

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 073**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/34** (2006.01)

**C12M 1/42** (2006.01)

**C12Q 1/00** (2006.01)

**G01N 15/10** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

**G01N 33/483** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.06.2009 PCT/IB2009/006480**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.01.2010 WO10001254**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2009 E 09772915 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2018 EP 2304020**

54 Título: **Procedimiento y aparato para seleccionar células**

30 Prioridad:

**30.06.2008 US 77083 P**

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

**15.04.2019**

73 Titular/es:

**MICROBIX BIOSYSTEMS INC. (100.0%)  
265 Watline Avenue  
Mississauga, ON L4Z 1P3, CA**

72 Inventor/es:

**LUSCHER, MARK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 709 073 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**

Procedimiento y aparato para seleccionar células

**Solicitudes relacionadas**

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, a procedimientos y aparatos para seleccionar células y, en particular, a unos procedimientos y aparatos para utilizar una fuente de energía controlada para modificar una población de células de interés mediante la retirada de manera selectiva, el enriquecimiento o la alteración de células, virus o de partículas respecto de la población.

El documento US 2005/207633A se refiere a un procedimiento para clasificar células.

10 **Antecedentes**

La selección citométrica de flujo permite la selección, el enriquecimiento, la distribución o la división de poblaciones de células, virus, cuerpos o partículas de interés (en lo sucesivo designadas como células). Los criterios de selección incluyen las propiedades mensurables de células individuales que pueden ser detectadas desde el exterior de la célula con o la sin ayuda de reactivos químicos o de complejos o cuerpos que estén, o que pueden conseguirse que se asocien con la célula. Por ejemplo, las propiedades de las células pueden ser medidas o aproximadas mediante la detección y / o la cuantificación de la asociación de las células con uno o más marcados, por ejemplo moléculas, complejos o cuerpos que fluorescen o que han sido modificados para convertirse en fluorescentes. Dichas moléculas, complejos y / o cuerpos fluorescentes pueden estar asociados de diferente manera con células sobre la base de las propiedades cualitativas o cuantitativas de las células incluyendo su composición con respecto a proteínas, lípidos, fosfoproteínas, glucoproteínas, fosfolípidos, glucolípidos, ácidos nucleicos, (incluyendo la cantidad, la secuencia o la organización de los ácidos nucleicos), carbohidratos, sales / iones, y cualquier otra molécula dentro, sobre o asociada con las células. Así mismo, dichas moléculas, complejos y / o cuerpos fluorescentes pueden asociarse de manera diferente con células en base a características físicas o fisiológicas de las células, ejemplos de las cuales incluyen, pero no se limitan a, la permeabilidad de la membrana, la composición de la membrana, la fluidez de la membrana, el potencial químico de la membrana, la viabilidad, los gradientes químicos, la motilidad, el potencial o estado de reducción u oxidación y otros parámetros o propiedades.

Otras propiedades mensurables de las células, ya sean marcadas o no marcadas, modificadas o no modificadas, que pueden proporcionar una base para la selección de las células pueden incluir, sin limitación:

30 propiedades de interacción de la luz con las células, por ejemplo fluorescencia, absorbencia, reflectancia, dispersión, polarización u otras propiedades;

propiedades eléctricas de las células o del efecto de las células sobre su entorno, incluyendo la conductancia, la inductancia, la resistencia, el potencial o la tensión de la membrana, u otras propiedades;

propiedades magnéticas o electromagnéticas de las células, incluyendo el magnetismo, el paramagnetismo, la resonancia magnética y / o la interacción de las células con la energía electromagnética;

35 la apariencia, la imagen o las propiedades morfológicas de las células; y

la estructura de las células con respecto a cualquier sustancia o parámetro medido directa o indirectamente de cualquier forma.

Así mismo, la medición de dichos parámetros, directa o indirectamente de manera singular o en combinación, puede reflejar propiedades simples o complejas de interés de las células.

40 Un ejemplo de dicha propiedad es el cromosoma sexual incluido en el genoma de gameto, haploide, que puede ser un cromosoma X o un cromosoma Y o una combinación de ambos dependiendo del tipo de célula y del organismo. La determinación del contenido de los cromosomas sexuales puede inferirse utilizando mediciones o determinaciones directas o indirectas utilizando uno o más procedimientos. Dichos procedimientos incluyen la medición del contenido del ADN de las células determinado relativa o absolutamente; la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN o marcadores de la presencia o ausencia de determinadas secuencias de ADN; el tamaño de las células o de las porciones u orgánulos de las células; la presencia, localización o la ausencia de proteínas u otros marcadores característicos de los cromosomas sexuales o de las células o combinaciones o patrones de expresión de dicho marcadores; o cualquier otra medición que refleje la composición del cromosoma sexual de la célula. Pueden llevarse a cabo otras muchas mediciones o determinarse propiedades para identificar células que sean de interés en un supuesto, situación, sistema, enfermedad, anomalía, proceso o circunstancia concretas.

50 Dichas mediciones citométricas permiten determinaciones cuantitativas y / o cualitativas acerca de las células, de poblaciones de células, órganos, tejidos u organismos. Dichas determinaciones pueden utilizarse de muchas

maneras incluyendo sin limitación el diagnóstico, la investigación biomédica, la ingeniería genética, la epidemiología, la medicina, la agricultura, la cría de animales, el manejo de ganado, la zoología, la industria biofarmacéutica, y otros campos. Además de la capacidad para llevar a cabo dichas mediciones, los procedimientos y el instrumental actuales permiten la separación de las células en base a las características o parámetros medidos por citometría de acuerdo con lo antes expuesto. Las células pueden ser seleccionadas positiva o negativamente mediante la concentración, agrupación o división de células de interés o mediante la eliminación de células no deseadas o de interés en la preparación. Dicha selección puede ser controlada sobre la base de cualquier parámetro, característica o combinación de parámetros o de características que pueden determinarse según lo antes descrito.

Las células identificadas mediante procedimientos que incluyen o que están relacionados con los descritos anteriormente, pueden ser separadas, divididas, concentradas, reducidas o agrupadas en cualquier número arbitrario de grupos. Un procedimiento de separación habitual (representado en la Fig. 1A) utiliza fuerzas electrostáticas para desviar una corriente eléctrica o electrostáticamente cargada, una gotícula o gotículas que contengan una célula o unas células que presenten unas propiedades deseadas o no deseadas. Las células desviadas son recogidas o descartadas como apropiadas para la aplicación concreta, como se ilustra en la Fig. 1A. Otros procedimientos de separación incluyen el uso de dispositivos fluidicos que incluyen ondas para desviar células de una corriente de fluido hacia vías de paso alternativas, canales, tubos o elementos para su posterior recogida o eliminación, como se ilustra en la Fig. 1B.

Existe una pluralidad de procedimientos y sistemas para llevar a cabo la selección citométrica de flujo de células. Entre estos existen procedimientos y sistemas diseñados específicamente para llevar a cabo una selección citométrica de flujo de células espermáticas de mamíferos y, en particular, para seleccionar las células espermáticas en poblaciones de células espermáticas cargadas con cromosomas X y / o poblaciones de células espermáticas que cargadas con cromosomas Y con la finalidad de incrementar la probabilidad de que la fertilización de un huevo con el esperma seleccionado se traduzca en una descendencia con un género deseado. Por ejemplo, un granjero de productos lácteos puede desear seleccionar el esperma de un toro de manera que puedan obtenerse embriones bovinos, mediante inseminación artificial, fertilización *in vitro* u otros medios con un esperma que incorpore un cromosoma X para obtener una descendencia bovina hembra adicional.

Los procedimientos de selección citométrica de flujo presentan una serie de problemas, particularmente con respecto a la selección de las células espermáticas de los mamíferos para su uso posterior en la producción de descendencia. Es de destacar que los procedimientos utilizados para marcar y / o diferenciar entre las células y / o los procedimientos utilizados para seleccionar las células no deban afectar negativamente a la viabilidad de las células. A menudo, uno o más objetivos de los procedimientos y / o sistemas implicados (por ejemplo, una selección más rápida, una precisión mejorada, etc.) entran en conflicto con otros objetivos de los procedimientos y / o sistemas. Diversos factores deben ser sopesados y considerados, incluyendo las temperaturas, los cambios de temperatura, las presiones y / o los cambios de presión a las que quedan sometidas las células, los entornos fluidicos a los cuales están expuestas las células, las fuerzas aplicadas a las células, y la longevidad de la célula. Por ejemplo, la velocidad a la cual una molécula fluorescente (por ejemplo, un fluorocromo) entra en una célula para fijarse al ADN dentro del núcleo de la célula (esto es, la velocidad a la cual las células pueden ser coloreadas), puede aumentar a medida que aumenta la temperatura. Así, el rendimiento total de un sistema (al menos el rendimiento total del proceso de tinción) puede incrementar con un incremento de la temperatura del entorno de las células. Sin embargo, la temperatura incrementada puede en último término resultar desventajosa para la viabilidad de las células y / o respecto de la longitud del tiempo durante el cual las células permanecen viables. Por el contrario, el mantenimiento de las células a la temperatura óptima para su viabilidad puede incrementar el tiempo requerido para colorear (y medir y seleccionar) las células, de manera que el proceso lleve más tiempo del que sería práctico o de manera que las células no resulten viables después del tiempo requerido para completar el proceso.

Otro problema asociado con la selección de las células se refiere a las propiedades físicas y ópticas de las células. En particular, las células planas o de cualquier forma asimétricas, como por ejemplo los eritrocitos de los mamíferos o las células espermáticas, muestran una emisión anisotrópica de energía (por ejemplo, luz). Las complejas geometrías del interior de una célula y / o las complejas geometrías de los límites de la célula actúan para refractar y / o reflejar la luz de manera que resulta altamente dependiente de la orientación de la célula con respecto a cualquier fuente de iluminación y / o de los detectores utilizados para diferenciar las células. Por ejemplo, la selección de citometría de flujo de las células espermáticas de los mamíferos en poblaciones con cromosomas X o Y generalmente implica la tinción de las células con una molécula fluorescente que se fija al ADN dentro de las células. La variación del contenido del ADN entre los cromosomas X e Y de la mayoría de las especies de los mamíferos (los cromosomas Y contienen generalmente menos ADN que los cromosomas X) se traduce en una fluorescencia relativamente mayor procedente de las células que contienen cromosomas X. Sin embargo, la diferencia en el contenido del ADN de los cromosomas X e Y es típicamente del orden de un escaso porcentaje y, a menudo, la geometría y / o la orientación de las células puede afectar a la fluorescencia detectada en un porcentaje que excede con mucho la diferencia de porcentaje en el contenido del ADN entre los cromosomas X e Y. Así mismo, dicho análisis requiere que las células pasen a través de la región de detección por separado, de manera que un detector no interprete la fluorescencia procedente de dos células como una fluorescencia de una sola célula.

Los sistemas de selección por citometría de flujo frecuentemente emplean un mecanismo fluidoico de núcleo en vaina para conducir las células a través de la región de detección. Como se representa en la Fig. 1C, una corriente 50 en

movimiento relativamente lento de una suspensión acuosa de unas células 52 es inyectada en un flujo 54 en movimiento relativamente más rápido de fluido de vaina. Esta disposición focaliza las células 52 dentro de una corriente 56, designada como la corriente del núcleo. Con una selección apropiada de las presiones y de las consiguientes velocidades de la suspensión del núcleo y del fluido de vaina, la corriente del núcleo es estrechada por las fuerzas hidrodinámicas ejercidas por el flujo de vaina, y las células de la corriente del núcleo son distribuidas longitudinalmente de manera que sean conducidas de una en una por el flujo. Las fuerzas que alargan y estrechan la corriente del núcleo presentan la ventaja adicional de orientar las células 52 de manera que el eje geométrico 58 longitudinal de la célula 52 sea paralelo con la dirección del flujo de la corriente 56 de hilera única. Sin embargo, la orientación de las células alrededor del eje geométrico 58 longitudinal sigue siendo más o menos aleatoria. Así, a medida que cada célula 52 pasa a través del área de detección, la luz que incide sobre la célula, la luz emitida procedente de la célula (por ejemplo, luz fluorescente) y la luz reflejada fuera de la célula, sigue dependiendo de la orientación de la célula 52. Esto es especialmente cierto en muchos tipos de células espermáticas de los mamíferos.

Existe una pluralidad de soluciones al problema de la orientación de las células espermáticas con respecto a la iluminación y la detección de las células dentro de los sistemas de citometría de flujo. Por ejemplo, la Fig. 1D ilustra una solución, solución que emplea una punta 60 biselada, cortada sobre un tubo 62 que inyecta una corriente 64 de muestra dentro de un flujo 66 de vaina. La punta 60 biselada aplastada contribuye a orientar las células alrededor de sus ejes geométricos 58 longitudinales dentro del flujo 66 de vaina de manera que las caras planas de las células tienden a alinearse en una dirección homogénea. Otra solución (que se puede combinar con la solución de la punta biselada) emplea dos detectores 68 y 70 ortogonales entre sí (un detector 68 de 0 grados y un detector 70 de 90 grados) que se utilizan en combinación para estimar la situación de cada célula 52 cuando pasa a través de un área 72 de detección y para medir la fluorescencia de esas células que aparecen adecuadamente orientadas de manera que resulta posible una cuantificación precisa de la señal fluorescente. Las soluciones que emplean una orientación hidrodinámica de las células alrededor del eje geométrico longitudinal generalmente consiguen poblaciones en las que la alineación deseada para la medición de la fluorescencia se consigue para aproximadamente un 70% o menos de las células del flujo de muestra, lo que reduce el rendimiento global del instrumento y provoca el descarte de las células incorrectamente orientadas.

Otra solución adicional a los problemas asociados con la geometría y la orientación de las células utiliza una detección óptica a lo largo del mismo eje geométrico que el flujo de núcleo en vaina que conduce las células. En una solución de este tipo, son utilizados elementos ópticos de epiiluminación para iluminar la célula y detectar la luz emitida por la célula. Como se representa en la Fig. 1E, una corriente 74 de muestra conducidas por un flujo 76 de vaina se desplaza directamente a través de una lente 78 de objetivo de microscopio, eliminando la dependencia de la orientación de la célula (por ejemplo, una célula 80 espermática) alrededor de un eje geométrico 82 longitudinal de la célula 80. Sin embargo, la trayectoria de la célula 80 hacia la lente 78 de objetivo requiere que la célula 80 cambie inmediatamente la trayectoria después de pasar a través de un área 82 de detección (esto es, el punto 84 focal de la lente 78 de objetivo). El sistema consigue este cambio de trayectoria utilizando un flujo 86 de fluido transversal. Una incertidumbre en cuanto a la posición de las células individuales puede introducirse después del análisis mediante la convergencia 88 del flujo 86 de fluido transversal y del flujo 76 de vaina y de la corriente 74 de fluido. Dicha incertidumbre de posición puede convertir el sistema en inoperable para llevar a cabo la selección de las células porque el emplazamiento de la célula 80 dentro del flujo convergido puede resultar impredecible inmediatamente después de que la célula pase a través del área 82 de detección.

Otra solución adicional, ilustrada en la Fig. 1F, utiliza uno o más reflectores 102 parabólicos para iluminar uniformemente las células y / o para recoger la luz radialmente procedente de las células. El sistema utiliza una tobera 104 para emitir una corriente / chorro 106 de líquido que contiene células 92 individuales. La corriente 106 se desplaza a través de una región 94 de detección y a través de un orificio 96 practicado en el reflector 102 parabólico. En algún punto después de pasar a través de la región de detección, la corriente 106 se desglosa en unas gotículas 90 que pueden ser eléctricamente cargadas. A continuación, cada una de las gotículas 90 puede ser seleccionada mediante, por ejemplo, la deflexión de la gotícula 90 cargada y de unas placas 98 de deflector eléctricamente cargadas para deflectar las gotículas hasta dentro de uno o más receptáculos 100. De forma problemática, la configuración de "chorro en el aire" somete a la corriente 106 (y a las células 92 contenidas dentro de la corriente 106) a una caída de la presión cuando la corriente 106 sale de la tobera 104. Los cambios repentinos de la presión (y las presiones incrementadas dentro de la propia tobera), pueden afectar negativamente a la viabilidad de la célula lo mismo que el consiguiente impacto de la célula 92 dentro del receptáculo 100. Así, la presión y la velocidad de la corriente 106 que sale de la tobera 104 debe permanecer por debajo de cualquier umbral que pudiera dañar las células 92, lo que reduce el rendimiento global del sistema. Así mismo, el desplazamiento de las gotículas 90 a través de la atmósfera puede requerir condicionamientos medioambientales incluyendo la limpieza del medio ambiente (por ejemplo, una "sala limpia") y el control de la temperatura.

Así, incluso en el estado relativamente avanzado de la citometría de flujo, en la técnica persiste la necesidad de unos procedimientos y unos dispositivos más eficientes, más sensibles y más precisos para la separación y / o la identificación de células.

**Sumario**

5 Se describe un procedimiento y un aparato para detectar, alterar selectivamente mediante una modificación funcional y / o física, y una recogida de células deseadas o no deseadas en una población que utilice citometría de flujo. El procedimiento no se basa en reflectores parabólicos o en la detección ortogonal para detectar y situar por categorías las células, como en el caso de los procedimientos y aparatos de selección citométrica generalmente existentes. Por el contrario, el procedimiento emplea una lente de objetivo que incluye un eje geométrico óptico coaxial con el flujo de la muestra a través de un área de detección. El procedimiento puede o puede no basarse en la diversión o el desglose de la corriente de flujo de células o en la colección de células para diferentes receptáculos o vías de paso de recepción, como también es el caso para los procedimientos y aparatos de selección citométrica generalmente existentes.

10 El procedimiento contempla el uso de una fuente de energía controlable como por ejemplo, pero no limitada, una fuente de radiación electromagnética, por ejemplo un láser, para irradiar células deseadas o no deseadas de una población de células que han sido identificadas utilizando las técnicas de detección citométricas. La fuente de energía controlable es dirigida de manera selectiva hacia las células de interés en base a sus propiedades o características medidas, después de su análisis en el citómetro, en cierto aspecto dentro de un segundo de su análisis mientras las células permanecen en el flujo fluido del dispositivo. Dichas células pueden ser funcional o físicamente alteradas por la energía transmitida. Dependiendo del uso concreto y de la forma de realización concreta de los procedimientos o de los aparatos, la población de células resultante puede ser funcional o físicamente vaciada de células no deseadas, y puede ser modificada de tal manera que permita el posterior enriquecimiento de las células deseadas o la retirada de las células no deseadas. Los procedimientos y los aparatos descritos resultan de amplia utilidad en aplicaciones en las que se requiera el enriquecimiento o la reducción de las células. En algunas formas de realización, el procedimiento y / o el aparato altera el líquido que contiene las células deseadas o no deseadas de una población que han sido identificada utilizando las técnicas de detección citométricas, y pueden no alterar las células directamente. En estas formas de realización el procedimiento y / o el aparato puede basarse en la diversión o en el desglose de la corriente de flujo de células o la selección de las células en diferentes receptáculos o vías de acceso.

25 Un aspecto de los procedimientos y aparatos descritos incluye el uso de estos para el enriquecimiento, la selección, la alteración funcional, o la reducción de las células espermáticas en una población sobre la base del cromosoma sexual X o Y, contenido en las células. Los procedimientos y aparatos incluyen el uso de diseños alternativos para los sistemas fluidicos y ópticos de un citómetro, incluyendo en un aspecto, un aparato en el que los componentes de medición ópticos y / o una fuente de energía de alteración de las células están / está orientados ortogonalmente con respecto a la corriente fluidica, y, en otro aspecto, un aparato en el que algunos de dichos componentes pueden también o como alternativa estar orientados en el mismo eje geométrico que la corriente fluidica y / o en ángulos oblicuos respecto de esta.

