un fluido de cobertura utilizando los dispositivos dispensadores sin contacto descritos en el presente documento. Un sustrato que tiene un líquido de cobertura minimiza la evaporación de reactivos de prueba valiosos utilizados en el ensayo de diagnóstico. Dispensar los reactivos a través de un líquido de cobertura también tiene la ventaja, en el caso de reactivos miscibles, de proporcionar la acción de mezcla del reactivo de ensayo y objetivo como resultado de la velocidad de la gota a medida que pasa a través del fluido de cobertura.

#### 40 Plataforma

La plataforma X-Y-Z 112 puede incluir uno o más motores paso a paso de posición 123, 124, 125 o similares, que son operables para mover el distribuidor 128 y/o la plataforma X-Y-Z 112 entre sí en las direcciones X, X-Y, y/o X-Y-Z. El controlador 114 está adaptado para recibir datos representativos de un patrón de distribución deseado y para proporcionar una primera, segunda y tercera señales para provocar un movimiento relativo entre el sustrato 111 y el dispensador 128 mientras simultáneamente hace que el dispensador 128 distribuya las gotitas (que contienen suspensión celular o reactivo de ensayo) en uno o más lugares deseados sobre el sustrato 111 para formar los patrones deseados.

Además, se pueden utilizar uno o más brazos de robot, de acuerdo con la necesidad o el deseo, para proporcionar movimiento relativo controlado entre el dispensador 128 y el sustrato 111 y/u otros componentes del aparato dispensador 108. Además, en algunas formas de realización, la plataforma 112 está adaptada para proporcionar calentamiento a posiciones predeterminadas sobre el sustrato 111 para facilitar los ensayos de diagnóstico que pueden requerir una fuente de calor, por ejemplo PCR, con el fin de funcionar eficazmente. También se puede utilizar calor para aumentar la cinética de hibridación, por ejemplo, en un ensayo FISH. Los métodos y dispositivos para proporcionar una fuente de calor a un lugar predeterminado en una plataforma son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, alfileres calentados, calentadores de película delgada y similares) y pueden ser incorporados en el aparato dispensador 108 descrito en el presente documento con relativa facilidad.

El sistema de aparato dispensador 108 no está limitado a un único dispensador 128. En algunas formas de realización, se contempla que se utilicen distribuidores múltiples en matrices lineales (1xN) o bidimensionales (MxN). Dichos dispensadores múltiples pueden proporcionarse y operarse en paralelo o de otra manera coordinada, según se desee. Debe entenderse que cualquier descripción en el presente documento con referencia específica a una realización de dispensador único es sustancialmente igualmente aplicable con posibles modificaciones evidentes para los expertos en la técnica, a formas de realización que

tienen múltiples dispensadores conectados cada uno dispositivos de bombeo respectivos o un único dispositivo de bombeo.

5 En otra forma de realización más, se pueden disponer múltiples sustratos sobre la plataforma X-Y-Z 112 para permitir que se generen simultáneamente múltiples matrices de células. En dicha forma de realización, múltiples dispensadores pueden ser movidos o accionados de forma independiente conjuntamente en forma de un cabezal dispensador que comprende múltiples canales de distribución separados entre sí por distancias predeterminadas. Además, los dispensadores pueden ser operados individualmente (en serie o secuencialmente) o sustancialmente de forma simultánea, por ejemplo, en paralelo, o en cualquier combinación según sea necesario. Un controlador principal, posiblemente junto con subcontroladores, se utiliza para controlar y coordinar las actuaciones del dispositivo de bomba y el movimiento relativo entre el sustrato objetivo y los canales de distribución. Ciertas formas de realización de un sistema de dispensación de aspiración multicanal que comprende un colector de canales de dispensación múltiples se describen más completamente en la solicitud de patente pendiente nº 09/372,719, presentada el 11 de agosto de 1999, titulada MULTI-CHANNEL DISPENSING SYSTEM (SISTEMA DE ADMINISTRACIÓN MULTI-CANAL).

20 En otra forma de realización más, se proporcionan uno o más sensores de presión junto con el dispositivo aspirador-dispensador 108 para monitorizar la presión del sistema y proporcionar información de diagnóstico sobre diversos parámetros de fluido y flujo dentro del sistema hidráulico. Los uno o más sensores de presión se colocan entre la (s) bomba (s) de jeringa 120 y el (los) dispensador (es) 128, tal como, por ejemplo, en la línea de suministro. 150, 152. Alternativamente, o adicionalmente, el o los sensores de presión pueden situarse en el (los) dispensador (es) 128, tal como, por ejemplo, en la (s) parte (s) de válvula 204.

25 Conjuntos de células

30 Los conjuntos de células generados utilizando el aparato dispensador 108 descrito en el presente documento pueden formarse con volúmenes de gotita tan pequeños como aproximadamente 1 nL, 5 nL, 10 nL, 25 nL o 50 nL. Habitualmente, los volúmenes de gotitas pueden oscilar entre aproximadamente 1. nL y aproximadamente 500 nL, aunque los volúmenes de gotita preferidos oscilan entre aproximadamente 100 nL y aproximadamente 500 nL; los volúmenes de gotita más preferidos oscilan entre aproximadamente 100 nL y aproximadamente 250 nL. Este pequeño volumen de gotas permite que múltiples muestras de células discretas se apliquen a un único sustrato 111, como por ejemplo una placa de microscopio, de modo que entre aproximadamente 1-5, 5-10, 10-100, 500-1000 o más, muestras discretas, incluyendo una combinación de muestras de pacientes y control, pueden formarse sobre el sustrato único 111. El pequeño volumen de muestra también reduce significativamente la cantidad de reactivo de prueba que es necesaria para el diagnóstico, lo que disminuye adicionalmente el coste global de realizar el ensayo de diagnóstico mientras que al mismo tiempo aumenta la fidelidad de los resultados del ensayo de diagnóstico porque las muestras de paciente y de control pueden procesarse en condiciones idénticas. El (los) reactivo (s) de ensayo utilizado (s) con la presente invención se puede (n) dispensar en los mismos volúmenes de gotitas previamente descritos para volúmenes de gotitas de muestras de células.