30 Los procedimientos y aparatos citométricos de flujo aportan un procedimiento y un aparato novedosos que permiten la selección positiva o negativa de las células mediante la observación de las células y la clasificación precisa de cada célula con independencia de la orientación de la célula alrededor de su eje geométrico más largo y, posteriormente, utilizar la selección para determinar si es necesario modificar, derivatizar, deteriorar, destruir o fragmentar la célula en el curso del procedimiento citométrico. Los procedimientos y aparatos actualmente descritos incorporan la aplicación de fuerzas, energía o irradiación hacia células deseadas o no deseadas coincidente con o antes de que transcurra un segundo de la medición citométrica para efectuar cambios en esas células que las alteren física o funcionalmente. Dichas células alteradas o sus residuos o derivados pueden, en un aspecto, ser retenidas en la preparación resultante o, en otros aspectos, son enriquecidas o retiradas, dependiendo de las exigencias del uso o aplicación concretos.

35 Se describe una forma de realización que permite la separación funcional y / o física de espermatozoides argados con los cromosomas X de los espermatozoides cargados con los cromosomas Y y / o de los espermatozoides cargados con los cromosomas Y de los espermatozoides cargados con los cromosomas X. En esta forma de realización, el contenido relativo del ADN de los espermatozoides individuales en una población de espermatozoides se mide indirectamente, utilizando una propiedad conocida de las sustancias químicas en asociación con el ADN como por ejemplo, pero sin limitación, bisbenzimidida, colorantes SYBR, como el SYBR-14, Hoechst 33342, Hoechst 33258, bromuro de etidio, naranja de acridina, DAPI, cromomicina, mitramicina, oligomicina, y otras sustancias químicas conocidas en la técnica que muestran una fluorescencia potenciada cuando se asocian con el ADN. La medición se lleva a cabo observando una célula cuando la célula se desplaza dentro de una corriente que fluye hacia el punto de observación, de modo preferente mediante una lente de objetivo que incluye un eje geométrico óptico coaxial con el flujo de la corriente. Las células que contienen relativamente más ADN (esto es un contenido más elevado de ADN) se considera que contienen el cromosoma de mayor tamaño X, y las células que contienen relativamente menos ADN (esto es con un contenido inferior de ADN) se presume que contienen el cromosoma más pequeño Y. En algunas formas de realización del procedimiento en el que se desean células que incluyan solo uno de los cromosomas sexuales en la preparación final, el procedimiento utiliza una fuente de energía láser dirigida hacia las células, en un aspecto, coincidente con o, en otro aspecto, en el margen de un segundo o menos de su análisis, cuando la fuente de energía láser puede ser rápidamente modulada para irradiar células que contengan el cromosoma sexual no deseado y / o las células cuyo contenido cromosómico sexual sea incierto. En un aspecto de

esta forma de realización, el procedimiento utiliza una fuente de energía láser que deposita energía de calidad y / o cantidad suficientes para modificar, derivatizar, desorganizar, inhabilitar y / o destruir las células no deseadas. Dichos cambios de las células seleccionadas implican en un aspecto, la fragmentación de las células o, en un aspecto alternativo, son menos desorganizadores, dependiendo de la aplicación. Por ejemplo, en formas de realización del procedimiento en las que deba utilizarse esperma identificado y / o aislado para la fertilización y / o la reproducción, haciendo que las células no deseadas sean incapaces de producir descendencia viable, por ejemplo mediante la interrupción de la secuencia o estructura de las moléculas del ADN de las células o mediante la reducción de motilidad de manera que sean en su mayoría infértiles para su uso en la inseminación artificial, es en un aspecto suficiente para producir la preparación deseada. En otros aspectos, las células no deseadas se hacen no motiles, destruidas, modificadas o desactivadas de alguna otra forma para afectar a la capacidad reproductiva de las células no deseadas. En un aspecto alternativo, las células no deseadas son modificadas o derivatizadas de una forma que permite su posterior retirada o una parcial retirada de la preparación de las células deseadas.

En otra forma de realización, la configuración del citómetro emplea uno o más elementos ópticos, utilizados en un aspecto, para la medición de las propiedades celulares y / o en otro aspecto, utilizado en la aplicación de energía de las células, en el que al menos un elemento óptico, de modo preferente, un eje geométrico óptico de una lente de objetivo, es orientado en el mismo eje geométrico que el flujo de las células sometidas a análisis. Así, en algunas formas de realización, se dispone un procedimiento y un aparato utilizando un elemento óptico y, en particular, una lente de objetivo situada en posición coaxial con el flujo de fluido para la iluminación, medición o la administración de energía a las células. En otra forma de realización, se dispone un procedimiento y un aparato que utiliza uno o más elementos adicionales, solo o en combinación, situados en un ángulo de 90 grados con respecto a la corriente de fluido para mediciones o para la administración de energía a las células. En otra forma de realización adicional, se incorpora un procedimiento y un aparato que utiliza uno o más elementos ópticos adicionales, solos o en combinación, situados de forma no coaxial con respecto a la corriente de fluido para mediciones o para la administración de energía a las células. En otra forma de realización adicional, se dispone un procedimiento y un aparato que utiliza uno o más elementos ópticos adicionales, solos o en combinación, situados en un ángulo oblicuo con respecto a la corriente de fluido para mediciones o para la administración de energía a las células. Según se utiliza en la presente memoria, un "ángulo oblicuo" es un ángulo por ejemplo un ángulo agudo u obtuso, que no sea un ángulo recto o un múltiplo de un ángulo recto.

Algunas formas de realización proporcionan un procedimiento para modificar una célula de interés de una población de células que comprende la etapa de contactar la célula de interés con una fuente de energía controlable que modifica la célula de interés tras la identificación de una célula como célula de interés en una población de células, sin separar la célula de interés de la población de células tras la modificación mediante la fuente de energía.

Algunas formas de realización proporcionan un procedimiento para identificar una subpoblación de células de interés en una población de células que comprende la etapa de contactar con población de células con una fuente de energía controlable que modifica las células de la subpoblación de células de interés, en la que el contacto tiene lugar después de un primer análisis de las células en un flujo de muestras fluidico de un citómetro de flujo, y no más allá de aproximadamente un segundo después del primer análisis, permaneciendo las células dentro del flujo de muestras fluidico del citómetro de flujo, en la que el primer análisis identifica células de la subpoblación de células como células de interés, cuando esas células de interés fluyen hacia un área de interrogación y en la que la fuente de energía controlable modifica las células de interés en el mismo flujo de muestras a través del citómetro de flujo.

En algunas formas de realización, el primer análisis comprende la detección de las células de interés que incorporan una propiedad deseada seleccionada entre el grupo compuesto por un elemento deseado: una composición proteínica, una composición de ADN, un marcador de la superficie de la célula, el tamaño molecular, la absorbencia de la luz, la reflexión de la luz, la fluorescencia, la difusión de la luz, la polarización, la propiedad eléctrica, la propiedad magnética, la propiedad morfológica, la permeabilidad de la membrana, la fluidez de la membrana y el estado de óxidorreducción.

En algunas formas de realización, el contacto con la población de células con la fuente de energía se produce cuando la población de células pasa a través de una corriente de flujo en un citómetro de flujo. En una forma de realización relacionada, la célula de interés es contactada con la fuente de energía después, y en el curso de un segundo de la identificación de la célula como célula de interés en la corriente de flujo.

Se prevé, en algunas formas de realización, que la fuente de energía está situada en posición coaxial con la corriente de flujo. También se prevé que la fuente de energía está situada en un ángulo de 90° con respecto a la corriente de flujo, o situada en un ángulo oblicuo con la corriente de flujo. En otra forma de realización, la fuente de energía es administrada a las células de interés por medio de una óptica Kohler y / o epiiluminación. En otra forma de realización, la fuente de energía es dirigida hacia un punto del flujo de células que está corriente abajo de la posición en la que son medidas las propiedades celulares. En otra forma de realización, la fuente de energía es dirigida hacia un punto en el flujo de células que está corriente abajo en la posición en la que son medidas las posiciones celulares y posteriormente se produce una diversión o giro de la corriente de flujo desde su dirección original de flujo.

- En algunas formas de realización, pueden llevarse a cabo uno o más análisis mediante la observación de una célula cuando la célula se desplaza dentro de una corriente que fluye hacia un punto de observación, de modo preferente, mediante una lente de objetivo que incluya un eje geométrico óptico coaxial con el flujo de la corriente. Después de pasar a través del punto de observación, la corriente cambia las direcciones en algunas formas de realización, mientras que el orden y / o el emplazamiento de las células dentro de la corriente permanecen determinables. En algunas formas de realización, una fuente de energía controlable puede controlar selectivamente una o más de las células de acuerdo con los uno o más análisis. En algunas formas de realización, la fuente de energía controlable está situada en posición coaxial con la corriente nuevamente dirigida, mientras que en otras formas de realización, la fuente de energía controlable está situada en perpendicular o en un ángulo oblicuo con respecto a la corriente nuevamente dirigida. En algunas formas de realización, que pueden o pueden no incluir una fuente de energía controlable, una tobera puede expulsar la corriente formando gotículas que pueden ser clasificadas utilizando medios conocidos (por ejemplo, utilizando una fuente de energía controlable para aplicar una carga electrostática, controlar la presión en varios puntos de acceso del flujo de fluido, etc.).
- En algunas formas de realización relacionadas, la fuente de energía controlable es dirigida hacia el emplazamiento de la célula en una corriente de flujo de una manera seleccionada a partir del grupo compuesto por una corriente continua, una corriente pulsada, ciclos intermitentes de activación / desactivación, focalización y desfocalización periódicas de la fuente de energía y la diversión rápida intermitente de la fuente de energía hasta la corriente.
- En algunas formas de realización, la fuente de energía controlable es una fuente electromagnética. En algunas formas de realización, la fuente de energía es un láser.
- En algunas formas de realización, la modificación de las células se selecciona entre el grupo compuesto por la derivatización, la destrucción, el deterioro, la perturbación y la fragmentación de las células de interés.
- En otro aspecto, la célula de interés es identificada como célula de interés utilizando un marcaje detectable por medios eléctricos, magnéticos, espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunomecánicos, fluorescentes u otros medios químicos. En algunas formas de realización, el marcaje es la adición de un compuesto marcaje fotoactivable químico.
- En una forma de realización relacionada, la célula de interés es identificada porque incorpora una propiedad deseada seleccionada entre el grupo compuesto por un elemento deseado: una composición proteínica, un contenido proteínico, una composición de ADN, un contenido de ADN, un marcador de superficie de la célula, el tamaño molecular, la absorbencia de la luz, la reflexión de la luz, la fluorescencia, la difusión de la luz, la polarización, la propiedad eléctrica, la propiedad magnética, la propiedad morfológica, la permeabilidad de la membrana, la fluidez de la membrana y el estado de óxidoreducción.
- Los procedimientos y los aparatos descritos contemplan que cualquier fuente de energía, detector, o elemento de enfoque utilizado en la detección de las propiedades de las células en el flujo, puede estar situado en posición coaxial con respecto a la corriente de flujo. Por ejemplo, en un citómetro de flujo que comprenda unos detectores y una fuente de energía controlable, o bien los detectores o bien la fuente de energía controlable, o ambos, son situados coaxiales con la corriente de flujo. En una forma de realización relacionada, cualquier aparato de detección y elementos ópticos utilizados en la detección de propiedades de las células en el flujo está situado en posición coaxial con respecto a la corriente de flujo.
- En otra forma de realización, la óptica Kohler y / o epiiluminación son utilizadas para la administración de luz o energía utilizada para la detección de propiedades deseadas. En una forma de realización relacionada, cuando el procedimiento utiliza un citómetro de flujo, el citómetro de flujo es un citómetro de epiiluminación. También se contempla que un citómetro de epiiluminación de utilidad en el procedimiento descrito incorpora un aparato para la modificación de células de interés según lo anteriormente descrito en la presente memoria.
- Cuando un citómetro de flujo es utilizado en el procedimiento descrito, el citómetro de flujo es un citómetro de flujo que incluye una o más corrientes de muestras e incorpora una óptica que incluye una lente de objetivo coaxial con el flujo de las una o más corrientes de muestras para la administración de luz o de energía utilizada para la detección de propiedades deseadas para la selección de propiedades deseadas de células y / o para la administración de luz o energía utilizadas para la modificación de células deseadas o no deseadas.
- En otra forma de realización, la fuente de energía modifica la célula de interés que incluye una propiedad deseada. En una forma de realización relacionada, la fuente de energía modifica la célula de interés que carece de una propiedad deseada.
- En una forma de realización adicional, la célula de interés es una célula espermática seleccionada entre el grupo consistente en el esperma que incorpora el cromosoma X y el esperma que incluye el cromosoma Y. Se contempla, en algunas formas de realización, que la célula espermática se identifica como célula de interés en base a una propiedad deseada de diferencia en el contenido del ADN entre el esperma que incluye el cromosoma X y el esperma que incluye el cromosoma Y.

- Los procedimientos y aparatos descritos proporcionan también que la población de células son recogidas en una cámara de recogida para su uso ulterior. En algunas formas de realización, la cámara de recogida contiene células de interés que han sido modificadas por la fuente de energía controlable y las células que no han sido modificadas por la fuente de energía controlable. En una forma de realización, después de la recogida, las células de interés pueden ser utilizadas en posteriores procesos o procedimientos. En una forma de realización adicional, se contempla que después de la recogida, las células de interés son descartadas y el resto de la población de células es utilizado en procesos o procedimientos posteriores.
- Los procedimientos y aparatos descritos también proporcionan un aparato para la modificación de una célula de interés de una población de células que comprende una fuente de energía controlable que modifica la célula de interés tras la identificación de una célula como célula de interés en una población de células, sin separación de la célula de interés de la población de células tras la modificación por la fuente de energía.
- En una forma de realización relacionada, los procedimientos y aparatos descritos contemplan la identificación de una subpoblación de células de interés a partir de una población de células, que utilizan un citómetro de flujo que comprende una fuente de energía controlable que modifica la subpoblación de células de interés, en la que el contacto tiene lugar después de un primer análisis de las células durante el flujo de muestras a través de un tubo de muestras del citómetro de flujo, y generalmente en el curso de un segundo del análisis de la célula, mientras que las células permanecen dentro del flujo de muestras fluido del aparato, en la que el primer análisis identifica la célula como célula de interés, y en la que la fuente de energía controlable modifica la célula de interés durante el flujo de muestras a través del citómetro de flujo.
- En algunas formas de realización, una o más etapas de un procedimiento descrito son almacenadas como instrucciones legibles por máquina sobre un medio de almacenamiento tangible dentro de un controlador. Un procesador del controlador ejecuta las instrucciones para supervisar y / o controlar los diversos aspectos de un citómetro de flujo de selección. Las instrucciones pueden incorporar una o más rutinas adaptadas a las diversas tareas efectuadas en el citómetro.
- En algunas formas de realización adicionales, una célula óptica, cubeta, ventana, tubo de flujo, pared, contorno u otra parte de un citómetro de flujo de selección está formada por un material con un índice de refracción entre 1,30 y 1,40, inclusive. En estas y otras formas de realización, una solución cargada con analito puede ser ajustada de manera que el índice de refracción de la solución sea próximo al índice de refracción de la célula óptica, cubeta, ventana, tubo de flujo u otra parte del citómetro de flujo de selección y, en particular, los índices de refracción difieren en 0,02 o menos.

### **Breve descripción de los dibujos**

- La Fig. 1A ilustra un procedimiento de selección de gotículas empleado en citómetros de flujo de selección;
- la Fig. 1B ilustra un procedimiento de presión de flujo diferencial empleado en citómetros de flujo de selección;
- la Fig. 1C representa un mecanismo de vaina y corriente empleado en sistemas de simetría de flujo;
- la Fig. 1D representa un mecanismo de vaina y corriente que emplea una punta biselada para orientarse dentro de la corriente;
- la Fig. 1E representa un citómetro de flujo que detecta una célula que utiliza una lente de objetivo orientada coaxialmente con la corriente de flujo;
- la Fig. 1F ilustra un sistema que utiliza un reflector parabólico para iluminar células de manera uniforme y para recoger la luz radialmente procedente de las células;
- la Fig. 2 representa una forma de realización prevista de la vía de flujo de un citómetro de flujo de selección;
- la Fig. 3 representa una forma de realización prevista de un citómetro de flujo de selección;
- la Fig. 4 representa una forma de realización alternativa prevista de un citómetro de flujo de selección;
- la Fig. 5 representa otra forma de realización alternativa prevista de un citómetro de flujo de selección;
- la Fig. 6A representa una forma de realización alternativa prevista de una porción de un citómetro de flujo de selección;
- la Fig. 6B representa otra forma de realización alternativa prevista de una porción de un citómetro de flujo de selección;

la Fig. 7 ilustra un procedimiento que puede ser utilizado con una o más formas de realización de un citómetro de flujo de selección previsto para crear dos puntos focales diferentes de energía dentro del sistema;

5 la Fig. 8A representa una lente de objetivo y un punto focal asociado dentro de una vía de flujo de una forma de realización prevista de los procedimientos y aparatos actualmente descritos;

la Fig. 8B ilustra una forma de realización de un volumen genéricamente cónico formado entre un punto focal nominal y una lente de objetivo;

la Fig. 9 representa una lente de objetivo de inmersión en agua y un punto focal asociado dentro de una vía de flujo de una forma de realización de los procedimientos y los aparatos actualmente descritos;

10 la Fig. 10 representa un cuerpo en el que una porción de la vía de flujo de un citómetro de flujo de selección puede formarse, de acuerdo con una forma de realización de los procedimientos y aparatos actualmente descritos;

la Fig. 11 representa una forma de realización alternativa del cuerpo representado en la Fig. 9;

la Fig. 12 representa otra forma de realización alternativa del cuerpo representado en la Fig. 9;

15 la Fig. 13 representa otra forma de realización alternativa adicional del cuerpo representado en la Fig. 9;

la Fig. 14 representa otra forma de realización alternativa más del cuerpo representado en la Fig. 9; y

la Fig. 15 representa un diagrama de flujo que ilustra las etapas de un procedimiento de acuerdo con los procedimientos y aparatos actualmente descritos.

### **Descripción detallada**

20 La presente memoria descriptiva describe procedimientos, sistemas y aparatos para la selección de células en base a la citometría de flujo. A menos que se establezca lo contrario todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el generalmente admitido por parte del experto en la materia a la cual estas invenciones reivindicadas pertenecen.

25 Debe destacarse aquí que, según se utiliza en la presente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno-a" y "el-la" incluyen las formas plurales a menos que del contexto claramente se derive lo contrario.

Como sin dificultad apreciarán las personas expertas en la materia a menos que se indique otra cosa que se considere importante para la comprensión de los procedimientos y aparatos descritos, las figuras incluidas no están trazadas a escala.

30 Según se utilizan en la presente memoria, los términos que siguen ofrecen los significados a ellos adscritos a menos que se especifique otra cosa.

35 El término "células" se refiere al analito contenido en los procedimientos y aparatos descritos, incluyendo esta materia, sin limitación, células, virus, cuerpos o partículas. El término "células de interés" o "célula de interés" se refiere a una célula que ofrece una propiedad deseada, propiedad que puede ser detectada en el curso del flujo de la célula a través del aparato citométrico de flujo. Una "propiedad deseada" se refiere a una determinada característica que distingue la célula que ofrece la propiedad deseada respecto de una célula que no presenta dicha característica. Las células que ofrecen una propiedad deseada se incluyen en una "subpoblación deseada" de células. Características de células ejemplares mensurables o detectables de una célula de interés incluyen, sin limitación, una composición proteínica, una composición de ADN de contenido proteínico, un contenido de ADN, marcadores superficiales de células, el tamaño molecular, la absorbencia lumínica, la reflexión lumínica, la fluorescencia, la dispersión lumínica, la polarización, las propiedades eléctricas de las células, las propiedades magnéticas, las propiedades morfológicas, la permeabilidad de las membranas, la fluidez de las membranas y el estado de la oxidorreducción. El experto en la materia apreciará sin dificultad que un citómetro puede medir o detectar un número indeterminado de características alternativas de una célula de interés, y que estas características alternativas son fácilmente susceptibles de explotación en los procedimientos y aparatos descritos. En un aspecto, los procedimientos y aparatos explotan una "propiedad deseada" de una célula de interés para identificar células que ofrezcan esta propiedad.

40 El término "primer análisis" se refiere a un análisis inicial de células cuando las células avanzan a través de un aparato citómetro de flujo, que puede ser un tubo, una cubeta, una región, una célula, una cámara, etc., para determinar si las células son células de interés. En un aspecto de algunas formas de realización, los detectores de un citómetro de flujo ejecutan el primer análisis.

El término "segundo análisis", según se utiliza en la presente memoria, se refiere a la caracterización de la célula de interés después del primer análisis a través del tubo de flujo para determinar si es necesario alterar la célula de interés utilizando una fuente de energía. En un aspecto de algunas formas de realización, el segundo análisis tiene lugar después, generalmente menos de un segundo después, que el primer análisis.

5 Los términos "modificar", "modificación", "alterar", y "alteración", según se utilizan en la presente memoria, se refieren a la utilización de la fuente de energía para inducir cambios en una célula. Las modificaciones incluyen, sin limitación, efectos directos sobre las células, incluyendo, sin limitación, la modificación de componentes celulares o sustancias químicas que incluyan proteínas, ADN y sustancias implicadas en el metabolismo celular; la perturbación, el calentamiento, la cavitación, o las explosiones que se produzcan en o cerca de las células; la permeabilización o la perforación de las células y la destrucción, fragmentación o la alteración morfológica de las células. En otros aspectos, las modificaciones también, o como alternativa, incluyen efectos indirectos de la fuente de energía, por la medición de la fuente de energía o mediante otros factores incluyendo la activación y / o desactivación químicas, el reticulado químico o la derivitización química de las células o de uno o más componentes celulares, la activación y / o desactivación de uno o más agentes químicos en o cerca de las células que provoquen la unión o la asociación de dichos agentes o sus derivados a la célula o sus componentes o la inducción del funcionamiento alterado de las células. En determinados aspectos, los agentes químicos, normalmente presentes en el interior o de cualquier otra forma aplicado a las células, interactúan con las células tras la irradiación de las células.

20 Los procedimientos y aparatos descritos permiten la identificación de células de interés mediante la detección de la presencia o ausencia de un número indeterminado de características (por ejemplo, una propiedad deseada) o parámetros que pueden determinarse, estimarse o ser reflejados en mediciones compatibles con las técnicas de citometría de flujo. Las mediciones citométricas utilizadas para definir células o poblaciones celulares de interés incluyen en varios aspectos las analizadas en la presente memoria y aquellas conocidas de otro modo en la técnica, así como procedimientos, mecanismos y / o aparatos de medición novedosos que puedan ser introducidos o resultar aplicables en el análisis citométrico de flujo. Las células sometidas al análisis citométrico por medio de la práctica de los procedimientos y aparatos actualmente descritos pueden ser marcados o no marcados o de cualquier otra forma modificados o no modificados utilizando técnicas y reactivos conocidos en la materia.

30 Según se utiliza en la presente memoria, el término "marcado" o "marcaje" se refiere a unos medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunológicos u otros medios químicos. Por ejemplo, marcajes de utilidad incluyen tintes fluorescentes, reactivos electrodenso, enzimas, biotina - estreptavidina, dioxigenina, haptenes, proteínas para las cuales se encuentran disponibles anticuerpos de inmunosueños o monoclonales, o tintes específicos de ácido nucleico. Así, en los procedimientos y aparatos actualmente descritos, la estructura, las propiedades y / o las características de las células con respecto a cualquier sustancia o parámetro medidos directa o indirectamente de cualquier forma es la base para la identificación de las células y de las poblaciones de células con fines de selección o exclusión.

35 Ejemplos de estructuras, propiedades detectables y / o características de células incluyen, sin limitación: mediciones de propiedades de la luz que interactúan con las células emitidas por las células, por ejemplo la absorbencia, la dispersión lumínica, la luminiscencia, la fluorescencia, la fosforescencia, la polarización o la despolarización de luz y otras propiedades; propiedades de electricidad que incluyen, sin limitación, la inductancia, la capacitancia, el potencial, la corriente o la resistencia de las células o del medio circundante; propiedades de electromagnetismo incluyendo el magnetismo, el paramagnetismo, la resonancia magnética y / o la interacción de la célula con o la emisión de fuerzas electromagnéticas y / u ondas; formación de imágenes, propiedades de formación de imágenes, propiedades morfológicas o propiedades relacionadas delgadas a partir de la recogida y / o el análisis de la imagen o de las propiedades tipo imagen de células. En determinados aspectos, la medición es una cantidad o calidad intrínseca de la célula o, en aspectos alternativos, la medición es un valor que indirectamente refleja, representa o se aproxima a una cantidad o calidad de la célula. A modo de ejemplo y no de limitación, una medición de fluorescencia de una célula puede reflejar la fluorescencia intrínseca de la célula o la medición de la fluorescencia de una célula puede reflejar la presencia y / o la cantidad de un fluorocromo o de una partícula fluorocromo o de una partícula fluorescente que se fije a o se asocie con la célula y directa o indirectamente refleje alguna propiedad de la célula, o ambas circunstancias.

50 En algunos aspectos de los procedimientos y aparatos descritos, un citómetro de selección emplea una técnica que se traduce en una separación física o espacial de células y de poblaciones celulares. En otros aspectos los procedimientos y aparatos descritos, un citómetro de selección utiliza una técnica que física y / o funcionalmente modifica las células seleccionadas de poblaciones para permitir su separación y / o diferenciación funcional y / o física, de manera opcional para un uso posterior. En algunos aspectos del procedimiento y del aparato descrito, un citómetro de selección no se basa en la separación inmediata de células mediante la posición, emplazamiento, receptáculo o el tiempo sino que, por el contrario, aporta células que están desactivadas, incapacitadas, perturbadas, desarticuladas, fragmentadas o alteradas de cualquier otra forma (esto es "modificadas") con respecto a alguna propiedad deseada, que, de manera opcional, posibilita la separación de diferencia de subpoblaciones en la preparación. La naturaleza de la modificación depende, en todo o en parte, de una aplicación o uso perseguidos para células identificadas, y con ello, de características de las células identificadas que son relevantes en la aplicación. Por ejemplo, y con fines únicamente de análisis de clarificación, una célula maligna o de cualquier otro tipo inmortal o que crece rápidamente podría considerarse desactivada funcionalmente en el contexto de la

preparación de células somáticas normales sin la capacidad de la célula para reproducirse se ve afectada negativamente o si la célula se destruye. En otro ejemplo, también con fines únicamente de análisis o clarificadores, en el que una aplicación requiere la retirada de una población respecto de una subpoblación de células que producen una proteína indeseable y otra sustancia, un citómetro de selección puede conseguir este resultado mediante la anulación de la producción de la sustancia de estas células, mediante la destrucción de las células y / o la modificación de las células para permitir su retirada física de la población.

Los procedimientos y aparatos actualmente descritos utilizan, en algunas formas de realización, una fuente de energía para la modificación de células o para la inducción o iniciación de procesos tales como la activación química que puede modificar células. Las modificaciones inducidas por la fuente de energía incluyen en diversos aspectos, efectos directos sobre las células, incluyendo sin limitaciones la modificación de los componentes celulares o de las sustancias químicas incluyendo las proteínas, el ADN y sustancias implicadas en el metabolismo celular; perturbación, calentamiento, cavitación o explosiones que se produzcan en o cerca de las células; la permeabilización o la perforación de las células; y la descripción, fragmentación o la alteración morfológica de las células, incluyendo células, virus, cuerpos o partículas. En otras formas de realización, las modificaciones también, o como alternativa, incluyen efectos indirectos de la fuente de energía, con la intermediación por parte de la fuente de energía o por otros factores, incluyendo la activación y / o la desactivación químicas, el reticulado químico o la derivatización de las células o de uno o más componentes celulares, la activación o desactivación de los uno o más agentes en o cerca de las células que provocan la fijación o asociación de dichos agentes o de sus derivados a la célula o sus componentes o la inducción de funcionamientos alterados de las células. En determinadas formas de realización, agentes químicos que reaccionan tras la irradiación con las células están normalmente presentes en las células y en la aplicación se añaden como parte del procedimiento.

En algunas formas de realización, los procedimientos y aparatos descritos incorporan el uso de compuestos fotoactivables que son inducidos a fijarse o asociarse con células o componentes celulares tras la irradiación con luz de una intensidad y energía apropiadas. Dichos compuestos, en determinados aspectos inducen la suficiente reticulación o desnaturalización de uno o más componentes celulares que afectan a los procesos celulares o al metabolismo de las células de interés. Como alternativa, dichos compuestos en determinados aspectos inducen la reticulación o desnaturalización suficientes de uno o más componentes celulares que destruyen las células de interés. En otra alternativa, unos compuestos fotoactivables utilizados en los procedimientos y aparatos descritos se fijan a células seleccionadas y alteran una o más propiedades de las células de interés de tal manera que hacen que las células de interés sean susceptibles de identificación y / o enriquecimiento y / o su agotamiento en procesos posteriores. Las células de interés que han sido alteradas por derivatización química, por ejemplo mediante la adición de una sustancia química, son, en determinados aspectos, retiradas, concentradas o purificadas en una etapa posterior empleando procedimientos que utilizan las propiedades o interacciones de dicha sustancia. Por ejemplo y únicamente con fines de análisis y clarificación, las células de interés son, en un aspecto, derivatizadas mediante la adición de una sustancia que es posteriormente fijada por un anticuerpo que permite la captura o retención de la célula de interés derivatizada por diversos medios. Se prevén muchas sustancias de este tipo y, en un aspecto, dichas sustancias incluyen una clase de compuestos que contienen y están relacionados con el grupo 2, 4 - dinitrofenilo posteriormente (DNP), el cual en un aspecto, es reconocido y específicamente ligado por anticuerpos que reconocen el DNP. Por consiguiente, los derivados fotoactivables del DNPO de compuestos relacionados son utilizados en un aspecto para derivatizar células de interés en una aplicación de este tipo. Como alternativa, las células derivatizadas de interés son capturadas o retiradas utilizando estrategias que provocan que las células derivatizadas de interés se fijen de modo preferente a determinados sustratos. Por ejemplo y con fines únicamente explicativos y de clarificación, las células de interés derivatizadas utilizan compuestos que contienen o están relacionados con la biotina son, en un aspecto, capturados o retenidos sobre sustratos, superficies, sustancias, medios, compuestos o partículas que exijan o han sido modificados para fijarse a la biotina, por ejemplo mediante la presencia de avidina, estreptavidina, anticuerpos de fijación a la biotina u otras moléculas de fijación a la biotina. En otra alternativa relacionada con este aspecto, los derivados de la biotina fotoactivables o compuestos relacionados son utilizados para derivatizar células de interés en dicha aplicación. Como alternativa, en otros aspectos, las células de interés son alteradas mediante la adición o la asociación de sustancias o compuestos químicos antes de ser sometidas a una selección y modificación. En un caso de este tipo, por tanto, una forma de realización de los procedimientos y aparatos descritos en la presente memoria, utiliza la alteración de la sustancia añadida sobre células seleccionadas para permitir la diferenciación de dichas células respecto de otras de la población. Por ejemplo, y únicamente con fines explicativos y de clarificación, en un aspecto, todas las células de la población son derivatizadas por la adición de un compuesto químico fotolábil antes del análisis y, en un aspecto, unas células específicas son elegidas como objetivo para la modificación y utilizando la fuente de energía del aparato para modificar el compuesto químico fotolábil sobre estas células.

En algunas formas de realización de un citómetro (véase la Fig. 1), las células pasan al interior de una cámara de interrogación o análisis, cubeta, corriente u otra posición o región de análisis de la forma usual, conocida en la técnica, para el análisis y / o la selección citométrica de flujo. El citómetro identifica las células mediante sus propiedades medidas según lo antes descrito, incluyendo, sin limitación, propiedades tales como la fluorescencia y / o la distorsión lumínica, que cuenten con una propiedad deseada o que no cuenten con una propiedad deseada en la preparación final. Un flujo de fluido conduce las células a través de la región del citómetro y, en un aspecto, pasan uno o más haces de rayos láser, detectores y / u otros aparatos que detectan las cantidades y las calidades de las

células. En un aspecto de este tipo, el flujo de fluido desplaza las células hacia un elemento óptico que incluye un eje geométrico genéricamente coaxial alineado con el flujo de fluido. A modo de ejemplo y no de limitación, el elemento óptico puede incluir una lente, por ejemplo una lente de objetivo y / o puede incluir uno o más detectores, haces de rayos láser y / u otras fuentes de energía. La luz y / o la energía que pasa entre las células y los detectores, los haces de rayos láser y / u otras fuentes de energía puede pasar a través del elemento óptico (por ejemplo, la lente de objetivo) que está genéricamente alineada de manera coaxial con el flujo de las células a través de la porción relevante del citómetro. La posición de cada célula en el citómetro en cualquier momento, en un aspecto, se determina directa o indirectamente y / o se estima a partir de la velocidad de la célula o del fluido que pasa a través de la porción relevante del instrumento. Una célula que ha pasado alguna o toda(s) la(s) posición(es) de análisis en la región es, en un aspecto, identificada como que ofrece una propiedad deseada o que no ofrece una propiedad deseada en la preparación final. Dicha determinación se efectúa, en un aspecto, mediante un ordenador y / o analógico y / o eléctrico digital o electrónico y / o un software y / o un dispositivo o unos dispositivos de análisis de datos por hardware de ordenador. Dicho dispositivo compara las propiedades individuales o múltiples, las mediciones y / o la característica de cada célula con respecto a una o a un conjunto o grupo de propiedades, mediciones, y / o características definidas por el operador del aparato. Como alternativa, las propiedades con las cuales las propiedades medidas deben ser comparadas son, en un aspecto, determinadas automáticamente utilizando algoritmos o programas incluidos en o con el citómetro.

El conjunto de propiedades con respecto a las cuales las células medidas en el citómetro son comparadas, en un aspecto, define una o más subpoblaciones de células de interés que presentan una propiedad deseada o que no presentan ninguna propiedad deseada en la preparación de las células. La determinación de si una célula que está pasando a través de la región de análisis del instrumento es un miembro de una subpoblación concreta de células de interés es, en un aspecto, llevada a cabo rápidamente de manera que el estado de la célula que presenta una propiedad deseada o que no presentan una propiedad deseada en la preparación de la célula se determina en el momento en que la posición de la célula del sistema de flujo del instrumento es determinado, en ciertos aspectos, generalmente inferior a un segundo después de la entrada en la región de análisis del instrumento. Una vez que se ha efectuado la determinación, las células, en un aspecto, son accionadas por una energía o fuerza que se transmite de manera selectiva sobre las células que satisfacen o no satisfacen los criterios de selección. La fuerza o energía en diversos aspectos desactiva, incapacita, perturba, desarticula, fragmenta o de cualquier otra forma altera las células de interés con respecto a una propiedad deseada que es relevante para una aplicación posterior opcional, o la fuerza o energía en aspectos alternativos modifica y / o derivatiza o provoca que las células de interés sean derivatizadas de una forma que permita la separación o diferenciación posteriores de una o más subpoblaciones de células de interés en la preparación.

Dicha fuerza o energía, en diversos aspectos, es transmitida por uno o más láseres u otra luz y / o fuentes electromagnéticas dirigidas hacia el emplazamiento de las células en la corriente que fluye, de tal manera que la fuente de energía puede ser rápidamente desviada, desenfocada o desactivada para permitir el paso de células que no sean seleccionadas para su modificación. Por ejemplo y solamente con fines de clarificación y análisis, una energía elevada y / o un láser de intensidad elevado, capaz de ser rápidamente pulsado o encendido y apagado, expone las células seleccionadas a una radiación perjudicial convirtiéndolas en disfuncionales en el contexto de cualquier uso deseado. En algunos aspectos, la fuerza de energía pasa a través de un elemento óptico alineado generalmente de forma coaxial con el citómetro. En cualquier caso, las células, tanto las seleccionadas como las sometidas a la fuerza de modificación o a la energía, y aquellas no seleccionadas y no sometidas a la fuerza o energía, continúan hasta migrar con el flujo celular y salir de la región del aparato en la que se lleva a cabo la medición de las propiedades celulares y la modificación de las células seleccionadas. El producto efluente es recogido y contiene también células modificadas y no modificadas, en determinados aspectos, fragmentos o residuos de células así como fluido, soluciones y / o tampones utilizados en el proceso en diversos aspectos, el producto de salida es utilizado así mismo en esta forma o, en otros aspectos, es concentrado, fraccionado o de cualquier otra forma tratado posteriormente para conseguir las propiedades y / o la composición deseadas.

Las Figs. 2 - 5 representan diversas formas de realización de un citómetro de flujo de selección de acuerdo con los procedimientos y los aparatos descritos. La Fig. 2 representa en concreto una forma de realización de una vía 110 de flujo básico del referido citómetro. Un tubo 112 de entrada del fluido de vaina posibilita que el fluido de vaina presurizado entre en la vía 110 de flujo en una entrada 114 de fluido de vaina, creando un flujo 116 de fluido de vaina a través de la vía 110 de flujo. Corriente abajo de la entrada 114 de fluido de vaina y, de modo preferente, en una región de suave flujo laminar del fluido de vaina, un tubo 118 de entrada de fluido de analito permite una corriente 120 de fluido de analito (esto es, un fluido en el que un analito es suspendido, transportado, etc.) hasta entrar en la vía 110 de flujo a través de la entrada 122 del analito. En algunas formas de realización, la entrada 122 del analito está dispuesta en posición central dentro del flujo 116 del fluido de vaina y / o en posición central dentro de la vía 110 de flujo, y orientada de tal manera que la corriente 120 del fluido de analito se sitúe en paralelo con el flujo 116 del fluido de vaina cuando el fluido del analito entre en la vía 110 de flujo. Por supuesto, la entrada 122 del analito no necesita estar en posición central respecto ya sea del flujo 116 del fluido de vaina o de la vía 110 de flujo, y el experto en la materia podría contemplar formas de realización en las que la corriente 120 del fluido de analito sea distinta de la paralela con respecto al flujo 116 del fluido de vaina cuando la corriente 120 del fluido de analito entra en la vía 110 de flujo. El caudal y la presión del flujo 116 del fluido de vaina con respecto a la corriente 120 del fluido de analito comprime y constriñe la corriente 120 del fluido de analito para que se estreche con respecto al flujo

116 del fluido de vaina. El flujo 116 del fluido de vaina y la corriente 120 del fluido de analito se combinan para formar un flujo 123 de muestra.

La vía 110 de flujo puede cambiar de dirección en una región 124 pero, de modo preferente, a continuación incluye una región 126 libre tanto de obstáculos como de cambios abruptos en la dirección del flujo, que sirven para estabilizar el flujo 123 de muestra antes de que el flujo 123 de muestra alcance un área 128 de interrogación (esto es, un área de observación, un área de análisis, un punto focal nominal, etc.). La vía del flujo 123 de muestra a través de la vía 110 de flujo define un eje geométrico 130 de flujo. En algunas formas de realización, la corriente 120 del fluido de analito así, en particular, los analitos (esto es, las células) dentro de la corriente 120 del fluido de analito generalmente se desplaza a través de la vía 110 de flujo a lo largo del eje geométrico 130 del flujo.