45 La velocidad habitual a la que se dispensa una gotita desde el dispensador puede variar desde aproximadamente 1 m/s hasta aproximadamente 4 m/s, lo cual es suficiente para dispensar el reactivo (ya sea suspensión celular o reactivo de ensayo) sin causar salpicaduras. Adicionalmente, este intervalo de velocidades puede ser suficiente para provocar la mezcla en aquellas formas de realización en las que se distribuye un reactivo de ensayo a través de un fluido de cobertura en un lugar particular del sustrato. Otras velocidades pueden ser usadas según necesidad o deseo.

50 Es frecuentemente deseable tratar la suspensión de células para minimizar el agrupamiento y/o la lisis de las células antes de dispensar las células sobre el sustrato 111. Un método para minimizar el aglomerado y/o la lisis de la suspensión celular es reemplazar el medio de la suspensión celular con un disolvente, tal como, por ejemplo, etanol, metanol, propanol, ácido acético o cualquier combinación de los mismos. La sustitución de los medios de la suspensión de células con alcohol o similares también facilita la distribución uniforme de las células dispensadas sobre el sustrato, ayudando de este modo a la formación de una monocapa sustancial sobre el sustrato 111. Habitualmente, la sustitución de los medios celulares implica pasos en serie de las células a través de soluciones que tienen concentraciones crecientes de alcohol hasta que se alcanza la concentración deseada de células y alcohol. Se puede utilizar cualquier disolvente siempre que no perturbe la integridad de las células ni interfiera con la capacidad del (de los) reactivo (s) de ensayo para interactuar con el (los) analito (s) predeterminado (s). Se prefiere el alcohol porque ayuda a minimizar la superposición de células y se evapora rápidamente. Habitualmente, las células se hacen pasar a través de concentraciones crecientes de alcohol que varían de aproximadamente 35% a aproximadamente 65%, aunque se pueden utilizar concentraciones de alcohol fuera de este intervalo según sea necesario o deseado.

Habitualmente, las suspensiones celulares que se van a disponer en un conjunto que comprende una pluralidad de muestras de células discretas sobre un único sustrato 111 son transferidas desde una fuente 175, tal como, por ejemplo, una o más microplacas. Con el fin de volver a suspender las células que pueden haberse asentado antes de la dispensación sobre el sustrato 111, la suspensión celular puede mezclarse para formar una población sustancialmente homogénea de células dentro de la fuente 175. Habitualmente, la mezcla se consigue colocando la punta del dispensador. 205 en la fuente 175 y realizando varios pequeños ciclos de aspiración/dispensación dentro de la fuente 175.

Dependiendo de la densidad de las células dentro de la suspensión, puede ser deseable diluir las células antes de dispensar sobre el sustrato. Es preferible dispensar las células de modo que la distancia entre células adyacentes en cada muestra discreta sea de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 micras. También es preferible dispensar entre aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 células por muestra discreta para proporcionar análisis estadísticamente relevantes. Habitualmente una gota de 100 nL de células separadas alrededor de 100 micras se secarán en un área que tenga un diámetro de aproximadamente 1 mm. Por consiguiente, es preferible conseguir una densidad de suspensión celular de entre aproximadamente 200 y aproximadamente 1000 células por 100 nL. Los volúmenes de gota se pueden ajustar según sea necesario para proporcionar una distribución monocapa suficiente de células sobre el sustrato.

Generalmente, entre aproximadamente 200 a aproximadamente 400 células proporcionarán una población de muestra estadísticamente significativa a partir de la cual se puede realizar un diagnóstico preciso basado en el resultado del ensayo diagnóstico. La población de muestra puede configurarse tal como se ha descrito anteriormente, es decir, una muestra discreta de células que comprende entre aproximadamente 200 y aproximadamente 400 células en un solo punto sobre el sustrato. Alternativamente, la población de muestra puede configurarse como una pluralidad de muestras de células discretas, comprendiendo cada muestra un número menor de células que, cuando se analizan conjuntamente, comprenden una población estadísticamente significativa. Por ejemplo, una muestra de células discretas que comprende 200 células del paciente A sería equivalente a 10 muestras de células discretas, cada una de las cuales comprende 20 células del paciente A. Puede configurarse cualquier número de permutaciones y combinaciones para proporcionar una población total de células que, cuando se analiza, proporciona una población de muestra estadísticamente significativa a partir de la cual puede realizarse un diagnóstico preciso. En situaciones en las que es deseable reducir el número de células por muestra de células discretas, el volumen de la gotita que contiene las células puede ser reducido de forma similar.

Un conjunto de células típico formado sobre un único sustrato como se describe en el presente documento tendrá al menos una muestra de ensayo y al menos una muestra de control. Sin embargo, el conjunto de células pueden comprender hasta aproximadamente 1000 muestras de prueba y aproximadamente 100 muestras de control. Se prefiere un conjunto de células que comprende entre aproximadamente 10 y aproximadamente 100 muestras de ensayo y entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 muestras de control. También se pueden utilizar otras configuraciones que tienen entre aproximadamente 1-5, 5-10, 10-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-500 o más muestras de ensayo con entre aproximadamente 1-5, 5-10, 10 -20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-500 o más muestras de control. Puede formarse cualquier combinación de muestras de ensayo y muestras de control, limitada solamente por las dimensiones físicas del sustrato, el volumen de las gotitas que se va a dispensar sobre el sustrato y la distancia deseada entre cada muestra de células discretas.

Un conjunto de células típico formado sobre un solo sustrato tal como se describe en el presente documento puede ser explorado con al menos un reactivo de ensayo o un múltiplo de reactivos de ensayo en cada muestra de células discretas. Un experto en la técnica apreciará que se puede utilizar cualquier número de reactivo (s) de ensayo por cada muestra de células discreta, según sea necesario o deseado, hasta la capacidad del sistema de formación de imágenes para detectar la reacción entre el (los) reactivo (s) y el analito predeterminado de las células. Habitualmente, los reactivos de ensayo se dispensan en gotas con volúmenes que varían de aproximadamente 1 nL a aproximadamente 1  $\mu$ L, aunque se prefieren volúmenes entre aproximadamente 50 nL a aproximadamente 500 nL y entre aproximadamente 100 nL y aproximadamente 250 nL.

Se llevan a cabo análisis citogenéticos típicos sobre una pluralidad de células tomadas de la misma fuente, por ejemplo, el mismo paciente o línea celular. Además de los métodos descritos en el presente documento, un conjunto de células adecuado para análisis citogenético puede estar formado como una pluralidad de muestras discretas en las que la distancia entre las muestras de células discretas se minimiza de tal manera que el perímetro exterior de cada muestra de células discretas sea contiguo al perímetro de una muestra de células discretas contiguas. Por ejemplo, un volumen de gotita de suspensión celular de aproximadamente 50 nL con una distancia entre muestras de células discretas de aproximadamente 500 micras resultará en un conjunto de células en la que el perímetro exterior de cada muestra de células discretas será contiguo al perímetro de muestras de células discretas adyacentes. Del mismo modo, es posible lograr la misma configuración aumentando el volumen de gota de la suspensión celular y la separación entre las muestras de células discretas, por ejemplo, proporcionando un volumen de gota de

suspensión celular de aproximadamente 400 nL y una distancia entre aproximadamente 1000-1200 micrones entre muestras de células discretas. Esta configuración, en la que el perímetro exterior de cada muestra de células discreta es contigua al perímetro de una muestra de células discreta adyacente, da como resultado un conjunto de células dispuestas sustancialmente en una monocapa que cubre una parte sustancial del sustrato 111. Una ventaja de formar el conjunto de células utilizando los procedimientos descritos en el presente documento es que el aparato dispensador de precisión de alta velocidad facilita la colocación exacta de las células sobre el sustrato y la disposición concomitante de las células sustancialmente en una monocapa. Una región de control puede no ser necesaria en el sustrato cuando un conjunto de células está destinado a ser utilizado para análisis citogenéticos.

#### Sustrato

Las matrices de células de la presente invención pueden estar formadas sobre una variedad de sustratos 111. Un sustrato preferido es una placa de microscopio de vidrio, pero pueden usarse otros sustratos, tales como, por ejemplo, membranas de nitrocelulosa, membranas de nylon y membranas de plástico con resultados igualmente eficaces. En algunas formas de realización, el sustrato, generalmente una membrana de nylon, se puede alimentar continuamente desde un rollo. En algunas formas de realización, la superficie del sustrato se puede recubrir con un modificador de superficie que facilita la disposición de las células sustancialmente en una monocapa. Los modificadores de superficie adecuados incluyen, pero no se limitan a, poli-L-lisina, aminos, estreptavidina, epoxi, películas metálicas delgadas, materiales dieléctricos y similares.

En una forma de realización, tal como se muestra en la FIG. 2, el sustrato 111 comprende tres regiones separadas, una región de código de barras 275, una región de control 285 y una región de prueba 295. La región de código de barras 275 está diseñada para alojar un código de barras que identifica de forma exclusiva cada sustrato particular 111. Además, la región de código de barras 275 puede alojar un código de barras de "distribución y bloqueo", que sirve como una característica de seguridad para asegurar que el sustrato particular 111 funcionará solamente en conjunción con el aparato dispensador 108 descrito en este documento. Alternativamente, o además, la región de código de barras puede acomodar un código de barras de seguimiento de placas que sirve para identificar la placa en particular. Los códigos de barras pueden imprimirse o disponerse de otro modo sobre la región de código de barras del sustrato de acuerdo con métodos conocidos en la técnica.

La región de control 285 sobre el sustrato 111 puede contener cualquiera o de ellas o ambas muestras de células positivas y negativas en cualquier combinación. Las muestras de células discretas 287 en la región de control 285 se disponen sustancialmente en una monocapa, es decir, se dispersan de forma relativamente uniforme con solapamiento suficientemente mínimo, de tal manera que un sistema de formación de imágenes pueda inspeccionar de manera precisa y rápida la morfología tridimensional de las células y detectar la señal resultante de la interacción de un reactivo de ensayo y un analito u objetivo predeterminado dentro de la célula. La disposición de las muestras de control positivas y negativas sobre el mismo sustrato 111 que las muestras de la prueba o del paciente aumenta la fidelidad general de los ensayos de diagnóstico realizados en el conjunto de células resultante porque las muestras de ensayo 297 se procesan de la misma manera y sobre el mismo sustrato 111 que las muestras de control. 287. La región de control 285 puede configurarse para alojar tan sólo una muestra de control. 287 (que puede ser un control positivo o negativo) o por encima de 1000 muestras de control 287 según sea necesario o deseado. En algunas formas de realización, puede ser deseable formar una región de control que tenga entre aproximadamente 1-5, 5-10, 10-20, 20-50, 50-75, 75-100, 100-200, 200-500 o más muestras de control discretas, que pueden ser cualquier combinación de controles positivos y negativos. preferentemente, sin embargo, la región de control 285 aloja entre aproximadamente 2 a aproximadamente 20 muestras de células discretas 287, que puede ser cualquier combinación de controles positivos y negativos, según sea necesario o deseado. Las muestras de células discretas 287 pueden, en algunas formas de realización, ser utilizadas como una fuente de datos a partir de la cual se puede generar una curva estándar para su uso con el ensayo de diagnóstico siempre que las emisiones resultantes de la interacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado sean capaces de ser cuantificadas.

La región de prueba 295 sobre el sustrato 111 puede alojar muestras de pacientes o de prueba 297. Al igual que en la región de control 285, las muestras de células discretas 297 en la región de prueba 295 están dispuestas sustancialmente en una monocapa. Un experto en la técnica apreciará que las células discretas. 297. que comprende la región de prueba 295 (y/o la región de control 285) pueden ser todas iguales, es decir, múltiples muestras obtenidas de la misma muestra de paciente (o línea celular), en cuyo caso el conjunto de células puede utilizarse para determinar la presencia o ausencia de una variedad de analitos u objetivos predeterminados. Alternativamente, las muestras discretas 297 que comprenden la región de ensayo 295 pueden ser de una pluralidad de muestras de pacientes (o líneas celulares) que a continuación pueden ponerse en contacto con los mismos o diferentes reactivos de ensayo con el fin de procesar simultáneamente una multitud de muestras de pacientes. Tal como resulta evidente para un experto en la técnica, pueden utilizarse numerosas combinaciones de muestras de pacientes (o líneas celulares) conjuntamente con cualquier combinación numérica de reactivos de ensayo.