Después de alcanzar y / o pasar a través del área 128 de interrogación, el flujo 123 de muestra se desvía. En algunas formas de realización, la vía 110 de flujo cambia las direcciones en una esquina 132 (indicada en la Fig. 2 por una línea discontinua). En otras formas de realización, el flujo 123 de muestra tropieza con un flujo 134 transversal cuando llega hasta un extremo 136 de la región 126. El flujo 134 transversal dirige el flujo 123 de muestra. En algunas formas de realización, la esquina 132 o el flujo 134 transversal determina un cambio de 90 grados en la dirección del flujo 123 de muestra. Sin embargo, el flujo 123 de muestra puede, en formas de realización alternativas, variar en más o en menos en 90 grados. En cualquier caso, después del cambio de dirección, el flujo 123 de muestra puede fluir hacia un receptáculo 138 de recogida, y puede pasar a través de uno o más elementos 140 de vía de flujo (por ejemplo, reguladores del flujo, filtros, etc.) antes de alcanzar el receptáculo 138 de recogida.

Una lente 142 de objetivo dispuesta generalmente en o cerca de la esquina 132 o en o cerca de la intersección del flujo 123 de muestra con el flujo 134 transversal opera para crear un punto focal (no mostrado) dentro del área 128 de interrogación. Un eje geométrico 144 óptico de la lente 142 de objetivo está alineado genéricamente de forma coaxial con el eje geométrico 130 de flujo de la vía 110 de flujo cuando la vía 110 de flujo pasa a través del área 128 de interrogación. Por supuesto, el eje geométrico 144 óptico y el eje geométrico 130 de flujo no requieren que sean perfectamente coaxiales y pueden variar de manera que el eje geométrico 144 óptico sea paralelo a y desplazado del eje geométrico 130 de flujo, de modo que el eje geométrico 144 óptico esté en ángulo oblicuo con respecto al eje geométrico 130 de flujo, etc.

La Figura 3 ilustra un citómetro 1501 ejemplar de flujo de selección que incluye diversas características de los procedimientos y aparatos descritos. De modo similar a la forma de realización de la vía 110 de flujo representada en la Fig. 2, la Fig. 3 representa el tubo 112 de entrada del flujo de vaina y el tubo 118 de entrada del fluido de muestra, que introduce, respectivamente, el flujo 116 del fluido de vaina y la corriente 120 del fluido de analito a través de la entrada 114 del fluido de vaina y de la entrada 122 del fluido de analito. En particular, el fluido de analito representado en la Fig. 3 incluye unas células 150 espermáticas de mamífero y una solución 152 tampón que conduce las células 150 espermáticas de mamífero. Cuando el flujo 116 del fluido de vaina y el flujo 120 del fluido de analito se fusionan para formar el flujo 123 de muestra, los respectivos caudales provocan que las células 150 formen una corriente de una genérica sola fila y alineen su eje geométrico longitudinal (esto es, a lo largo de la extensión de la cola de las células) con la dirección del flujo 123 de muestra.

Todavía con referencia a la Fig. 3, una forma de realización de un citómetro de flujo de selección incluye un primer análisis y un segundo análisis. Cuando las células 150 avanzan a través de la vía 110 de flujo con el flujo 123 de muestra, el primer análisis puede determinar si las células son de interés, puede determinar la velocidad a la que se están desplazando las células a través de la vía 110 de flujo, puede determinar si en un punto determinado del flujo 123 de muestra, las células 150 están demasiado próximas entre sí para uno o más posteriores análisis, si las células 150 están orientadas de cola o de cabeza, etc. En la forma de realización representada por la Fig. 3, el primer análisis se produce cuando las células 150 alcanzan un punto 154 de la vía 110 de flujo. Una primera fuente 156 de iluminación del primer análisis dirige una energía 158 hacia el punto 154. La energía 158 puede interactuar con cada célula 150 para dispersar la energía 158 o para de otra forma interactuar con la célula 150, con un anticuerpo asociado con la célula 150, con un fluorocromo (por ejemplo, fluoresceína) asociado con la célula 150, etc. Un detector 160 puede detectar la energía 162 resultante (por ejemplo, la energía dispersada, la señal fluorescente resultante, etc.) y enviar una correspondiente señal por medio de una conexión 164 hacia un controlador 166. El detector 160 puede estar dispuesto en cualquier emplazamiento apropiado para detectar la energía 162, por ejemplo en ángulo oblicuo desde el punto 154 (con respecto a la fuente 156 de la energía de iluminación) o en línea con el punto 154. La fuente 156 de iluminación del primer análisis es, de modo preferente, un láser de 488 nm, pero puede comprender cualquier fuente de energía apropiada para las mediciones contempladas en el primer análisis. La fuente 156 de iluminación del primer análisis puede estar orientada de manera que la energía 158 se desplace perpendicularmente con respecto al flujo 123 de muestra o puede, como alternativa, estar orientada de manera que la energía 158 incida sobre las células 150 en ángulo oblicuo con respecto a la dirección del flujo 123 de muestra. Además, la energía 158 y / o la energía 162 puede atravesar uno o más elementos ópticos (no mostrados) tales como filtros, lentes, etc., los cuales pueden hacer posible que uno u otro o ambos entre la fuente 156 de energía de iluminación y el detector 160 queden situados de manera diferente representada mediante la creación de una vía óptica diferente, como es generalmente conocido en la técnica.

Algunas formas de realización pueden prescindir del primer análisis. Por ejemplo, la información extraída del segundo análisis (descrita con detalle más adelante) puede resultar suficiente tanto para determinar cuales sean las células de interés como para distinguir entre las células de las subpoblaciones deseadas y no deseadas. Así, los elementos 154 - 164 pueden omitirse en algunas formas de realización. Como alternativa, algunas formas de realización pueden incluir dos o más primeros análisis y, por consiguiente, dos o más conjuntos de elementos 154 - 164. Por ejemplo, y sin limitación, el flujo 123 de muestra puede incluir uno o más marcadores (por ejemplo, incluidos en el flujo 116 de vaina, fijados o de cualquier otra forma asociados con algunas células 150 dentro de la corriente 120 de muestra, etc.). Un primer análisis básico puede detectar uno de los marcadores en un primer punto, y un primer análisis secundario puede detectar el marcador en un segundo punto para determinar el caudal de células del flujo 123 de muestra.

En cualquier caso, el flujo 123 de muestra avanza después de que el primer análisis conduzca a las células 150 a lo largo de la vía 110 de flujo. Las células 150 pasan a través de un punto 170, el segundo análisis caracteriza las células 150, según se describe más adelante, para determinar si procede modificar cada célula 150. Cuando cada célula 150 alcanza el punto 170, una segunda fuente 172 de iluminación del segundo análisis dirige la energía 174 hacia el punto 170. La energía 174 puede interactuar con la célula 150, con un anticuerpo asociado con la célula 150, con un fluorocromo (por ejemplo, una tinción Hoechst) asociado con la célula 150 o con el ADN del interior de la célula 150, etc. En algunas formas de realización, la fuente 172 de iluminación del segundo análisis es un láser ultravioleta que emite la energía 174 en forma de radiación ultravioleta que interactúa con partículas de la tinción Hoechst fijada al ADN dentro de la célula 150 para provocar una fluorescencia proporcional con el contenido del ADN de la célula 150, como es bien sabido en la técnica. La fuente 172 de iluminación del segundo análisis puede estar orientada de manera que el haz 174 sea perpendicular al flujo 123 de muestra, como se representa en la Fig. 3. Sin embargo, la fuente 172 de iluminación del segundo análisis puede también estar situada en ángulo oblicuo con respecto al flujo 123 de muestra. Además, la energía 174 puede pasar a través de uno o más elementos (no mostrados), por ejemplo filtros, lentes, etc. que pueden posibilitar que la fuente 172 de iluminación del segundo análisis quede situada de manera diferente a la representada mediante la creación de una vía óptica que no sea recta.

La interacción de la energía 174 con la célula 150 o con los elementos situados dentro de la célula 150, provoca que la energía 176 resultante irradie desde la célula 150. La lente 142 de objetivo, situada de manera que el eje geométrico 144 de la lente 142 de objetivo sea genéricamente coaxial con el flujo 123 de muestra opera para focalizar la energía 176. Un punto 178 focal de la lente 142 de objetivo está situada genéricamente en el punto 170, pero puede estar situado para detectar la energía 176 resultante procedente de la célula 150 ligeramente después de que la energía 174 ilumine la célula 150 (esto es, el punto 178 focal puede situarse ligeramente más próximo a la lente 142 de objetivo que el punto 170). Un detector 180 situado para recibir una energía 182 focalizada por la lente 142 de objetivo detecta la energía 182 focalizada a partir de la célula 150, y envía una señal correspondiente por medio de una conexión 184 al controlador 166. Por supuesto, uno o más elementos ópticos, por ejemplo un filtro 186 pueden actuar para alterar o redirigir la energía 182 entre la lente 142 de objetivo y el detector 180. En algunas formas de realización, la lente 142 de objetivo crea el punto 178 focal antes de la esquina 132 o de la convergencia del flujo 134 transversal y del flujo 123 de muestra. En otras formas de realización, la lente 142 de objetivo crea un punto focal (no mostrado) en o cerca de la esquina 132 o en la convergencia del flujo 134 transversal y el flujo 123 de muestra.

El controlador 166, que puede incluir o más microprocesadores 188, uno o más osciladores 190 de cristal, una o más memorias 192 que almacenan una o más rutinas 194, etc., interpreta las señales recibidas del detector 160 y / o del detector 180 para determinar, para cada célula 150, si la célula 150 es parte de una subpoblación deseada de células. Por ejemplo, en algunas formas de realización, las células 150 son células espermáticas de mamífero, y el controlador 166 interpreta las señales recibidas del detector 180 para determinar si cada célula 150 está cargada con un cromosoma X o con un cromosoma Y. Como es sabido por los expertos en la materia, en células espermáticas de mamífero los cromosomas Y generalmente contienen menos ADN que los cromosomas X. Por consiguiente, analizando la fluorescencia (esto es, la energía 176 resultante) emitida por la tinción de la célula 150 tras la iluminación por la fuente 172 de iluminación del segundo análisis, el controlador 166 puede generalmente determinar si la célula 150 acarrea un cromosoma X o un cromosoma Y. En algunas formas de realización, una de las rutinas 194 supervisa continuamente la distribución estadística de las señales fluorescentes detectadas para mejorar con el paso del tiempo la precisión de la determinación.

Continuando con la referencia a la Fig. 3, en algunas formas de realización, el controlador 166, de acuerdo con la determinación de si una célula 150 es parte de una subpoblación deseada, emite una señal hacia una fuente 196 de energía controlable por medio de una conexión 198. La fuente 196 de energía controlable puede emitir una energía 197 dirigida en un punto 199 en el flujo 123 de muestra. En algunas formas de realización, el controlador 166 opera para coordinar la señal hacia la fuente 196 de energía controlable y / o el punto 199 es seleccionado (por ejemplo, apuntando, mediante una o más lentes, espejos, etc.) de acuerdo con la velocidad a la cual la célula 150 se desplaza a través de la vía 110 de flujo. En algunas formas de realización, el punto 199 puede ser situado antes de que la esquina 132 o que la convergencia del flujo 134 transversal y el flujo 123 de muestra, para simplificar la determinación de la posición de la célula 150 que se desplaza a lo largo de la vía 110 de flujo. En otras formas de realización, el punto 199 puede estar situado después de la esquina 132 o puede estar situado en o después de la convergencia del flujo 134 transversal y el flujo 123 de muestra. En el ejemplo anterior, el controlador 166 puede

emitir una señal para provocar que la fuente 196 de energía controlable emita la energía 197 en respuesta a una determinación de que la célula 150 está cargada con un cromosoma X o en respuesta a una determinación de que la célula 150 está cargada con un cromosoma Y. Como alternativa, el controlador 166 puede emitir una señal para provocar que la fuente 196 de energía controlable detenga la energía 197 de emisión en respuesta a una determinación de que la célula 150 incorpora un cromosoma X o en respuesta de la determinación de que la célula 150 incorpora un cromosoma Y. La energía 197 emitida desde la fuente 196 de energía controlable puede actuar para inhabilitar la célula 150 o hacer que la célula 150 no sea viable (por ejemplo, modificando los componentes o sustancias químicas celulares como por ejemplo las proteínas, el ADN y las sustancias implicadas en el metabolismo celular; provocando la perturbación, el calentamiento, la cavitación o las explosiones en o cerca de la célula 150; provocando la permeabilización o la perforación de la célula 150; y / o provocando la destrucción, la fragmentación o la alteración morfológica de la célula 150), puede actuar para alterar ( por ejemplo interactuando con una sustancia química incluida en o fijada a un componente celular) la célula de manera que pueda más tarde ser identificada y / o suprimida de la subpoblación deseada de células 150 o puede actuar para afectar de manera favorable a la célula. En algunas formas de realización, la fuente 196 de energía controlable es un láser y, en particular, puede ser una energía de emisión de rayos láser en las partes visibles o de infrarrojo del espectro. En algunas formas de realización, el láser emite energía con una longitud de onda de 690 nm. En otras formas de realización, la fuente 196 de energía controlable puede emitir otros tipos de longitudes de onda de radiación, por ejemplo rayos X, microondas, luz visible, luz infrarroja, luz ultravioleta, o cualquier otro tipo de energía que produzca un efecto deseado sobre una célula 150. Por supuesto en respuesta a la determinación de si una célula es parte de una subpoblación deseada, el controlador 166 puede: (1) emitir la energía 197 para afectar de manera negativa a las células 150 determinadas como que no forman parte de la subpoblación deseada (aunque dejando libres las células 150 determinadas como formando parte de la subpoblación deseada); (2) puede emitir la energía 197 para afectar positivamente a las células 150 determinadas como que forman parte de la subpoblación deseada (aunque prescindiendo de las células 150 determinadas como que no forman parte de la subpoblación deseada); (3) puede dejar de emitir la energía 197 para evitar afectar positivamente a las células 150 determinadas como que no forman parte de la subpoblación deseada (aunque continuando la emisión de la energía 197 para afectar positivamente a las células 150 determinadas como que no forman parte de la subpoblación deseada); o (4) puede dejar de emitir la energía 197 para evitar afectar negativamente a las células 150 determinadas como formando parte de la subpoblación deseada (aunque continuando emitiendo la energía 197 para afectar negativamente a las células 150 determinadas como que no forman parte de la subpoblación deseada). Además, en algunas formas de realización, el controlador 166 puede tratar células 150 indeterminadas (por ejemplo, las células 150 respecto de las cuales el controlador 166 no puede efectuar una determinación, las células 150 que están demasiado próximas entre sí, etc.) de la misma manera en la que el controlador 166 trata las células determinadas como que no forman parte de la subpoblación deseada.

La Fig. 4 ilustra un citómetro 200 de flujo ejemplar de selección que incluye diversas características de los aparatos y procedimientos descritos. En particular, el citómetro 200 de flujo de selección representado en la Fig. 4, prescinde del primer análisis y, por consiguiente, los elementos 154 - 164 no aparecen. Sin embargo, aunque no se ilustra, los expertos en la materia apreciarán que puede incluirse el primer análisis, si se desea, en la forma de realización ilustrada en la Fig. 4. Como en la forma de realización representada en la Fig. 3, el flujo 123 de muestra conduce las células 150 a lo largo de la vía 110 de flujo. Cuando las células 150 pasan a través del punto 170, el segundo análisis (el cual, en la representación de la Fig. 4, no sigue ningún primer análisis) caracteriza las células 150, según lo antes descrito, para determinar la necesidad de modificar cada célula 150. Esto es, cuando cada célula 150 alcanza el punto 170, la fuente 172 de iluminación del segundo análisis dirige la energía 174 hacia el punto 170, y la energía 174 interactúa con la célula 150, según lo antes descrito. Por supuesto, la fuente 172 de iluminación del segundo análisis puede ser un láser ultravioleta y la energía 174 puede interactuar con las moléculas de la tinción Hoechst 33342 fijadas al ADN del interior de la célula 150. La fuente 172 de iluminación del segundo análisis puede estar orientada de modo que el haz 174 sea perpendicular al flujo 123 de muestra, como se representa en la Fig. 4. Sin embargo, la fuente 172 de iluminación del segundo análisis puede situarse también en ángulo oblicuo con respecto al flujo 123 de muestra. Además, la energía 174 puede pasar a través de uno o más elementos ópticos (no mostrados) por ejemplo filtros, lentes, etc., lo que puede posibilitar que la fuente 172 de iluminación del segundo análisis quede situada de manera diferente a la representada mediante la creación de una vía óptica que no sea recta.

La energía 176 resultante que irradia de la célula 150 se propaga hacia la lente 142 de objetivo, la cual está situada de tal manera que el eje geométrico 144 óptico (véase la Fig. 3) de la lente 142 de objetivo sea genéricamente coaxial con el flujo 123 de muestra y opere para focalizar la energía 176. El punto 178 focal de la lente 142 de objetivo está situado genéricamente en el punto 170 pero, como alternativa, puede estar situado para detectar la energía 176 restante procedente de la célula 150 ligeramente después de que la energía 174 ilumine la célula 150. Uno o más elementos ópticos pueden dirigir la energía 182 focalizada desde la lente 142 de objetivo hasta el detector 180. Por ejemplo, en la forma de realización representada en la Fig. 4, la energía 182 focalizada pasa a través de un divisor 202 de haz y del filtro 186 antes de llegar al detector 180. Otros elementos ópticos (por ejemplo, lentes, espejos, filtros, etc.) pueden también afectar a la trayectoria de la energía 182 focalizada entre la lente 142 de objetivo y el detector 180. Como en la forma de realización representada en la Fig. 3, en algunas formas de realización, la lente 142 de objetivo crea el punto 178 focal antes de la esquina 132 o de la convergencia del flujo 134 transversal y del flujo 123 de muestra. En otras formas de realización, la lente 142 de objetivo crea un punto

focal (no mostrado) en o cerca de la esquina 132 o en la convergencia del flujo 134 transversal y el flujo 123 de muestra.

El controlador 166, según lo antes descrito con respecto a la Fig. 3, opera para interpretar las señales recibidas (por medio de la conexión 184) a partir del detector 180 (y el detector 160 si el citómetro 200 incluye el primer análisis) para determinar, para cada célula 150, si la célula 150 es parte de una subpoblación de células deseada (por ejemplo, células espermáticas con un cromosoma X). El controlador 166 emite una señal sobre una conexión 206 hacia una fuente 204 de energía controlable. La fuente 204 de energía controlable opera de la misma manera que la fuente 196 de energía controlable (Fig. 3). Sin embargo, en la forma de realización representada en la Fig. 4, la energía 208 emitida por la fuente 204 de energía controlable pasa a través de la lente 142 de objetivo después de pasar, en algunas formas de realización, a través de uno o más elementos ópticos, por ejemplo un filtro 216. La lente 142 de objetivo opera para focalizar la energía 208 en un punto 210 focal. En algunas formas de realización, la lente 142 de objetivo puede enfocar la energía 208 procedente de la fuente 204 de energía controlable de manera que la energía 212 focalizada sea genéricamente coaxial con el flujo 123 de muestra y de manera que el punto 210 quede situado más cerca de la lente 142 de objetivo que el punto 170.

Los expertos en la materia apreciarán que existen múltiples procedimientos para crear tanto el punto 210 focal como el punto 178 focal utilizando la misma lente. La Fig. 7 representa un procedimiento que el citómetro 200 podría emplear para crear el punto 178 focal para la energía 176 y el punto 210 focal para la energía 212. La Fig. 7 representa que cuando la energía 176 (indicada mediante líneas continuas en la Fig. 7) pasa a través de una lente 214 de la lente 142 de objetivo (no mostrada en la Fig. 7) desde el punto 178 focal (esto es, desde la célula 150 en el punto 170), la lente 214 actúa sobre la energía 176 de manera que los rayos de la energía 176 son paralelos cuando salen de la lente 214. Por el contrario, los rayos de la energía 208 son ligeramente convergentes cuando inciden sobre la lente 214 y, por consiguiente, convergen en el punto 210 focal después de pasar por la lente 214. Por supuesto, existen otros procedimientos para crear tanto el punto 178 focal como el punto 210 focal, incluyendo el aprovechamiento del hecho de que diferentes longitudes de onda de energía pueden refractar de manera diferente a través del mismo material, o empleando lentes multifocales a modo de ejemplo y no de limitación, las descritas en la patente estadounidense No. 6,010,647.