En otra forma de realización, que se ilustra en la FIG. 2, la región de control 285 y la región de prueba 295 del sustrato 111 pueden cubrirse con una capa hidrófoba 300. La capa hidrófoba 300 sirve para contener cada muestra particular de células discretas 287, 297 en un lugar predeterminado sobre el sustrato 111. La capa hidrófoba 300 tiene una pluralidad de aberturas que pasan sustancialmente a través de la capa hidrófoba 300 a la superficie del sustrato 111. Los modificadores de superficie descritos anteriormente también pueden usarse conjuntamente con la capa hidrófoba. Habitualmente, el diámetro de la abertura varía de aproximadamente 250 micras a aproximadamente 4000 micras. Una abertura de aproximadamente 250 micras puede acomodar un volumen de hasta aproximadamente 5 nL, mientras que una abertura de aproximadamente 4000 micras puede acomodar un volumen de hasta aproximadamente 3  $\mu$ L. El diámetro de la abertura, y los volúmenes dispensados efectivamente en cada abertura es en gran medida una forma de preferencia. Del mismo modo, el número de aberturas es en gran medida una cuestión de preferencia, y casi cualquier configuración es posible, incluyendo, por ejemplo, 5, 10, 15, 25, 50, 100, 105, 200, 250, 500 o más aberturas. Para algunas aplicaciones, puede ser preferible configurar el sustrato con una serie de aberturas que son algún múltiplo de 96, que es el número común de pocillos en una placa de microtitulación. El procedimiento mediante el cual se puede aplicar una capa hidrófoba a la superficie de los sustratos es bien conocido en la técnica.

En otra forma de realización más, las muestras de células discretas 287 de la región de control 285 son sondeadas con una combinación de reactivos de ensayo capaces de reaccionar con un analito predeterminado dentro de las células que comprenden el conjunto. La interacción entre el reactivo de prueba y el analito predeterminado habitualmente da como resultado una señal, es decir, fluorescencia, que puede ser detectada por un sistema de formación de imágenes. La señal detectable puede dar como resultado un patrón exclusivo denominado "código de barras biológico" que identifica de forma exclusiva un sustrato particular 111. El código de barras biológico sirve como una característica de seguridad adicional porque, en contraste con un código de barras tradicional impreso en el sustrato 111, el código de barras biológico es una medida de la integridad de las condiciones bajo las cuales se ha almacenado el sustrato 111. Es decir, dado que el código de barras biológico está compuesto por una pluralidad de células de control que han sido probadas con una pluralidad de reactivos de ensayo idénticos a los reactivos de ensayo en la región de prueba 295 del sustrato 111, los eventos que destruirían la integridad de la región de ensayo 295 también destruirían probablemente la integridad del código de barras biológico.

El código de barras biológico puede formarse, por ejemplo, dispensando 10 muestras de células discretas 287 en la región de control 285 y sondeando cada muestra 287 con una combinación de tres reactivos de ensayo positivos que resultan en  $1 \times 10^4$  combinaciones diferentes (es decir, cada muestra discreta puede tener una de cuatro condiciones: no sondeada, sondeada con 1 reactivo de ensayo, sondeada con 2 reactivos de ensayo y sondeada con 3 reactivos de ensayo). Las combinaciones de reactivos de ensayo dispensados pueden ser aleatorizadas. Tal como se apreciará, el aumento del número de reactivos de ensayo y/o del número de muestras de células discretas 287 aumenta exponencialmente el número de posibles combinaciones, que pueden seleccionarse de acuerdo con la necesidad o el deseo.

#### Ejemplo 1 - Conjunto de células. Formación

Para realizar pruebas de diagnóstico clínico en varias muestras de pacientes simultáneamente, a menudo es deseable mapear (replicar o transformar) uno o más conjuntos de microplacas en un conjunto de células de alta densidad de muestras de células discretas dispuestas sustancialmente en una monocapa sobre un solo sustrato. El sustrato que contiene el conjunto de células puede someterse a continuación a cualquier número de pruebas de diagnóstico clínico que dependen de la detección de una reacción entre un reactivo de ensayo y un analito predeterminado dentro de las células del conjunto, particularmente ensayos de diagnóstico que se benefician de una distribución uniforme de las células.

En un ejemplo, se formaron muestras de tres líneas celulares, CaSki, HeLa y T24, en un conjunto de células dispuestas sustancialmente en una monocapa sobre un solo sustrato. El conjunto de células se formó con 4 muestras de células discretas de cada una de las 3 líneas celulares, es decir, el conjunto de células contenía 12 muestras de células discretas. Antes de formar el conjunto de células, las líneas celulares tenían una concentración inicial de 0.5 células/nL. El número de células dispensadas a cada muestra de células discretas se esperaba que oscilase entre aproximadamente 50 y aproximadamente 400 células distribuidas en volúmenes de gotas que oscilaba entre aproximadamente 10 y 80 nL.

Las muestras de células se trataron para evitar el agrupamiento y la lisis antes de la formación del conjunto de células. Específicamente, las muestras de células se centrifugaron y se resuspendieron en una solución de metanol al 50% hasta un volumen total de 150  $\mu$ L. Se dejó que las células se equilibraran en la solución de metanol al 50% durante aproximadamente 20 minutos antes de la dilución en metanol absoluto hasta un volumen final de 450  $\mu$ L, resultando una concentración final de entre aproximadamente 40-50 células por 10 nL.

Se escribió un archivo de texto instruyendo al aparato dispensador a aspirar desde un depósito fuente, medir y dispensar sucesivamente 10, 20, 40 y 80 nL de gotitas de las células en 50 placas de vidrio. Antes de la aspiración, se mezcló cada una de las suspensiones celulares. La solución de refuerzo en el depósito de fluido era etanol, y se usó metanol como solución de lavado.

5

El conjunto de células 4x3 se formó en cada uno de dos conjuntos de 50 placas de vidrio. La distancia de centro a centro entre las gotitas sucesivas del mismo reactivo era de 5 mm, y la distancia de centro a centro entre gotitas de diferentes reactivos (con el mismo volumen) era de 10 mm. Las matrices de células resultantes se inspeccionaron visualmente. Cada una de las 12 muestras de células discretas estaba dispuesta sustancialmente en una monocapa en las placas de vidrio.