Con fines ilustrativos, la Fig. 5 representa otra forma de realización ejemplar de un citómetro 220 de flujo de selección. El citómetro 220 de flujo de selección incluye una vía 110 de flujo como se describe en términos generales en las Figs. 3 y 4. De modo similar al citómetro 200 de flujo de selección representado en la Fig. 4, el citómetro 220 de flujo de selección omite el primer análisis (así como el equipamiento asociado con el primer análisis). El flujo 123 de muestra y, en particular, las células 150, fluyen hacia la lente 142 de objetivo. Como en las formas de realización anteriormente descritas, la lente 142 de objetivo crea un punto 178 focal en un punto 170 en la vía 110 de flujo. La energía 176 procedente de la célula 150 cuando la célula 150 llega hasta el punto 170, pasa a través de la lente 142 de objetivo, la lente 142 de objetivo que está situada de manera que el eje geométrico 144 óptico de la lente 142 de objetivo es genéricamente coaxial con el flujo 123 de muestra y opera para focalizar la energía 176. El punto 178 focal de la lente 142 de objetivo está situado genéricamente en el punto 170 pero, como alternativa, puede estar situado para detectar la energía 176 resultante procedente de la célula 150 ligeramente después de que la energía 174 ilumine la célula 150. Uno o más elementos ópticos (por ejemplo el divisor 202 de haz, el filtro 186, etc.) pueden dirigir la energía 182 focalizada desde la lente 142 de objetivo hasta el detector 180.

De nuevo con referencia a la Fig.5, el citómetro 220 de flujo de selección representado incluye una fuente 222 de iluminación de segundo análisis. La fuente 222 de iluminación del segundo análisis emite la energía 224, la cual puede ser la energía 174 ultravioleta. La energía 224 emitida a partir de la fuente 222 de iluminación del segundo análisis se desplaza a través de una vía óptica hacia la lente 142 de objetivo. La lente 142 de objetivo puede focalizar la energía 224 sobre el punto 178 focal y, de esta manera, las trayectorias ópticas de la energía 176 y de la energía 224 pueden superponerse hasta cierto punto. Diversas disposiciones de otros elementos ópticos, por ejemplo el divisor 202 de haz y un filtro 226 pueden operar para dirigir la energía 224 desde la fuente 222 de iluminación del segundo análisis hasta la lente de objetivo y para dirigir la energía 176 (desde la célula 150) desde la lente 142 de objetivo hasta el detector 180.

El controlador 166, según lo antes descrito con respecto a las Figs. 3 y 4, opera para interpretar las señales recibidas (por medio de la conexión 184) procedentes del detector 180 (y del detector 160 si el citómetro 200 incluye el primer análisis) para determinar, para cada célula 150, si la célula 150 es parte de una subpoblación de células deseada. El controlador 166 emite una señal sobre una conexión 230 hacia una fuente 228 de energía controlable. La fuente 228 de energía controlable opera de la misma manera que la fuente 196 de energía controlable (Fig. 3), emitiendo la energía 232 dirigida en un punto 234.

Las Figs. 6A y 6B representan las porciones 235A y 235B, respectivamente, de otras formas de realización adicionales de un citómetro de flujo de acuerdo con los procedimientos y aparatos contemplados. En cada una de las Figs. 6A y 6B, las células 236 se desplazan dentro de una corriente 237 a través de una vía 238 de flujo, vía 238 de flujo que cambia la trayectoria en o alrededor de un punto 239, como se describió con respecto a la Fig. 2. La modelación de los fluidos de y / o la formación precisa de la vía 238 de flujo y / o la corriente 237 de las células 236 a través de la vía 238 de flujo y / o la inclusión de elementos adicionales (no mostrados) para supervisar la posición de las células 236, puede mejorar la incertidumbre en otro caso provocada por el cambio de la trayectoria en o

alrededor del punto 239. De esta manera, la posición y la identidad de las células individuales puede permanecer determinable después de que la trayectoria cambie. La Fig. 6A representa una forma de realización en la que una fuente 240 de energía controlable, que opera de la misma manera descrita con respecto a las Figs. 3, 4 y 5 (196, 204 y 228, respectivamente) está situada de manera que la energía 241 emitida incida sobre las células 236 después de que las células 236, se desplacen más allá del punto 239 en la vía 238 de flujo. La Fig. 6A representa la energía 241 desplazándose en perpendicular con respecto a la dirección en la que las células 236 fluyen a través de la vía 238 de flujo. Por supuesto, se puede apreciar que la fuente 240 de energía controlable puede, como alternativa, estar situada de manera que la energía 241 emitida se desplace genéricamente de forma coaxial con la dirección en la que las células 236 fluyen a través de la vía 238 de flujo (por ejemplo, cambiando de nuevo la dirección de flujo y posicionando la fuente 240 de energía controlable de manera que las células 236 de la vía 238 de flujo se desplacen hacia la fuente 240 de energía controlable).

Se debe apreciar que un citómetro de flujo de selección de acuerdo con los procedimientos y aparatos contemplados, puede, como alternativa, emplear una configuración de "chorro en aire", como se representa en la Fig. 6B. La Fig. 6B representa una tobera 242 que emite una corriente 243 de gotículas 244. Una fuente de energía controlable (no mostrada) altera de manera selectiva las gotículas confiriendo una carga a una o más de las gotículas 244. A continuación, y a modo de ejemplo y no de limitación, un par de placas 245 eléctricamente cargadas pueden seleccionar la corriente 243 de gotículas 244 dentro de unos receptáculos 246 de acuerdo con una determinación mediante un detector (no mostrado), según lo antes descrito.

La Fig. 8A representa la lente 142 de objetivo y una porción de la vía 110 de flujo que incluye la región 128 de interrogación. Como es generalmente sabido, uno o más elementos 250 de lente (por ejemplo, una lente delantera hemisférica, una lente del tipo menisco, etc.) actúan para crear un punto 252 focal nominal. En las formas de realización descritas con anterioridad con respecto a las Figs. 3 - 5, el punto 252 focal nominal está dentro del flujo 123 de muestra y, en particular, dentro de la vía de las células 150 a través de la vía 110 de flujo. El punto 252 focal nominal define un vértice de un volumen 254 genéricamente cónico entre el punto 252 focal nominal y un elemento 256 exterior de la lente 142 de objetivo que forma una base 253 del volumen 254 cónico. El volumen 254 cónico puede ser un volumen cónico circular recto, pero puede también ser un volumen cónico oblicuo. Un eje geométrico 258 del cono es genéricamente coaxial con un eje geométrico 260 de la lente 142 de objetivo en formas de realización en las cuales el volumen 254 cónico es un volumen cónico circular recto. En dichas formas de realización los ejes geométricos 258 y 260 son también coaxiales con el eje geométrico de flujo 262 dentro de la vía 110 de flujo, eje geométrico de flujo 262 que genéricamente define la vía que las células 150 recorren dentro de la vía 110 de flujo.

En algunas formas de realización, el punto 252 focal de la lente 142 de objetivo es tal que el número de interconexiones a través de las cuales la superficie 264 lateral del volumen 254 cónico pasa, resulta minimizado. Por ejemplo, y con referencia a la Fig. 8A, la pared 268A de la vía de flujo forma una vía 270A transversal genéricamente cilíndrica y la pared 268B de la vía de flujo forma una vía 270B de flujo genéricamente cilíndrica que es genéricamente coaxial con el eje geométrico del volumen 254 cónico. El volumen 254 cónico en la Fig. 8A pasa a través únicamente de dos interconexiones cuando entra en y sale del material que comprende la pared 268A. El volumen 254 cónico pasa a través de una interconexión 272 entre el aire 276 y el material que comprende la pared 268A y a través de una interconexión 274 entre el material que comprende la pared 268A y el fluido 278 de la vía 110 de flujo. Además en algunas formas de realización, la pared 268A de la vía 110 de flujo a través de la cual pasa la superficie 264 lateral puede ser genéricamente paralela a la base 253 del volumen 254 cónico. Esto simplifica las interconexiones a través de las cuales la energía focalizada por la lente 142 de objetivo debe pasar (esto es, la energía no pasa a través de cualquier superficie curvilínea), cada una de dichas interconexiones puede, debido a la refracción, afectar al punto 252 focal de la lente 142 de objetivo. Así mismo, el volumen 254 cónico puede estar formado por las secciones 255A, 255B y 255C de múltiples conos 257, 259 y 261 unidos entre sí, como se muestra en la Fig. 8B, como es el caso cuando una o más interconexiones (por ejemplo las interconexiones 272 y 274) se forman con materiales que presentan índices de refracción diferentes.

En términos generales, el volumen 254 cónico debe pasar a través de al menos las dos interconexiones 272 y 274. En algunas formas de realización de los procedimientos y aparatos descritos, la lente 142 de objetivo puede tener en cuenta una o más de las interconexiones, por ejemplo para dar respuesta a un grosor y a un índice de refracción del material que forma las interconexiones (por ejemplo, la pared 268A). Además, en algunas formas de realización, la lente 142 de objetivo puede ser una lente bañada en agua, y sumergida en agua, o sumergida en aceite, que utiliza un medio de inmersión (por ejemplo agua o aceite) que presenta un índice de refracción similar al del material que forma la interconexión (por ejemplo, la pared 268A). Así, como se representa en la Fig. 9, algunas formas de realización reducen aún más la distorsión del punto 252 focal minimizando las diferencias entre los respectivos índices de refracción de los materiales a través de los cuales pasa el volumen 254 cónico. En la Fig. 9, por ejemplo, el volumen 254 cónico puede pasar a través del agua 280, la pared 268A, y el fluido 278 de la vía 110 de flujo. La lente 142 de objetivo puede ser una lente de objetivo de inmersión en agua en la que, por ejemplo, la pared 268A sea de vidrio. Como alternativa, la lente 142 de objetivo puede ser una lente empapada en agua en situaciones en las que haya necesidad de corregir la refracción provocada por la pared 268A, por ejemplo, cuando la pared 268A está formada a partir de un material con un índice de refracción similar o igual al del fluido 278.

- En otras formas de realización adicionales, y como se describe ampliamente en la solicitud depositada de manera conjunta (expediente de abogado no. 30752/44821), las paredes 268A y 268B de la vía 110 de flujo pueden estar formadas con un material que presente un índice de refracción próximo del fluido 278 (esto es, un material que minimice la diferencia entre los índices de refracción de los materiales a través de los cuales pasa el volumen 254 cónico). Por ejemplo, materiales que presenten un índice de refracción próximo al del agua incluyen materiales con un índice de refracción en el intervalo de entre 1,30 y 1,40, inclusive. Diversos materiales sólidos de las familias de perfluoropolímeros amorfos, fluoropolímeros amorfos, y polímeros perfluoroalcoólicos presentan unos índices de refracción dentro de ese intervalo. A modo de ejemplo y no de limitación, el Cytop™, fabricado por Asahi Glass Co., Ltd., y Teflon® AF y Teflon® PFA, fabricado por DuPont™, son tres materiales de este tipo.
- En algunas formas de realización, los procedimientos o aparatos pueden también ajustar el índice de refracción del fluido 278 de manera que el índice de refracción del fluido 278 sea más próximo al índice de refracción del material que forma las paredes 268A y / o 268B de la vía 110 de flujo. En particular, los procedimientos o aparatos pueden ajustar el índice de refracción del fluido 278 para que se sitúe dentro de 0,02 del índice de refracción del material que forma las paredes 268A y / o 268B de la vía 110 de flujo.
- En algunos citómetros, una porción de la vía 110 de flujo, incluyendo la región 128 de interrogación, está formada en un cuerpo 280, por ejemplo el cuerpo 280 mostrado en la Fig. 10. La Fig. 10 representa el cuerpo 280 como un cuboide rectangular, que presenta perforada o de cualquier otra forma conformada en su interior una porción 281 de la vía 110 de flujo. La porción 281 incluye una primera porción 282 de vía de flujo genéricamente perpendicular a una superficie 284 a través de la cual la lente 142 de objetivo puede observar, y una segunda porción 286 de vía de flujo genéricamente paralela a la superficie 284 y que cruza un extremo 288 de la primera sección 282 de vía de flujo más próxima a la superficie 284. El cuerpo 280, el cual puede, por ejemplo, ser una cubeta, puede estar formado por un material de cuarzo pulido, vidrio, plástico u otro material generalmente conocido en la técnica. En algunas formas de realización el cuerpo 280 puede estar formado, totalmente o en parte, por un material que presente un índice de refracción entre 1,30 y 1,40, inclusive, por ejemplo Cytop™ o Teflon® AF.
- En otra forma de realización, ilustrada en la Fig. 11, el cuerpo 280 incluye la porción 281 de la vía de flujo. La porción 281 incluye la primera porción 282 de la vía de flujo genéricamente perpendicular a la superficie 284 a través de la cual la lente 142 de objetivo puede observar. Sin embargo, en la forma de realización representada en la Fig. 11, la segunda porción 286 de la vía de flujo forma un canal que incluye un borde 290 superior genéricamente coplanar con la superficie 284. Un cubreobjetos 292 dispuesto encima de la superficie 284 puede, en algunas formas de realización, posibilitar el uso de una lente de objetivo corregida para su uso con dicho cubreobjetos, para eliminar o minimizar los efectos refractivos de las interconexiones entre materiales con diferentes índices refractivos.
- En otras formas de realización adicionales, como se representa en la Fig. 12, el cuerpo 280 incluye un depósito 294 formado en la intersección de la primera porción 282 de la vía de flujo y la segunda porción 286 de la vía de flujo. Por ejemplo, la primera porción 282 de la vía de flujo puede cruzar el depósito 294 en una superficie 296 de fondo genéricamente planar que es genéricamente paralela a la superficie 284. Dos partes 286A y 286B de la porción 286 de la vía de flujo pueden conectar con el depósito 294 en superficies opuestas del depósito 294, las cuales pueden genéricamente tener la forma de un cilindro plano. La disposición puede facilitar mayor flexibilidad al ajustar el punto 252 focal (Figs. 8 y 9) impidiendo, por ejemplo, que el volumen 254 cónico pase a través de la pared 286A de la vía 270A de flujo transversalmente genéricamente cilíndrica (Figs. 8 y 9).
- La Fig. 13 representa una forma de realización similar en la que un borde 298 superior del depósito 294 es coplanar con la superficie 284 del cuerpo 280. Una lente de objetivo humedecida en agua (no mostrada) puede extenderse por el interior del depósito 294 y, al hacerlo, puede situarse en contacto con el fluido que fluye a través de la vía 110 de flujo, lo cual puede eliminar cualquier interconexión entre materiales de diferentes índices de refracción.
- Fig. 14 representa otra forma de realización adicional en la que un cubreobjetos 299 está situado por encima del depósito al descubierto representado en la forma de realización de la Fig. 13.
- La Fig. 15 ilustra un procedimiento 300 de selección de una subpoblación deseada de células a partir de una muestra de células. En algunas forma de realización, el procedimiento 300 o una porción del mismo, es almacenada en una memoria como un conjunto de instrucciones legibles por máquina que constituyen una rutina de control para uno o más aparatos asociados. Un procesador puede leer las instrucciones dispuestas en la memoria y ejecutar las instrucciones para llevar a cabo el procedimiento 300. En otra forma de realización, el procedimiento 300 incluye varias rutinas, rutinas que pueden individualmente controlar uno o más aparatos, pueden analizar los datos recogidos por los uno o más aparatos, pueden efectuar una o más determinaciones en base a los datos analizados, etc. Como es generalmente sabido, un técnico o aparato puede marcar (por ejemplo aplicando una tinción Hoechst) una muestra para su análisis (por ejemplo una colección de células espermáticas) (bloque 305). El marcaje de las células puede llevarse a cabo dentro de un citómetro de flujo de selección o en un proceso o procedimiento separado fuera del citómetro de flujo de selección. Además, el marcado concreto de las células puede depender de la aplicación citométrica.

En cualquier caso, después del marcado de las células, un citómetro de flujo de selección puede crear un flujo de fluido de vaina en una vía de flujo (bloque 310). Mediante una entrada separada, el citómetro de flujo de selección

puede inyectar una muestra (esto es, las células marcadas) dentro de la vía de flujo (bloque 315), de modo preferente en o cerca del centro del flujo del fluido de vaina. También de modo preferente, la muestra entra en el flujo del fluido de vaina lentamente con respecto al flujo del fluido de vaina, de manera que las células dentro de la muestra (por ejemplo, las células espermáticas) se alineen con un eje geométrico largo paralelo al flujo del fluido de vaina, y de manera que las células fluyan dentro de un patrón genéricamente de hilera única.

Cuando las células se desplazan a través de una vía de flujo, una fuente de energía de excitación, por ejemplo, un láser UV, ilumina la muestra (bloque 320). La fuente de energía de excitación puede continuamente iluminar la vía de flujo, o una rutina que actúe sobre el procesador puede controlar la fuente de energía de excitación para iluminar de manera selectiva la vía de flujo (por ejemplo solo cuando se encuentre una muestra en la vía de flujo).

Una lente de objetivo u otro medio de focalización opera para enfocar la energía emitida, transmitida o reflejada a partir de cada célula (por ejemplo, luz fluorescente emitida por el marcaje) en una dirección coaxial con el flujo (bloque 325). Esto es, el flujo de vaina y la muestra combinados dentro de la vía de flujo se desplazan genéricamente hacia una lente de objetivo que presenta un eje geométrico óptico genéricamente coaxial con el flujo y, nominalmente cada célula dentro de la muestra pasa a través de un punto focal de la lente de objetivo. Un detector recibe la energía focalizada desde la lente de objetivo (bloque 330) y envía una señal representativa de la energía detectada hasta un controlador. En algunas formas de realización, el detector puede detectar individualmente la energía focalizada a partir de más de 40.000 células por segundo, puede detectar individualmente la energía focalizada a partir de más de 75.000 células por segundo, o puede detectar individualmente la energía focalizada a partir de más de 100.000 células por segundo.

El controlador recibe la señal representativa de la energía detectada y analiza los datos (bloque 335) para determinar (en el bloque 340) si los datos representan una célula dentro de la subpoblación deseada, una célula no situada dentro de la subpoblación deseada, o una célula indeterminada que no puede determinarse como situada en la subpoblación deseada ni determinarse como situada en la subpoblación deseada. En este último caso, el controlador puede tratar la célula como si el detector determinase que la célula no se encontraba dentro de la subpoblación deseada. Si el controlador determina que la célula no se encuentra en la subpoblación deseada o es indeterminada, el controlador puede enviar una señal a una fuente de energía controlable, por ejemplo un láser infrarrojo, para irradiar la célula (por ejemplo, para alterar la célula, destruir la célula, convertir en inviable la célula, etc.) (bloque 345). Como alternativa, si el controlador determina que la célula está en la subpoblación deseada, el controlador puede enviar una señal a la fuente de energía controlable (o refrenar el envío de una señal) de manera que la fuente de energía controlable no irradie la célula (bloque 350).

El aparato puede agrupar las células para su uso y / o su procesamiento ulterior (por ejemplo, separación de las células) al final del proceso. En algunas formas de realización, que pueden incluir la forma de realización representada en la Fig. 15, el controlador envía una señal a la fuente de energía controlable para mantener inalteradas (esto es, no irradiar) las células que se consideran dentro de la subpoblación deseada, y la agrupación resultante de células tratadas comprende una relación de células de la subpoblación deseada de células con respecto al total de células inalteradas mayor o igual a un 60%. Así mismo, en algunas formas de realización, que pueden incluir la forma de realización representada en la Fig. 15, el controlador envía una señal a la fuente de energía controlable para mantener inalteradas (esto es, no irradiadas) las células que se ha determinado como subpoblación deseada, y la agrupación resultante de células procesadas comprende una relación de células alteradas de la subpoblación deseada con respecto a las células totales de la subpoblación deseada inferior o igual a un 50%.