10

En otro ejemplo, es posible mapear cuatro placas de 96 pocillos que tienen separaciones de pozos de centro a centro de 9 mm en un conjunto de 384 puntos sobre un único sustrato que tiene separaciones de centro a centro en el intervalo de aproximadamente 1500 micras y un volumen de punto de entre aproximadamente 1000 y aproximadamente 1200 micras. Una forma de generar dicha agrupación de células es operar sucesivamente un cabezal dispensador a la vez de un dispensador de 8 cabezales con una separación de 9 mm de centro a centro usando un modo de dispensación de línea en sincronización con una gran separación entre las gotas. Un sustrato típico sobre el que se forma un conjunto de células es una lámina de microscopio de vidrio estándar de 25x75 mm. Uno puede contener un conjunto de 50 placas de vidrio sobre una plataforma X-Y y operar cada uno de los 8 cabezales dispensadores en sucesión para producir gotitas con una separación en el intervalo de 1.5 mm en cada placa en la misma posición. Los otros 7 cabezales dispensadores pueden ser operados en sucesión lineal con pequeños desplazamientos para producir un conjunto de 8 gotitas en la placa de vidrio con una pequeña separación de entre aproximadamente 100-1000 micras entre las gotitas. Debe observarse que esta operación se puede hacer utilizando un cabezal de dispensación a la vez, o más preferiblemente, usando todos los 8 cabezales dispensadores en rápida sucesión con pequeños retardos para proporcionar la separación lineal deseada. Repitiendo esta función para las cuatro microplacas y utilizando compensaciones adecuadas, se pueden asignar cuatro microplacas en un solo conjunto 384 en cada placa de vidrio. En este caso, el mapa sería una réplica miniaturizada de cada placa de 96 pocillos dispuestas en un conjunto de 4x4.

15

20

25

30

El dispensador también puede programarse para transformar uno o más conjuntos de microplacas en un conjunto nuevo o diferente de alta o baja densidad. Por ejemplo, una serie de matrices bidimensionales puede ser transformada en filas o columnas o un conjunto de alta densidad más grande, o las matrices pueden ser transpuestas o invertidas. Otros modos y variaciones para el uso y el funcionamiento de la invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica.

35

#### Ejemplo 2 Dispensación a Través de un Fluido de Cobertura

Algunas formas de realización descritas en la presente memoria se refieren en general a la administración de gotitas y en particular a métodos para mezclar, aspirar, transportar, dosificar y dispensar gotitas de suspensión celular o reactivo de ensayo por debajo de la superficie de un fluido de cobertura utilizando sin poner en contacto el dispensador con la superficie del fluido de cobertura con el fin de realizar un ensayo celular o llevar a cabo un ensayo de diagnóstico. De forma ventajosa, se evita o se reduce sustancialmente la evaporación de reactivos de ensayo y muestras de células valiosos utilizando un fluido de cobertura. Otra ventaja, en el caso de los reactivos miscibles, es que las velocidades de gotitas proporcionan un buen mezclado. Otra ventaja adicional es que, en el esquema de dispensación sin contacto, la boquilla o punta no está sumergida en el fluido de cobertura, facilitando de este modo la limpieza.

40

45

Se puede utilizar aceite mineral como fluido de cobertura sobre el conjunto de células. El aceite mineral se utiliza frecuentemente como una barrera de la evaporación. Habitualmente, el conjunto de células se forma sobre el sustrato, y se dispensa aceite mineral para cubrir las muestras de células discretas. De esta manera, en una forma de realización, los reactivos de ensayo se dispensan a través del aceite mineral. Un experto en la técnica apreciará que las gotas de reactivos se pueden distribuir a través de un fluido de cobertura siempre que la densidad de las gotas sea mayor que la densidad del fluido de cobertura. Por ejemplo, se pueden dispensar gotas de 100 nL de reactivo (s) de ensayo a través de una capa de cubierta de aceite mineral sobre las muestras de células discretas del conjunto. En algunas formas de realización, es posible calentar selectivamente las muestras de células discretas después de que el o los reactivos de ensayo se hayan distribuido a través del aceite mineral, aumentando de esta manera la cinética de la interacción entre el reactivo de ensayo y el analito predeterminado, lo que puede aumentar la velocidad con la que se puede realizar el ensayo de diagnóstico.

50

55

60

#### Ejemplo 3 Análisis de Hibridación in Situ Fluorescente

En otra forma de realización de la invención, los conjuntos de células se forman replicando uno o más conjuntos de microplacas en o sobre un conjunto de alta densidad sobre un sustrato, tal como, por ejemplo, una placa de vidrio. Se colocó una suspensión celular que contenía preparaciones citogenéticas de 104 cultivos celulares diferentes en una placa de 384 pocillos. La densidad de la suspensión celular fue de

65



5 aproximadamente  $1 \times 10^8$  células/ml. Aproximadamente 500-1000 células fueron mezcladas, aspiradas, transportadas, dosificadas y dispensadas a través del aparato dispensador sobre la placa de vidrio. El aparato dispensó un volumen de gota de 100 nL. Las células que comprendían el conjunto formado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria se contaron y se confirmó que estaban dispuestas sustancialmente en monocapa sobre el sustrato.

10 Además, las matrices de células formadas de acuerdo con los métodos descritos en este documento se sometieron a análisis FISH utilizando varias sondas de ADN disponibles comercialmente, incluyendo CEP3, CEP7, CEP17, 9p21, X e Y (Vysis, Inc., Downers Grove, IL). Las sondas CEP reconocen las secuencias de ADN específicas de cromosomas de ADN de satélite humano altamente repetido, identificación de células en interfase y metafase. Todas las sondas se utilizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vysis, Inc., Downers Grove, IL). Las placas se analizaron utilizando el sistema de hibridación HYBrite de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Vysis, Inc., Downers Grove, IL).

15 El conjunto de células formada fue altamente susceptible al análisis de FISH. Los resultados fueron comparables o superiores a las técnicas estándar de hibridación y análisis. El análisis de los cromosomas X e Y mostró una concordancia del 100% con los resultados esperados y se observó menos del 1% de contaminación del cromosoma Y en cualquier preparación única que contenía células XX. Las características subcelulares individuales permanecieron distintas, incluso después del ensayo FISH, y las células del conjunto permanecieron adheridas a la superficie de la lámina de vidrio durante el procedimiento FISH.