Por supuesto, el procedimiento descrito anteriormente refleja una o más formas de realización de los procedimientos actualmente descritos, pero también puede abarcar una o más etapas o rutinas adicionales, según se ha descrito a lo largo de la presente memoria descriptiva con respecto a diversas formas de realización. Además, algunas formas de realización pueden omitir una o más de las etapas o rutinas descritas con referencia al procedimiento 300. A modo de ejemplo y no de limitación, en algunas formas de realización, el marcaje puede autofluorecer, eliminando así la necesidad de iluminar la muestra con una fuente de energía de iluminación. Así mismo, en algunas formas de realización (como se describió anteriormente), el procedimiento puede invertir los bloques 345 y 350, posibilitando que células determinadas que no se encuentren en la subpoblación deseada pasen sin irradiación por la fuente de energía controlable, al tiempo que se determina que la fuente de energía controlable irradie células que se ha determinado que se encuentren en la subpoblación deseada.

Los procedimientos y aparatos proporcionan una pluralidad de importantes ventajas con respecto a los citómetros de flujo de selección actualmente desarrollados. Una ventaja es que los procedimientos y aparatos actualmente descritos no someten las células de análisis, las cuales en algunas formas de realización son células espermáticas de mamífero, a la configuración de chorro en aire generalmente utilizada en citómetros de flujo de selección. El resultado es que un citómetro de acuerdo con las formas de realización actualmente descritas no expone las células de análisis al entorno circundante del citómetro o a la colisión resultante de la gotícula seleccionada con un receptáculo, y no experimentan las presiones y los cambios de presiones asociados con una tobera de la configuración de chorro en aire. Esto posibilita el uso del citómetro fuera de un entorno que desarrolle unas condiciones estrictas de control de la caída del aire y de la temperatura (por ejemplo, en el exterior de un entorno de "sala limpia"). De hecho, el propio citómetro puede desarrollar el control de la temperatura para extender la viabilidad

de las células de analitos. Además, los procedimientos y aparatos actualmente descritos pueden detectar y alterar las células de analitos más rápido y / o con más precisión. En parte debido a la alineación genéricamente coaxial de la lente de objetivo con el flujo del analito a través del área de interrogación que mitiga y / o elimina los problemas asociados con la emisión anisotrópica de energía procedente del analito, en particular en formas de realización  
5 utilizadas para seleccionar muchos tipos de células espermáticas de mamífero. Tras la lectura de la presente descripción de los procedimientos y aparatos divulgados en la presente memoria, resultarán evidentes para los expertos en la materia otras ventajas de los procedimientos y aparatos actualmente descritos.

Aunque el texto precedente revela una descripción detallada de numerosas formas de realización, se debe entender que el alcance de protección se define por las expresiones de las reivindicaciones posteriores. La descripción  
10 detallada debe considerarse únicamente como ejemplar y no describe cualquier posible forma de realización en cuanto la descripción de cualquier forma de realización no sería práctico, o sería imposible.

La memoria descriptiva expuesta describe al menos los siguientes aspectos:

1. Un procedimiento de selección de un primer conjunto de células a partir de una población de células que incluye el primer conjunto de células y un segundo conjunto de células, comprendiendo el procedimiento:

15 el marcaje de la población de células de manera que el primer conjunto de células pueda distinguirse del segundo conjunto de células;

la provisión de una primera vía de flujo que presenta un extremo distal, un extremo proximal, un área de interrogación dispuesta entre el extremo proximal y el extremo distal, y un eje geométrico de flujo;

20 la creación de un flujo de vaina de un fluido de vaina a través de la primera vía de flujo, desplazándose el flujo de vaina hacia el extremo proximal en un primer caudal;

la inyección dentro del flujo de vaina, en un punto corriente arriba desde el extremo proximal, de un flujo de muestra que incluye la población de células, presentando el flujo de muestra inicialmente un segundo caudal inferior al primer caudal;

25 la provisión de una fuente de energía de excitación, siendo la energía emitida a partir de la fuente de energía de excitación que actúa sobre células individuales a medida que pasan a través del área de interrogación y provocando la emisión o la transmisión de una radiación secundaria a partir de las células;

30 la utilización de una lente de objetivo que presenta un eje geométrico óptico alineado de forma genérica coaxialmente con el eje geométrico de flujo para focalizar la radiación secundaria a partir de las células individuales a medida que las células pasan a través del área de interrogación;

la detección de la radiación secundaria focalizada a partir de las células individuales;

la determinación, a partir de la radiación secundaria detectada, acerca de si las células individuales están en el primer conjunto o en el segundo conjunto; y

35 la selección de células determinadas como incluidas en el primer conjunto.

2. El procedimiento del aspecto 1, en el que la selección de células determinadas como situadas en el primer conjunto comprende la adopción de una medida entre la derivatización, la destrucción, el deterioro, la modificación, la interrupción o la fragmentación de células no determinadas como dispuestas en el primer conjunto.

40 3. El procedimiento del aspecto 1, en el que la selección de células determinadas como incluidas en el primer conjunto comprende la expulsión de las células de una corriente a partir de una tobera, la creación de una pluralidad de gotículas de la corriente, la aplicación de manera selectiva de una carga sobre las gotículas y la selección de las gotículas de acuerdo con la carga de cada gotícula.

45 4. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 3, en el que el marcaje de la población de células comprende la tinción de las células.

5. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 4, en el que la emisión de una radiación secundaria comprende la emisión de luz fluorescente.

6. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 5, en el que la energía emitida a partir de la fuente de energía de excitación pasa a través de la lente de objetivo.

7. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 6, en el que las células son células espermáticas y en el que el primer conjunto de células comprende o bien células con un cromosoma X o bien con células con un cromosoma Y.
- 5 8. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 7, en el que la selección de las células determinadas como pertenecientes al primer conjunto comprende la utilización de una fuente de energía de diferenciación para irradiar células no determinadas como pertenecientes al primer conjunto.
9. El procedimiento del aspecto 8, en el que la fuente de energía de diferenciación es un láser infrarrojo próximo.
- 10 10. El procedimiento del aspecto 8 o del aspecto 9, en el que la energía emitida por la fuente de energía de diferenciación pasa a través de la lente de objetivo.
11. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 10, en el que la provisión de una fuente de energía de excitación comprende la provisión de un láser ultravioleta.
12. El procedimiento del aspecto 10, que comprende además:
- 15 la selección de una combinación de una longitud de onda de la fuente de energía de diferenciación, el primer caudal, el segundo caudal y la lente de objetivo de manera que un punto focal nominal de la lente de objetivo y un punto focal nominal de la fuente de energía de diferenciación están separadas por la distancia que las células individuales recorrerán a través de la vía de flujo entre la detección de la radiación secundaria focalizada y la utilización de la fuente de energía de diferenciación para irradiar células no determinadas como incluidas en el primer conjunto.
- 20 13. El procedimiento del aspecto 8 o del aspecto 10, en el que la provisión de una fuente de energía de excitación comprende la provisión de una salida atenuada a partir de la fuente de energía de diferenciación.
- 25 14. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 13, que comprende además la provisión de una segunda vía de flujo transversal al eje geométrico de flujo y dispuesta en el extremo proximal de la primera vía de flujo, de manera que, después de atravesar el área de interrogación y llegar hasta el extremo proximal de la primera vía de flujo, las células se desplazan hacia el interior de la segunda vía de flujo y se alejan del área de interrogación.
15. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 14, en el que la provisión de una vía de flujo comprende además la provisión de una vía de flujo formada con un material que presenta un índice de refracción entre 1,30 y 1,40, inclusive.
- 30 16. El procedimiento de cualquiera de los aspectos 1 a 15, que comprende además el ajuste del índice de refracción de una solución que contiene la población de células de manera que el índice de refracción de la solución se sitúa dentro del 0,02 del índice de refracción del material que forma el material de flujo.
17. Un aparato para detectar y alternar de manera selectiva una subpoblación deseada de células de una población de células de muestra, comprendiendo el aparato:
- 35 una vía de flujo de fluido que presenta:
- un primera sección de flujo que presenta un eje geométrico de flujo, y
- una segunda sección de flujo,
- cruzándose las primera y segunda secciones de flujo en un extremo de medición de la primera sección de flujo;
- 40 un área de interrogación dispuesta en o cerca del extremo de medición de la primera sección de flujo;
- una entrada de fluido de vaina e comunicación de flujo de fluido con la vía de flujo de fluido;
- un entrada de muestra en comunicación de flujo de fluido con la vía de flujo de fluido;
- 45 una lente de objetivo que presenta un punto focal nominal y un eje geométrico óptico y dispuesta en el extremo de medición de la primera sección de flujo, estando la lente de objetivo alineada con la primera sección de flujo de manera que el punto focal nominal se sitúa a lo largo del eje geométrico de flujo y en el área de interrogación y de manera que el eje geométrico óptico está alineado genéricamente de forma coaxial con el eje geométrico de flujo;
- un detector dispuesto para detectar la luz focalizada por la lente de objetivo;

- una rutina lógica acoplada de manera comunicativa al detector, operable para determinar si una célula de la población de células de muestra es una entre la subpoblación deseada de células, y además operable para emitir una señal en base a la determinación de si la célula es una entre la subpoblación deseada de células; y
- 5 una fuente de energía controlable acoplada de manera comunicativa a la rutina lógica y operable para alterar de manera significativa o bien células de la subpoblación deseada de células o bien células no situadas en la subpoblación deseada de células de acuerdo con al menos la salida de señal procedente de la rutina lógica.
- 10 18. El aparato del aspecto 17, en el que la fuente de energía controlable altera de manera selectiva células mediante derivatización, destrucción, deterioro, modificación, perturbación o fragmentación de una o más células no determinadas como pertenecientes a la subpoblación deseada.
19. El aparato del aspecto 17 o del aspecto 18, que comprende además una fuente de energía de excitación.
- 15 20. El aparato del aspecto 19, en el que la energía emitida por la fuente de energía de excitación pasa a través de la lente de objetivo.
21. El aparato del aspecto 19 o del aspecto 20, en el que la fuente de energía de excitación comprende un atenuador que presenta la fuente de energía controlable como entrada.
22. El aparato de cualquiera de los aspectos 17 a 21, en el que la energía emitida por la fuente de energía controlable pasa a través de la lente de objetivo.
- 20 23. El aparato de cualquiera de los aspectos 17 a 22, en el que la fuente de energía controlable comprende un láser.
24. El aparato de cualquiera de los aspectos 17 a 23, en el que la fuente de energía controlable comprende un láser infrarrojo próximo.
- 25 25. El aparato de cualquiera de los aspectos 17 a 24, que comprende además un cuerpo en el que se forma la vía de flujo.
26. El aparato del aspecto 25, que comprende además una ranura que forma la segunda sección de flujo en una primera superficie del cuerpo, en el que el extremo de medición de la primera sección de flujo cruza la ranura en la primera superficie.
27. El aparato del aspecto 25, que comprende además:
- 30 un primer canal interior a través del cuerpo, extendiéndose desde una primera superficie del cuerpo hasta un punto del cuerpo y que forma la primera sección de flujo; y
- un segundo canal interior a través del cuerpo, que se extiende desde el punto del cuerpo hasta una segunda superficie del cuerpo.
- 35 28. El aparato de cualquiera de los aspectos 25 a 27, en el que el cuerpo está formado por un material con un índice de refracción entre 1,30 y 1,40, inclusive.
29. El aparato del aspecto 28, en el que el material comprende un perfluoropolímero amorfo, un fluoropolímero amorfo, o un polímero perfluoroalcoxi.
30. El aparato de cualquiera de los aspectos 17 a 29, en el que la lente de objetivo es o bien una lente de inmersión en agua o bien una lente empapada en agua.
- 40 31. El aparato de cualquiera de los aspectos 17 a 30, en el que la población de células de muestra comprende células espermáticas.
32. El aparato del aspecto 31, en el que la población deseada de células comprende o bien células con un cromosoma X o células con un cromosoma Y.
- 45 33. Un sistema para la detección y la alteración de manera selectiva de una subpoblación deseada de células de una población de células de muestra, comprendiendo el sistema:
- una vía de flujo de fluido que presenta un eje geométrico de flujo;
- un área de interrogación dispuesta dentro de la vía de flujo de fluido;
- una entrada de fluido de vaina en comunicación de flujo de fluido con la vía de flujo de fluido;

- una primera bomba en comunicación de flujo de fluido con la entrada de fluido de vaina;
- una entrada de fluido de muestra en comunicación de flujo de fluido con la vía de flujo de fluido;
- una segunda bomba en comunicación de flujo de fluido con la entrada de fluido de muestra;
- 5 una lente de objetivo que presenta un punto focal nominal y un eje geométrico óptico y dispuesta de manera que el punto focal nominal se sitúa a lo largo del eje geométrico del flujo y en el área de interrogación y de manera que el eje geométrico óptico está alineado genéricamente de forma coaxial con el eje geométrico de flujo en el área de interrogación;
- un detector dispuesto para detectar la luz focalizada por la lente de objetivo;
- una fuente de energía controlable;
- 10 un procesador acoplado de manera comunicativa a un medio de almacenamiento elegible por ordenador, al detector y a la fuente de energía controlable; y
- en el que el procesador y la fuente de energía controlable cooperan para alterar de manera selectiva, de acuerdo con una salida procedente del procesador, o bien células de la subpoblación deseada de células o bien células de la subpoblación no deseada de células.
- 15 34. El sistema del aspecto 33, en el que así mismo el procesador y la fuente de energía controlable cooperan para alterar de manera selectiva células de la subpoblación deseada de células mediante derivatización, destrucción, deterioro, modificación, perturbación o fragmentación de una o más células no determinadas como incluidas en la subpoblación deseada de células.
- 20 35. El sistema del aspecto 33 o del aspecto 34, en el que la energía emitida por la fuente de energía controlable pasa a través de la lente de objetivo.
36. El sistema de cualquiera de los aspectos 33 a 35, en el que la fuente de energía controlable comprende un láser infrarrojo próximo.
37. El sistema de cualquiera de los aspectos 33 a 35, que comprende además un cuerpo formado por un material que presenta un índice de refracción entre 1,30 y 1,40, inclusive.
- 25 38. El sistema de cualquiera de los aspectos 33 a 37, en el que la población de células de muestra comprende células espermáticas.
39. El sistema del aspecto 38, en el que la subpoblación deseada es o bien de células con un cromosoma X o células con un cromosoma Y.
- 30 40. Un procedimiento de detección y alteración de manera selectiva de una subpoblación de células de una población de células de muestra, encuadrado el procedimiento en un conjunto de instrucciones legibles por máquina ejecutadas en un procesador y almacenados en un medio tangible, comprendiendo el procedimiento:
- el control del flujo de una población de células de muestra a través de una guía de flujo que presenta un eje geométrico de flujo;
- 35 el control de una fuente de iluminación para iluminar un área de interrogación a través de la cual pasan las células de la población de células de muestra;
- la recepción de datos procedentes de un detector de una vía óptica que presenta una lente de objetivo, presentando la lente de objetivo un eje geométrico óptico y un punto focal nominal, estando el eje geométrico óptico alineado genéricamente de forma coaxial con el eje geométrico de flujo, estando el punto focal nominal dentro del área de interrogación;
- 40 la determinación, a partir de los datos recibidos, de la presencia en el área de interrogación de una de las células de la población de células de muestra;
- la determinación a partir de los datos recibidos acerca de si una de las células de muestra es una entre la subpoblación de células deseada; y
- 45 el control de una fuente de energía de selección de células de acuerdo con al menos la determinación de si una de las células de muestra es parte de la subpoblación de células deseada.
41. El procedimiento del aspecto 40, en el que el control de la fuente de energía de selección de células comprende:

la determinación de la velocidad de flujo a través del área de interrogación de una de las células de muestra; y

la irradiación de forma selectiva de una de las células mediante el control de la fuente de energía de selección de células de acuerdo con la velocidad determinada de flujo de una de las células de muestra a través de la vía de flujo.

5 42. El procedimiento del aspecto 40, en el que el control de la fuente de energía de selección de células comprende la aplicación de manera selectiva de una carga a una gotícula que contiene una de las células.

43. Un sistema para la detección y la alteración de manera selectiva de una subpoblación deseada de células de una población de células de muestra, comprendiendo el sistema:

10 una vía de flujo que presenta un área de interrogación y un eje geométrico de flujo del área de interrogación;

unos medios de control para el control de un flujo de la población de células de muestra a través de la vía de flujo;

15 unos medios de iluminación para la iluminación de las células de muestra cuando pasan a través del área de interrogación;

una lente de objetivo que presenta un eje geométrico óptico y un punto focal nominal, estando el eje geométrico óptico genéricamente alineado de manera coaxial con el eje geométrico de flujo, estando el punto focal nominal dentro del área de interrogación;

20 unos medios de detección para detectar la energía focalizada por la lente de objetivo y proporcionar datos relacionados con la energía detectada;

unos medios de procesamiento para recibir los datos relacionados con la energía detectada y para determinar si las células de muestra individuales que pasan a través del área de interrogación son una entre la subpoblación deseada;

unos medios de selección de células para irradiar de manera selectiva las células de muestra; y

25 unos medios de control de selección de células para controlar los medios de selección de células de acuerdo con al menos la determinación de si las células de muestra individuales son una entre la subpoblación deseada.

30 44. El sistema del aspecto 43, en el que la población de células de muestra comprende una población de células espermáticas y en el que la subpoblación deseada de células comprende células espermáticas con un cromosoma X.

45. El sistema del aspecto 43, en el que la población de células de muestra comprende una población de células espermáticas y en el que la subpoblación de células deseada comprende células espermáticas con un cromosoma Y.

35 46. El sistema de cualquiera de los aspectos 43 a 45, en el que la energía emitida por los medios de selección de células pasa a través de la lente de objetivo antes de alcanzar las células de muestra.

47. El sistema de cualquiera de los aspectos 43 a 46, en el que al menos una parte de la vía de flujo está formada de un material con un índice de refracción entre 1,30 y 1,40, inclusive.

48. Un proceso de detección y alteración de manera selectiva de una subpoblación deseada de células de una población de células de muestra, comprendiendo el proceso:

40 la creación de un flujo que porta una procesión generalmente en una fila de células de muestra a través de una vía de flujo;

la iluminación de las células de muestra cuando las células de muestra pasan a través de un área de interrogación de las vías de flujo;

el posicionamiento de una lente de objetivo de manera que:

45 un eje geométrico óptico de la lente de objetivo es genéricamente coaxial con una vía de flujo;

el flujo se desplaza a través de la vía de flujo hacia la lente de objetivo; y

la lente de objetivo presenta un punto focal nominal en el área de interrogación;

- la detección de un parámetro de células de muestra individuales cuando las células de muestra pasan a través del área de interrogación;
- la interpretación del parámetro detectado de las células de muestra individuales para determinar si las células de muestra individuales son una entre la subpoblación deseada;
- 5 la derivatización de manera selectiva, la destrucción, el deterioro, la modificación, la perturbación o la fragmentación de una o más entre la población de células de muestra de acuerdo con la determinación de si las células de muestra individuales con una entre la subpoblación deseada de células; y
- la recogida de la población resultante de células procesadas.
- 10 49. El proceso del aspecto 48:
- en el que la población de células de muestra comprende células espermáticas:
- en el que la subpoblación deseada de células comprende o bien células con un cromosoma X o bien células con un cromosoma Y; y
- 15 en el que la detección de un parámetro de las células de muestra individuales cuando las células de muestra pasan a través del área de interrogación comprende la detección del parámetro de más de 40,000 células de muestra por segundo, cuando las células pasan a través del área de interrogación.
- 20 50. El proceso del aspecto 48, en el que la detección de un parámetro de las células de muestra individuales cuando las células de muestra pasan a través del área de interrogación comprende la detección del parámetro de más de 75,000 células de muestra de segundo cuando las células pasan a través del área de interrogación.
- 25 51. El proceso del aspecto 48, en el que la detección de un parámetro de las células de muestra individuales cuando las células de muestra pasan a través del área de interrogación comprende la detección del parámetro de más de 100,000 células de muestra por segundo cuando las células pasan a través del área de interrogación.
- 30 52. El proceso de cualquiera de los aspectos 48 a 51, en el que las células determinadas como pertenecientes a la subpoblación deseada no son alteradas por la derivación de manera selectiva, la destrucción, el deterioro, la modificación, la perturbación o la fragmentación de las células y en el que la población resultante de células procesadas comprende una relación de células de la subpoblación deseada de células con respecto a las células inalteradas totales superior o igual a un 60%.
- 35 53. El proceso de cualquiera de los aspectos 48 a 51, en el que las células determinadas como pertenecientes a la subpoblación deseada son alteradas mediante la derivatización de manera selectiva, la destrucción, el deterioro, la modificación, la perturbación o la fragmentación de las células, y en el que la población resultante de células procesadas comprende una relación de células de la subpoblación deseada de células con respecto a las células alteradas superior o igual a un 60%.
- 40 54. El proceso de cualquiera de los aspectos 48 a 53, en el que las células determinadas como pertenecientes a la subpoblación deseada no son alteradas mediante la derivatización de manera selectiva, la destrucción, el deterioro, la modificación, la perturbación o la fragmentación de las células, y en el que la población resultante de células procesadas comprende una relación de células alteradas de la subpoblación deseada con respecto a las células totales de la subpoblación deseada inferior o igual a un 50%.
- 45 55. El proceso de cualquiera de los aspectos 48 a 53, en el que las células determinadas como pertenecientes a la subpoblación deseada no son alteradas mediante la derivatización de manera selectiva, la destrucción, el deterioro, la modificación, la perturbación o la fragmentación de las células, y en el que la población resultante de células procesadas comprende una relación de células inalteradas de la subpoblación deseada con respecto a las células totales de la subpoblación deseada inferior o igual a un 50%.

**REIVINDICACIONES**

1.- Un procedimiento de selección de un primer conjunto de células a partir de una población de células que incluye el primer conjunto de células y un segundo conjunto de células, comprendiendo el procedimiento:

- 5 el marcaje de la población de células de manera que el primer conjunto de células pueda distinguirse del segundo conjunto de células;
- la provisión de una primera vía (110) de flujo que presenta un extremo distal, un extremo proximal, un área (128) de interrogación dispuesta entre el extremo proximal y el extremo distal y un eje geométrico de flujo;
- la creación de un flujo (116) de vaina de un fluido de vaina a través de la primera vía de flujo, desplazándose el flujo de vaina hacia el extremo proximal en un primer caudal;
- 10 la inyección dentro del flujo de vaina, en un punto corriente arriba a partir del extremo proximal, de un flujo (120) de muestra que incluye la población de células, presentando el flujo de muestra inicialmente un segundo caudal inferior al primer caudal;
- la provisión de una fuente de energía de excitación, actuando la energía emitida por la fuente de energía de excitación sobre células individuales cuando pasan a través del área de interrogación y provocando la emisión o la transmisión de una radiación secundaria procedente de las células;
- 15 la utilización de una lente (142) de objetivo que presenta un eje geométrico (144) óptico alineado genéricamente de forma coaxial con el eje geométrico (130) de flujo para focalizar la radiación secundaria procedente de las células individuales cuando las células pasan a través del área de interrogación;
- la detección de la radiación secundaria focalizada procedente de las células individuales;
- 20 la determinación, a partir de la radiación secundaria detectada, de si las células individuales están en el primer conjunto o en el segundo conjunto; y
- la selección de células determinadas como incluidas en el primer conjunto.

2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la energía emitida por la fuente de energía de excitación pasa a través de la lente de objetivo.

25 3.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la selección de células determinadas como incluidas en el primer conjunto comprende la utilización de una fuente de energía de diferenciación para irradiar células no determinadas como pertenecientes al primer conjunto.

30 4.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la selección de células determinadas como pertenecientes al primer conjunto comprende una medida entre la derivatización, la destrucción, el deterioro, la modificación, la interrupción o la fragmentación de células no determinadas como pertenecientes al primer conjunto.

35 5.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además la provisión de una segunda vía de flujo transversal con respecto al eje geométrico de flujo y dispuesta en el extremo proximal de la primera vía de flujo, de manera que, después de atravesar el área de interrogación y llegar hasta el extremo proximal de la primera vía de flujo, las células se desplazan hasta el interior de la segunda vía de flujo y se alejan del área de interrogación.

6.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la provisión de una vía de flujo comprende además la provisión de una vía de flujo de la que al menos una porción está formada por un material que presenta un índice de refracción en el intervalo de entre 1,30 y 1,40, inclusive.

40 7.- El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además el ajuste del índice de refracción de una solución que contiene la población de células de manera que el índice de refracción de la solución sea como máximo de 0,2 del índice de refracción del material que forma la región de interrogación de la vía de flujo.

8.- Un aparato para la detección y la alteración de manera selectiva de una subpoblación deseada de células de una población de células de muestra, comprendiendo el aparato:

- 45 una vía (110) de flujo de fluido que presenta:
  - una primera sección de flujo que presenta un eje geométrico (130) de flujo, y
  - una segunda sección de flujo,
- cruzándose la primera y la segunda secciones de flujo en un extremo de medición de la primera sección de flujo;

un área (128) de interrogación dispuesta en o cerca del extremo de medición de la primera sección de flujo;

una entrada (114) de fluido de vaina en comunicación de flujo de fluido con la vía de flujo de fluido;

5 una lente (142) de objetivo que presenta un punto focal nominal y un eje geométrico (144) óptico, y dispuesta en el extremo de medición de la primera sección de flujo, estando la lente de objetivo alineada con la primera sección de flujo de manera que el punto focal nominal se sitúe a lo largo del eje geométrico de flujo y en el área de interrogación y de manera que el eje geométrico óptico esté alineado genéricamente de forma coaxial con el eje geométrico de flujo;

un detector dispuesto para detectar la luz focalizada por la lente de objetivo;

10 una rutina lógica acoplada de manera comunicativa al detector, operable para determinar si una célula de la población de células de muestra es una entre la subpoblación deseada de células y, así mismo, operable para emitir una señal en base a la determinación de si la célula es una entre la subpoblación deseada de células; y

15 Una fuente de energía controlable acoplada de manera comunicativa a la rutina lógica y operable para alterar de manera selectiva o bien células de la subpoblación deseada de células o bien células no de la subpoblación deseada de células de acuerdo con al menos la salida de señal procedente de la rutina lógica.

9.- El aparato de la reivindicación 8, que comprende además una fuente de energía de excitación.

10.- El aparato de la reivindicación 9, en el que la fuente de energía de excitación comprende un atenuador que incluye la fuente de energía controlable como entrada.

20 11.- El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que la energía emitida por la fuente de energía controlable pasa a través de la lente de objetivo.

12.- El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende además:

un cuerpo en el que está formada la vía de flujo; y

una ranura que forma la segunda sección de flujo en una primera superficie del cuerpo,

en el que el extremo de medición de la primera sección de flujo cruza la ranura en la primera superficie.

25 13.- El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende además:

un cuerpo en el que se forma la vía de flujo;

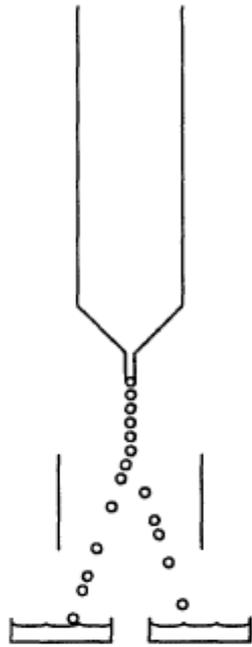
un primer canal interior a través del cuerpo, que se extiende desde una primera superficie del cuerpo hasta un punto del cuerpo y que forma la primera sección de flujo; y

30 un segundo canal interior a través del cuerpo que se extiende desde el punto del cuerpo hasta una segunda superficie del cuerpo.

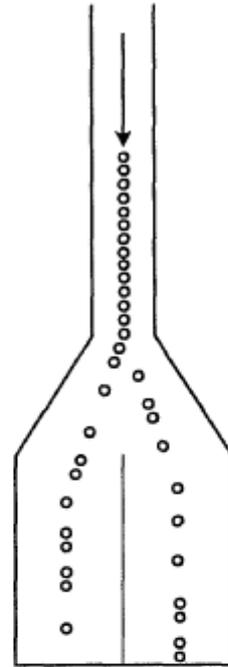
14.- El aparato de cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, en el que el cuerpo está formado por un material que presenta un índice de refracción de entre 1,30 y 1,40 inclusive.

15.- El aparato de la reivindicación 14, en el que el material comprende un perfluoropolímero amorfo, un fluoropolímero amorfo, o un polímero perfluoroalcoxi.

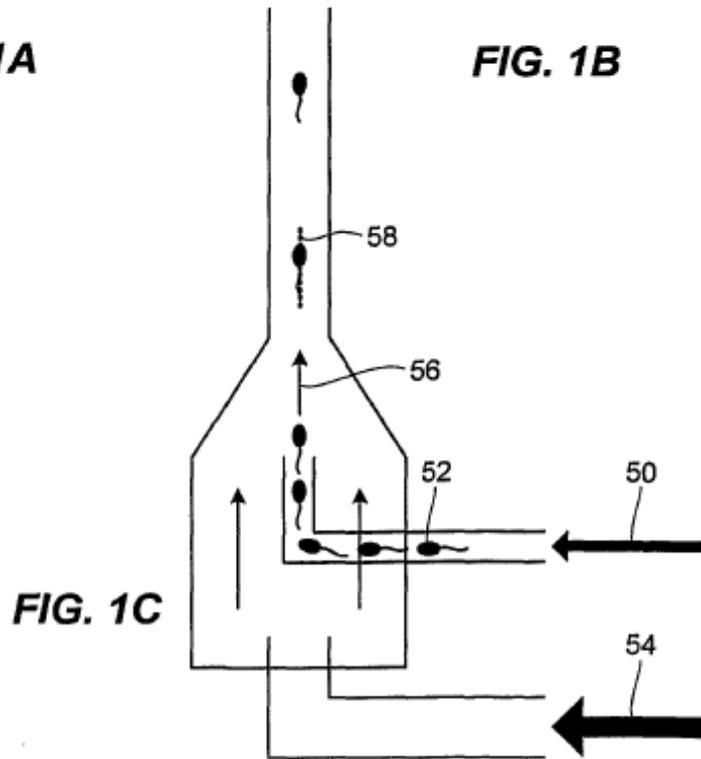
35



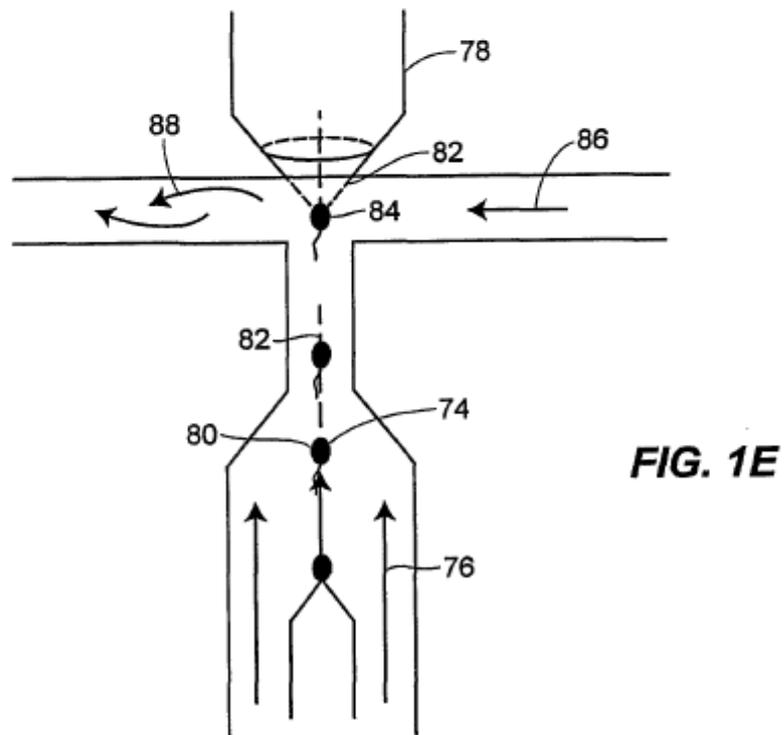
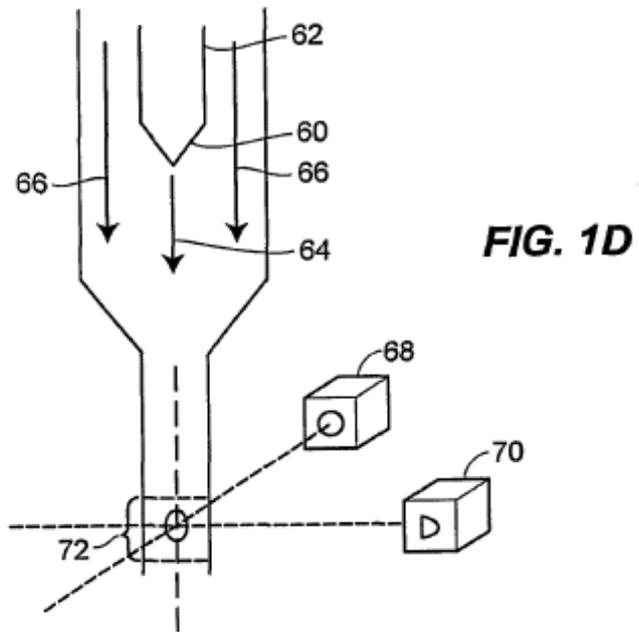
**FIG. 1A**