Ejemplo 4 Análisis de Inmunohistoquímica

25 El aparato dispensador descrito en el presente documento se utilizó para dispensar un conjunto de células de una sola hilera en metanol sobre una placa de vidrio que se sometió adicionalmente a análisis de inmunohistoquímica (IHC) según técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Específicamente, 500-1000 células de cada una de cuatro líneas de células que se utilizan habitualmente por los laboratorios de referencia para diagnosticar cáncer de mama se distribuyeron en una disposición de una sola hilera aproximadamente a 15 mm del extremo de la placa de vidrio. Se utilizaron las siguientes líneas celulares: MCF7, que es positivo para receptor de estrógeno; T47D, que es positivo para el receptor de progesterona; BT474, que sobreexpresa Her2; y K562, que es un control negativo.

35 Una vez formada el conjunto de células, la lámina de vidrio se deshidrató y se fijó durante 1 hora en una solución de formalina. Después de la fijación, el conjunto de células se embebió en parafina sumergiendo el extremo de la placa que comprende el conjunto de células en cera de parafina de grado histológico durante 2 minutos. El exceso de cera se eliminó de la superficie de la lámina de vidrio con un bisturí. El conjunto de células en la placa de vidrio se desparafinizó y se sometió a técnicas estándar de recuperación de antígenos antes de cargarse en un instrumento BenchMark® (Ventana Medical Systems, Inc. Tucson, AZ) para el análisis IHC automatizado. Los resultados se resumen en la siguiente tabla.

	<u>Expresión de Receptor de estrógeno</u>	<u>Expresión de Receptor de progesterona</u>	<u>Expresión de Her2</u>
MCF7	alto	moderado	0+
T47D	bajo	alto	1+
45 BT474	bajo	bajo	3+
K562	ninguno	ninguno / bajo	0+

50 Los resultados son consistentes con los datos publicados, indicando que las matrices de células formadas de acuerdo con los métodos de la presente invención son adecuados para su utilización en IHC.

Ejemplo 5 Análisis Citogenético

5 Se preparó un conjunto de células para análisis citogenéticos en un área de 2 mm<sup>2</sup> en una placa de vidrio. Se mezclaron, aspiraron, transportaron, dosificaron y dispensaron una pluralidad de células de la misma fuente en un volumen de gota. de 400 nL. La distancia entre cada punto se minimizó a aproximadamente 0.5 mm Se observó una superposición de las gotitas dispensadas, lo que podría haber sido minimizado aumentando la distancia entre las gotas o disminuyendo el volumen de la gota. El conjunto resultante comprendía una población de células dispuestas sustancialmente en una monocapa y uniformemente dispersas a través de la placa de vidrio. Una vez generada el conjunto de células, la placa fue sometida a técnicas de bandas citogenéticas bien conocidas por los expertos en la técnica.

10 Los resultados indicaron que el conjunto de células producida utilizando el aparato dispensador descrito en este documento dio lugar a un conjunto con una densidad más consistente que la que se obtuvo utilizando técnicas tradicionales. Un técnico licenciado evaluó la morfología de las células de metafase contenidas en el conjunto y las comparó con células producidas por técnicas tradicionales; el técnico confirmó que el conjunto de células generada de acuerdo con los métodos y el sistema descritos en este documento era adecuada para el análisis citogenético.

## Reivindicaciones

1. Un método para formar un conjunto de células que comprende una pluralidad de muestras de células discretas en un único sustrato, comprendiendo el método las etapas de:
  - 5 (a) mezclar una suspensión de células en una fuente para obtener una distribución sustancialmente uniforme de las células dentro de la suspensión;
  - (b) aspirar la suspensión celular de la fuente;
  - (c) transportar de forma móvil la suspensión de células relativa al sustrato;
  - 10 (d) dosificar una cantidad predeterminada de la suspensión celular utilizando una bomba de desplazamiento positivo;
  - (e) dispensar una cantidad de la suspensión de células en un volumen entre aproximadamente 1 nL y aproximadamente 500 nL con una densidad de entre aproximadamente 200 a 400 células por cada 100 nL en forma de gotitas sobre el sustrato para formar una pluralidad de muestras de células discretas, en que el volumen de gota se ajusta para proporcionar una distribución monocapa de células en el sustrato; y
  - 15 (f) dispersar de forma relativamente uniforme las células en el sustrato con un solapamiento mínimo lo suficientemente bajo entre las células de cada muestra de célula discreta, en que la distancia entre las células de cada muestra de célula discreta se selecciona de manera que el perímetro externo de cada muestra de célula discreta esté separado de o contigua con el perímetro de una muestra discreta adyacente, en que cada muestra de célula discreta administrada ocupa una ubicación en el sustrato que tiene un diámetro de aproximadamente 1 mm o menos.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de:
  - 25 tratar la suspensión de células para minimizar el aglutinamiento y la lisis sustituyendo el medio de la suspensión celular con un disolvente antes de llevar a cabo la etapa (a).
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de repetir al menos las etapas (e)-(f) para formar el conjunto de células.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de repetir al menos las etapas (d)-(f) para formar el conjunto de células.
5. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de repetir las etapas (a)-(f) para formar el conjunto de células.
6. El método de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de distribuir una cantidad predeterminada de un fluido de cobertura suficiente para cubrir sustancialmente la pluralidad de muestras de células discretas dispuestas sobre el sustrato individual, en que el fluido de cobertura se selecciona del grupo que consiste en líquidos inertes, líquidos inmiscibles y aceite mineral.
7. El método de la reivindicación 1, en que el conjunto de células que se forma comprende al menos una muestra de ensayo y al menos una muestra de control en el sustrato individual.
8. El método de la reivindicación 1, en que el sustrato se selecciona del grupo consistente en una placa de vidrio, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de plástico, una membrana de nylon y una membrana de nylon sobre un rollo continuo.
9. El método de la reivindicación 8, que comprende además la etapa de revestir una superficie del sustrato con un modificador de superficie antes de llevar a cabo la etapa (e), en que el modificador de superficie se selecciona del grupo que consiste en poli-L-lisina, aminos, estreptavidina, epoxi, película metálica y materiales dieléctricos.
10. El método de la reivindicación 1, en que el sustrato es una placa de vidrio que comprende una región de código de barras, una región de control y una región de prueba, en que la región de código de barras comprende al menos uno de entre un código de barras de seguimiento y un código de barras de distribución y bloqueo.
11. El método de la reivindicación 10, que incluye además la etapa de recubrimiento de una superficie de la placa de vidrio con una capa hidrófoba en la región de control y la región de prueba antes de realizar la etapa (e), en que la región hidrófoba está configurada con una pluralidad de aberturas que pasan sustancialmente a través de la capa hidrófoba a la superficie de la placa de vidrio.

- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
12. Un conjunto de células sobre la cual puede llevarse a cabo un ensayo de diagnóstico, que comprende una pluralidad de muestras de células discretas en un solo sustrato, en que cada muestra de célula discreta comprende una pluralidad de células, en que la distancia entre las muestras de células discretas se selecciona de manera que el perímetro externo de cada muestra de célula discreta está separada de o contigua con el perímetro de una muestra discreta adyacente, en que las células de cada muestra de célula discreta están dispuestas con un solapamiento mínimo lo suficientemente bajo de las células, y en que la pluralidad de muestras de células discretas se forman administrando una suspensión celular en un volumen entre aproximadamente 1 nL a aproximadamente 500 nL que tiene una densidad de entre aproximadamente 200 a aproximadamente 400 células por 100 nL en forma de gotitas en el sustrato, en que el volumen de gota se ajusta para proporcionar una distribución monocapa de las células en el sustrato y en que cada muestra celular discreta dispensada ocupa una ubicación en el sustrato que tiene un diámetro de aproximadamente 1 mm o menos.
  13. El conjunto de células de la reivindicación 12, en que el único sustrato comprende además una región de código de barras, una región de prueba y una región de control y en que la región de código de barras comprende al menos uno de entre un código de barras de seguimiento de placas y un código de barras de dispensación y bloqueo.
  14. El conjunto de células de la reivindicación 13, en que una reacción entre un reactivo de ensayo y un analito predeterminado dentro de la pluralidad de muestras de células discretas de la región de control genera un patrón detectable por un sistema de formación de imágenes de tal manera que el patrón es suficiente para identificar de forma exclusiva el sustrato sobre el cual se forma el conjunto de células.
  15. El conjunto de células de la reivindicación 14, en que la región de control comprende entre aproximadamente 1 a aproximadamente 1000 muestras de células discretas.
  16. El conjunto de células de la reivindicación 13, en que el sustrato es una placa de vidrio que tiene una superficie que comprende una capa hidrófoba configurada con una pluralidad de aberturas para aceptar las muestras de células discretas en la región de prueba y la región de control, en que la pluralidad de aberturas pasan sustancialmente a través de la capa hidrófoba a una superficie de la placa de vidrio.
  17. El conjunto de células de la reivindicación 16, en que la capa hidrófoba en la placa de vidrio tiene aproximadamente 105 aberturas para aceptar las muestras de células discretas en la región de muestra y la región de control, en que cada abertura es capaz de aceptar un volumen entre aproximadamente 1 nL a aproximadamente 500 nL y teniendo cada abertura un diámetro de aproximadamente 1 mm o menos.
  18. El conjunto de células de la reivindicación 12, en que la pluralidad de muestras de células discretas comprende además al menos una muestra de prueba en el sustrato único.
  19. El conjunto de células de la reivindicación 12, en que el ensayo de diagnóstico se selecciona de entre el grupo que consiste en inmunohistoquímica, hibridización fluorescente in situ y análisis citogénico.
  20. El conjunto de células de la reivindicación 12, en que cada muestra de células discretas tiene un diámetro de menos de aproximadamente 1 mm y está formada a partir de una gotita de una suspensión de células que tiene un volumen entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200. nL.
  21. El conjunto de células de la reivindicación 12, en que el sustrato se selecciona del grupo que consiste en una placa de vidrio, una membrana de nitrocelulosa, una membrana de plástico, una membrana de nylon y una membrana de nylon en un rollo continuo.
  22. El conjunto de células de la reivindicación 12, en que el conjunto de células está cubierta con un fluido de cobertura seleccionado de entre el grupo que consiste en líquidos inertes, líquidos inmiscibles y aceite mineral.
  23. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además administrar al menos una de las gotitas a una velocidad en el intervalo de entre aproximadamente 1 m/s a aproximadamente 4 m/s.

## ES 2 645 437 T3

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o 23, que comprende además calentar al menos una muestra discreta en el sustrato y/o una ubicación predeterminada en el sustrato.
- 5 25. El método de la reivindicación 24, en que el calentamiento es realizado por una fuente de calor seleccionada de entre el grupo que consiste en al menos un alfiler calentado y un calentador de película fina.
- 10 26. El conjunto de células de las reivindicaciones 12 a 22, en que el sustrato se adapta para proporcionar calor a al menos una de las muestras de células discretas.
27. El conjunto de células de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, en que el sustrato está montado en una plataforma que está adaptada para proporcionar calor a al menos una de las muestras de células discretas.
- 15 28. El conjunto de células de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22, en combinación con una fuente de calor para proporcionar calor a al menos una de las muestras de células discretas y/o una ubicación predeterminada en el sustrato.
- 20 29. El conjunto de células de la reivindicación 28, en que la fuente de calor se selecciona del grupo que consiste en al menos un alfiler calentado y un calentador de película fina.
- 25 30. El conjunto de células de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 22 o 26 a 29, en que la pluralidad de muestras de células discretas están formadas eyectando una pluralidad de gotitas en el sustrato a una velocidad en el intervalo entre aproximadamente 1 m/s y aproximadamente 4 m/s.

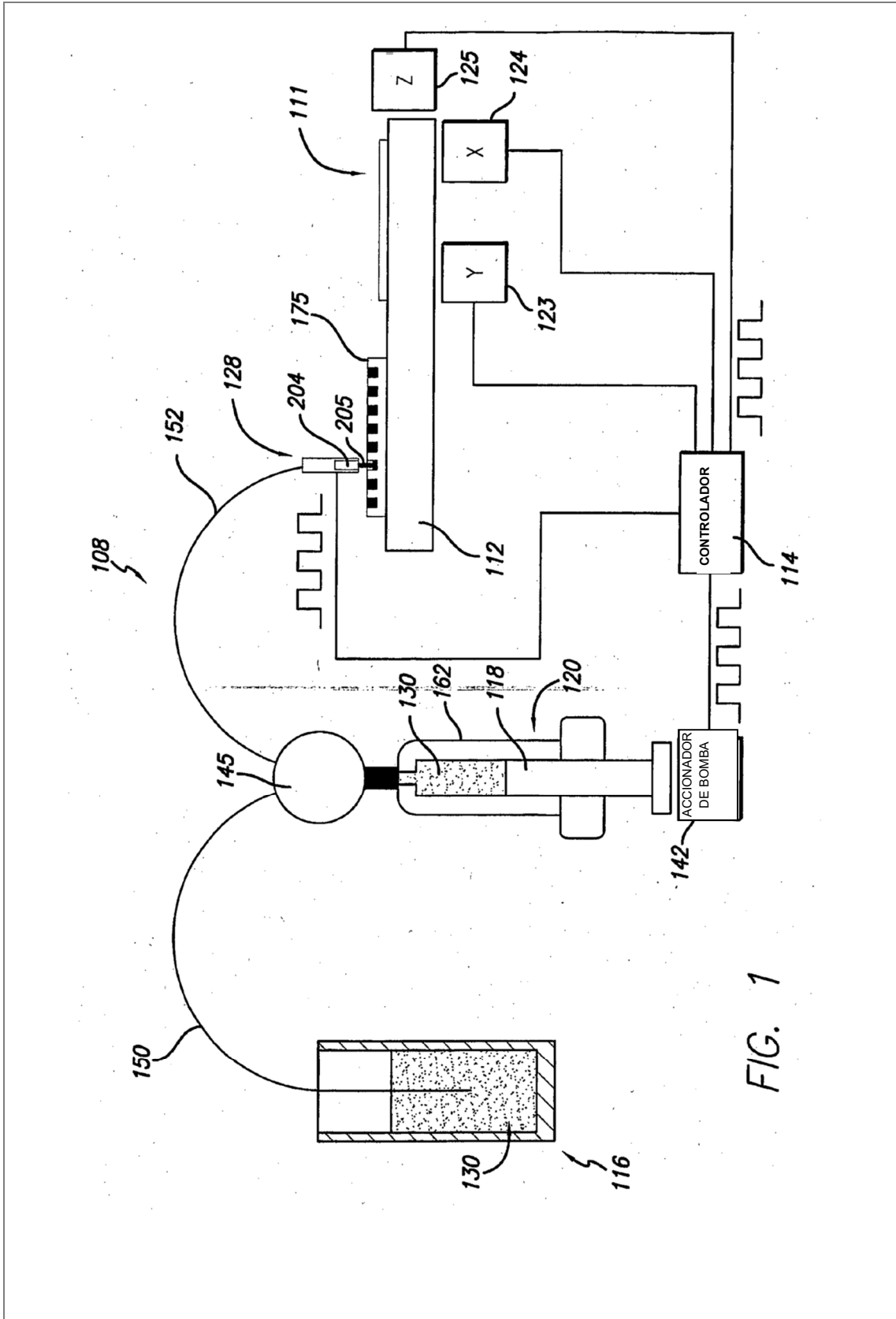


FIG. 1

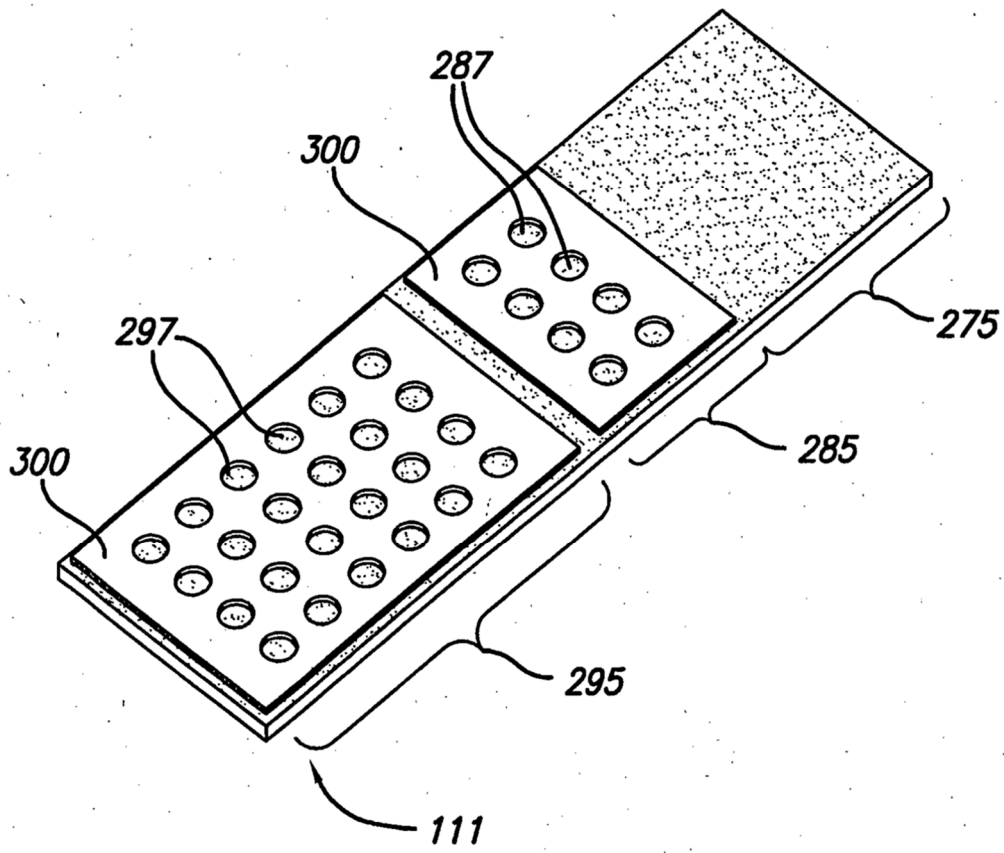


FIG. 2