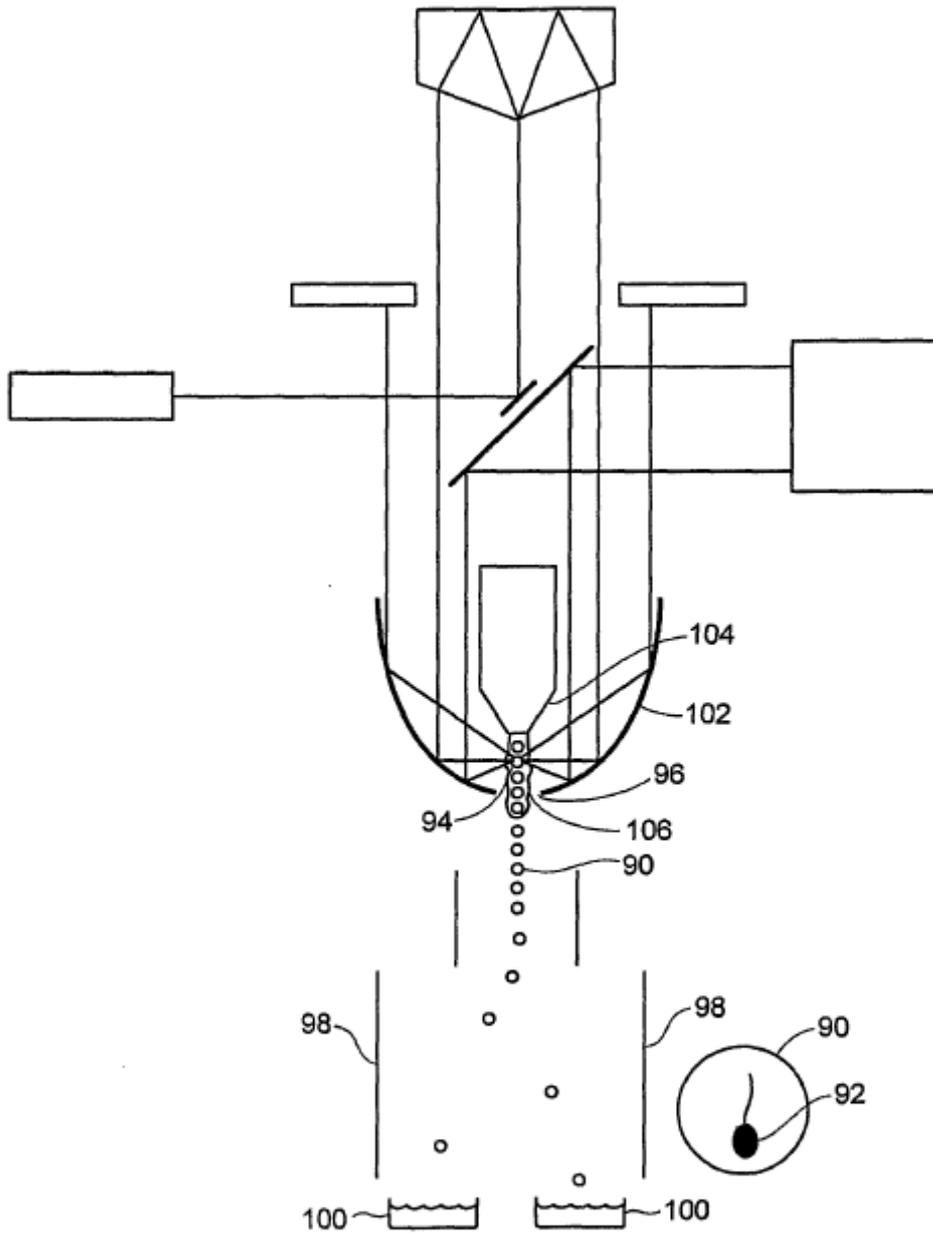


**FIG. 1B**

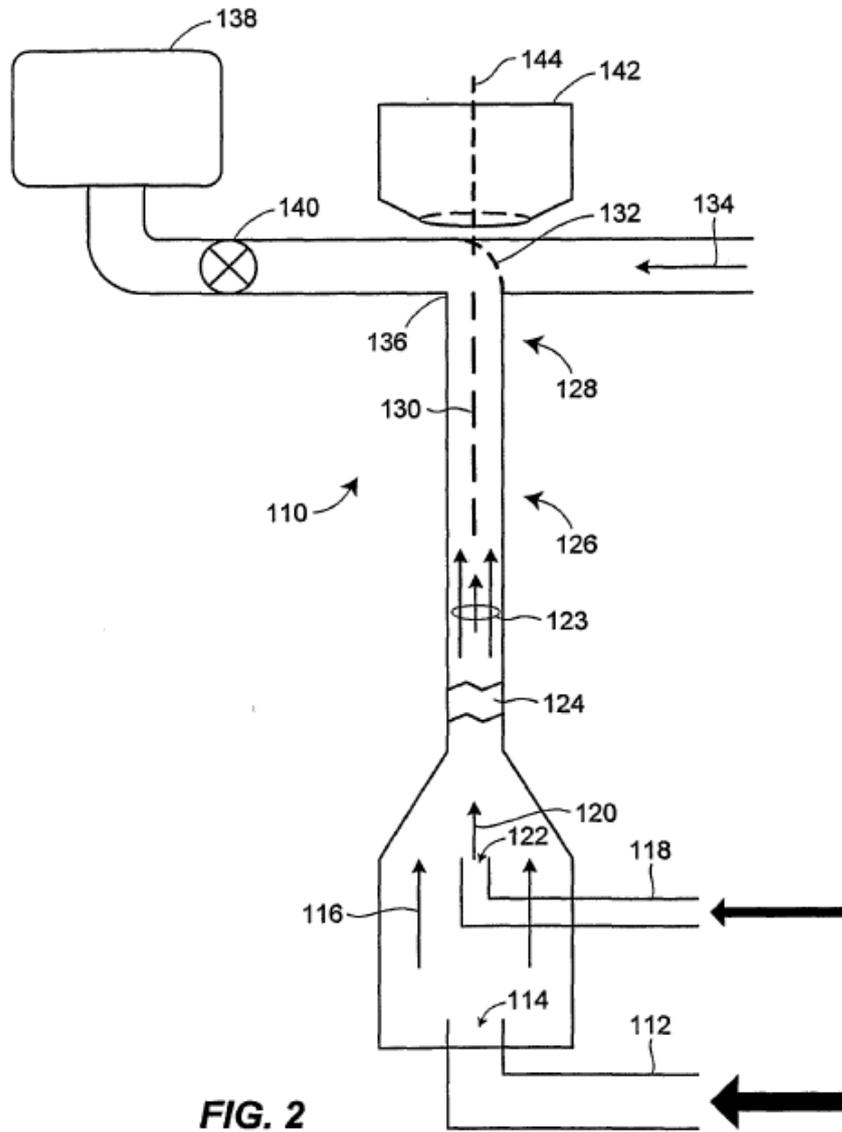


**FIG. 1C**





**FIG. 1F**



**FIG. 2**

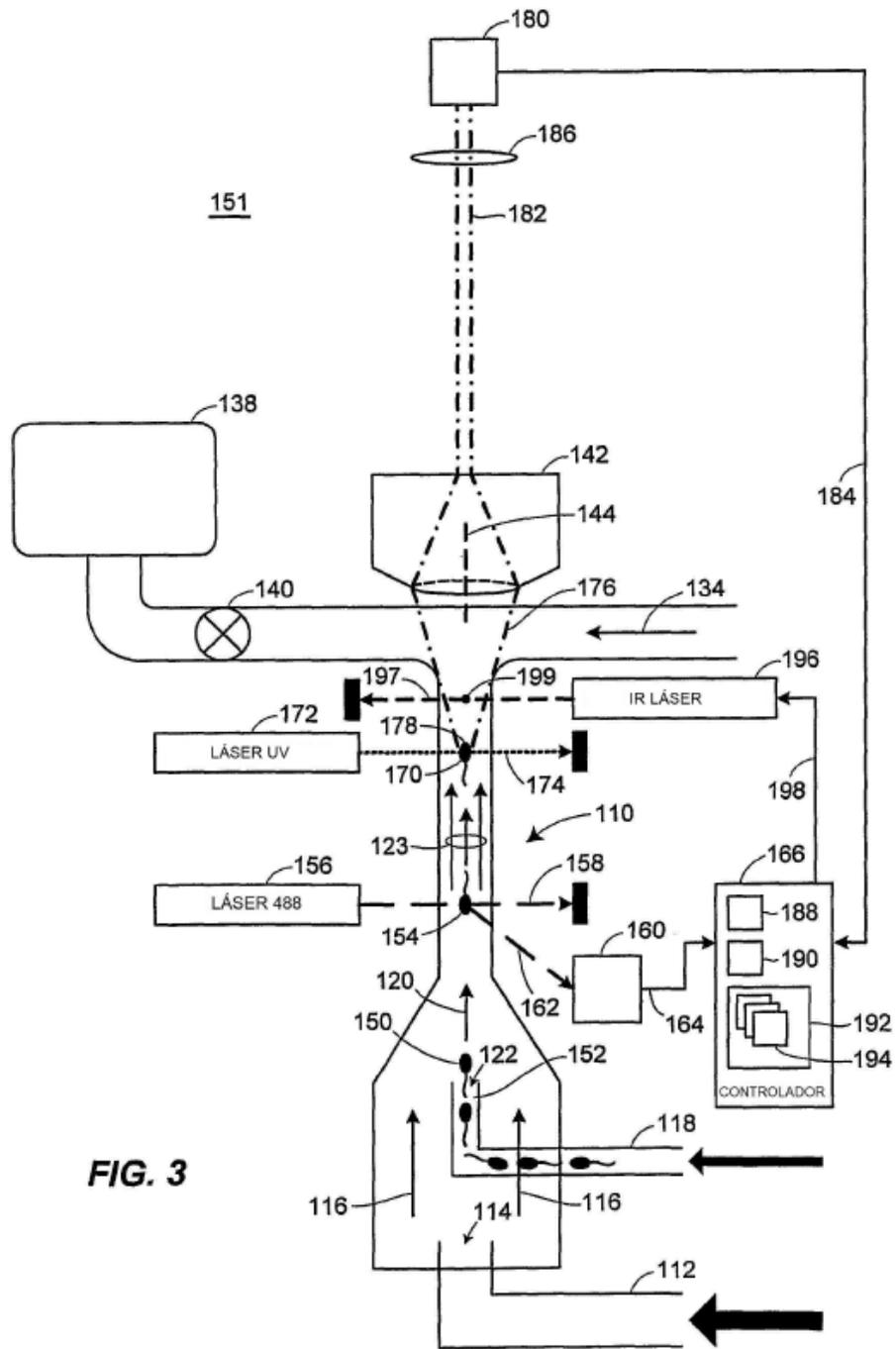


FIG. 3

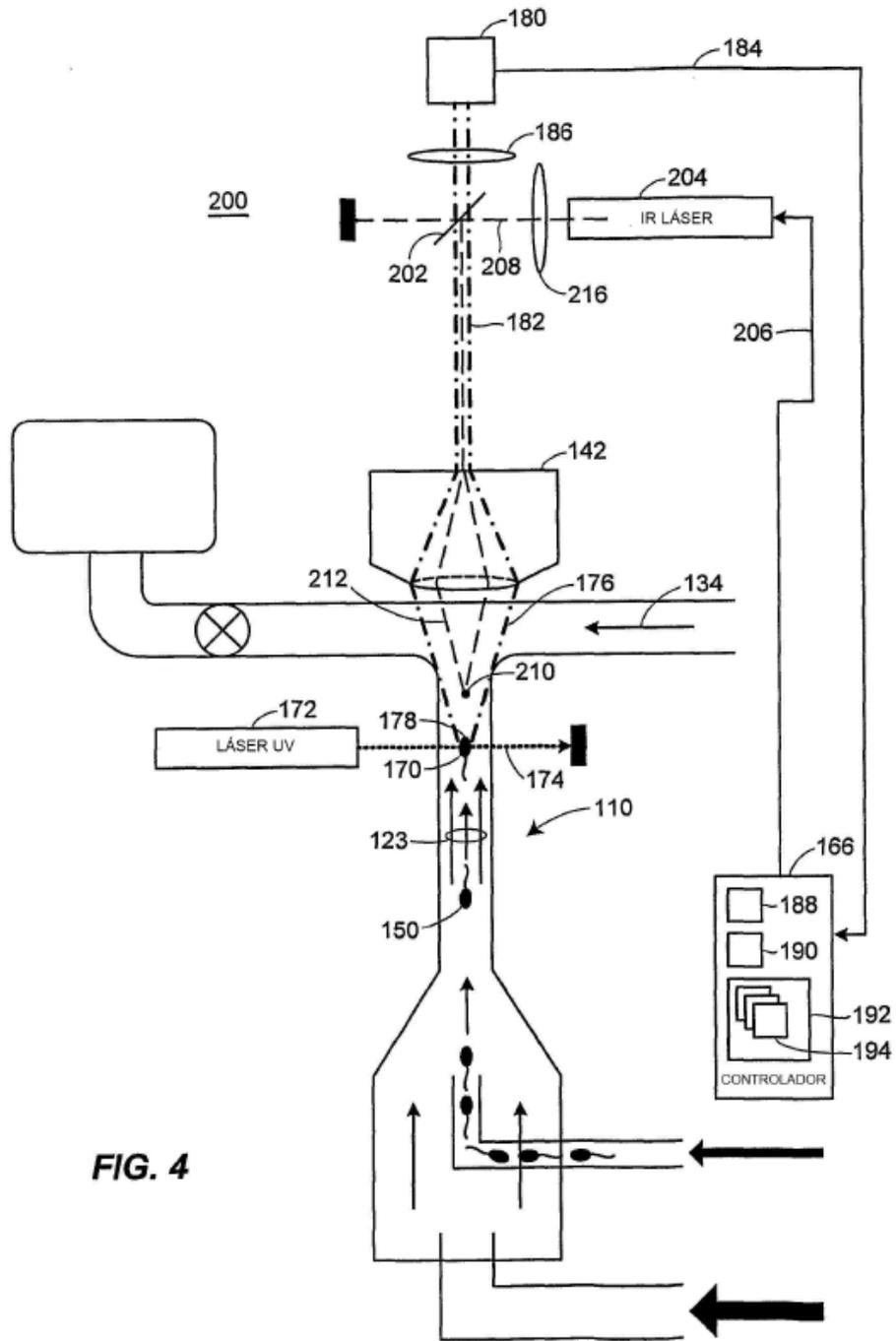


FIG. 4

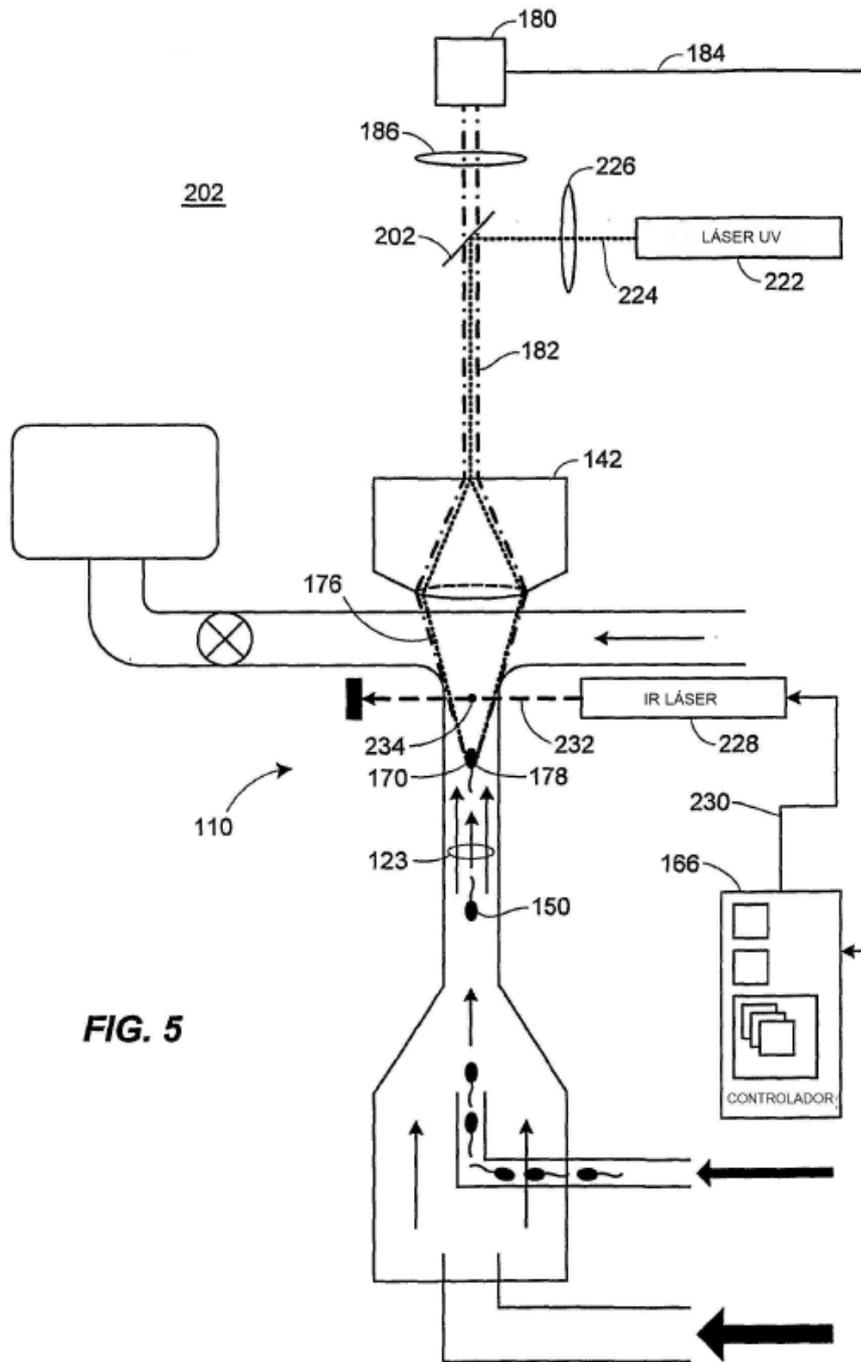
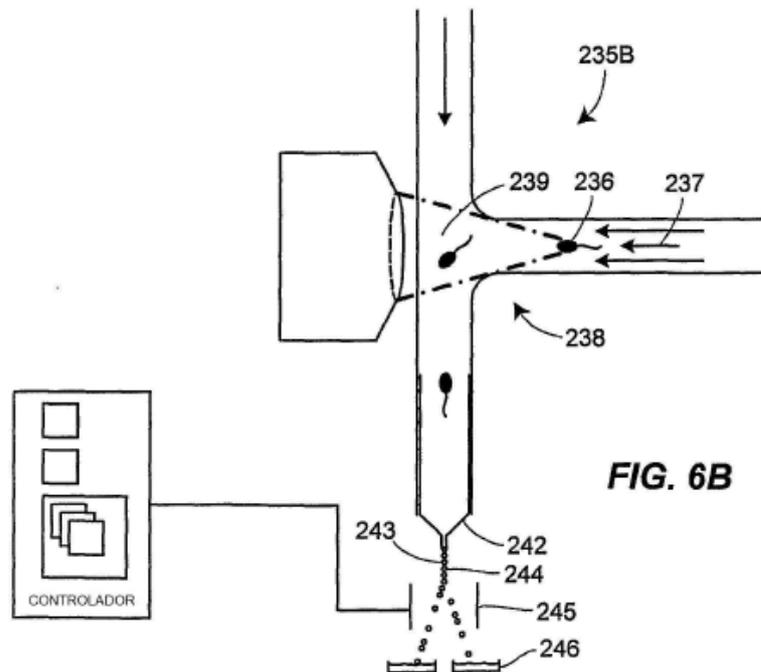
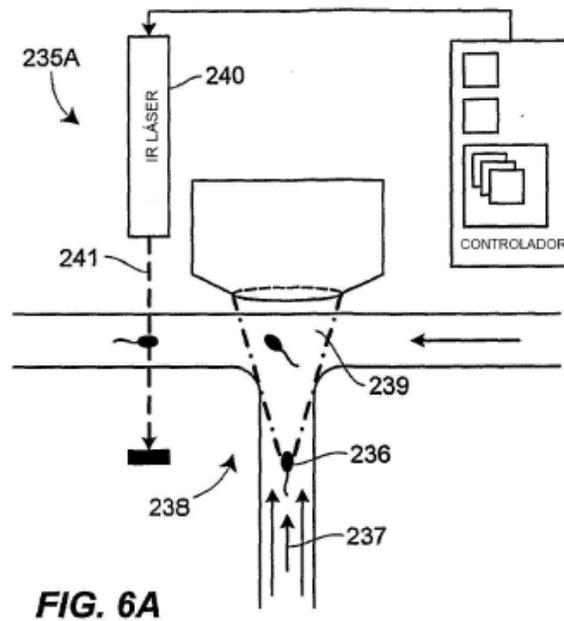
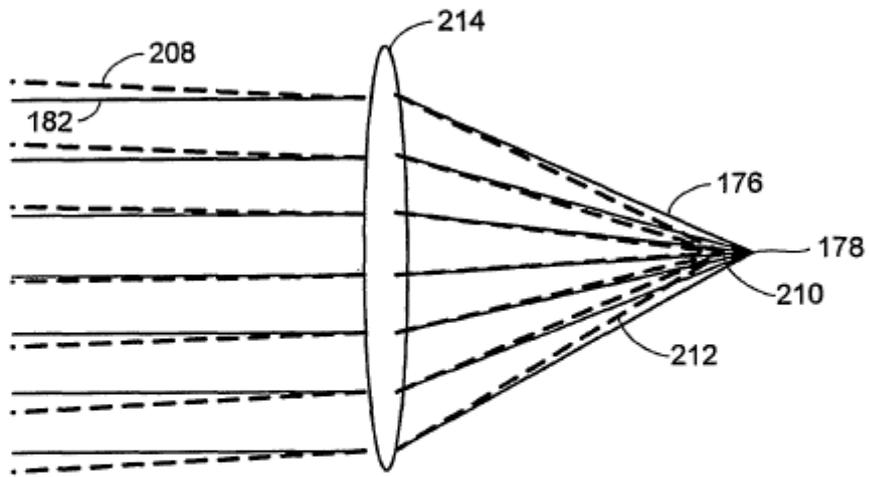
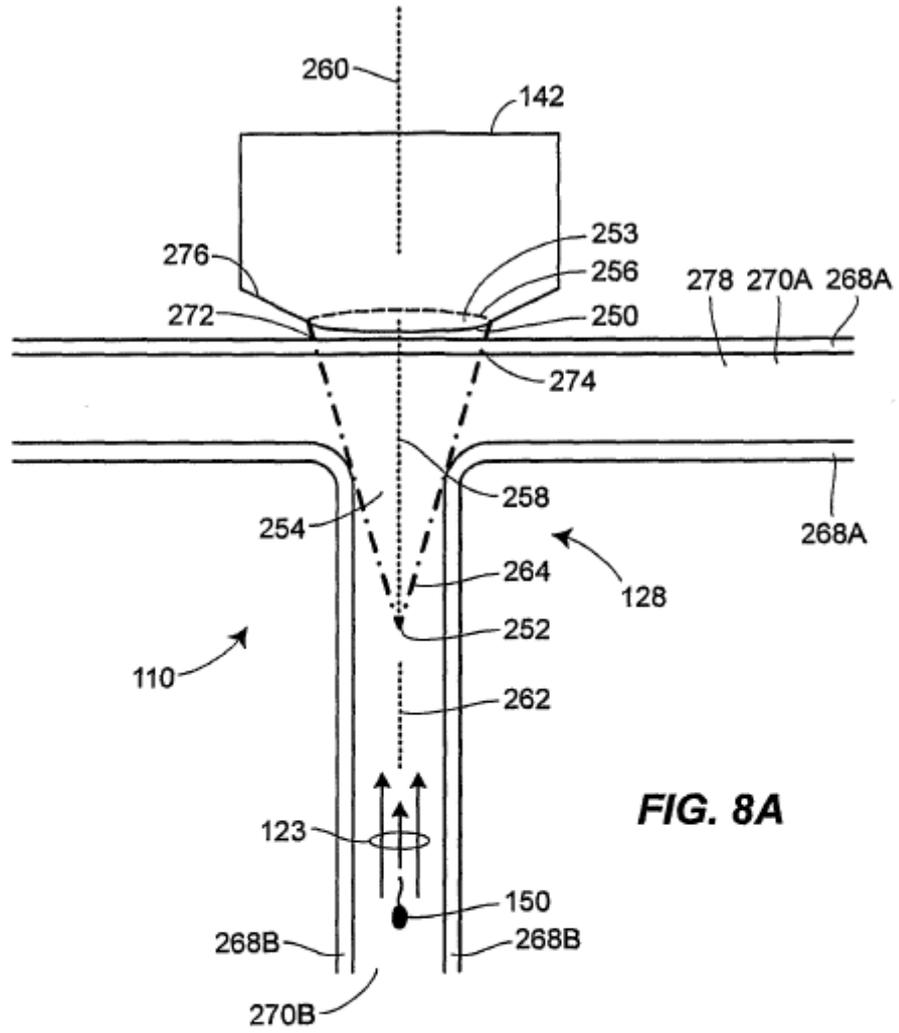


FIG. 5

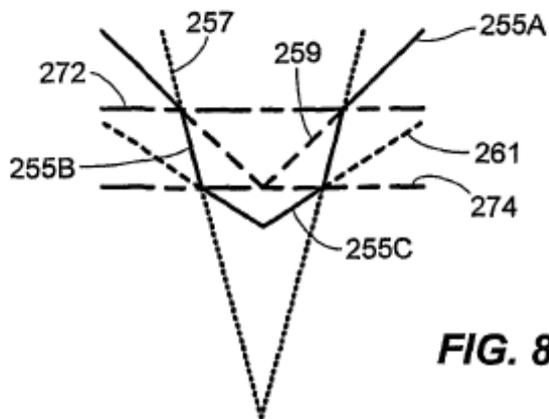




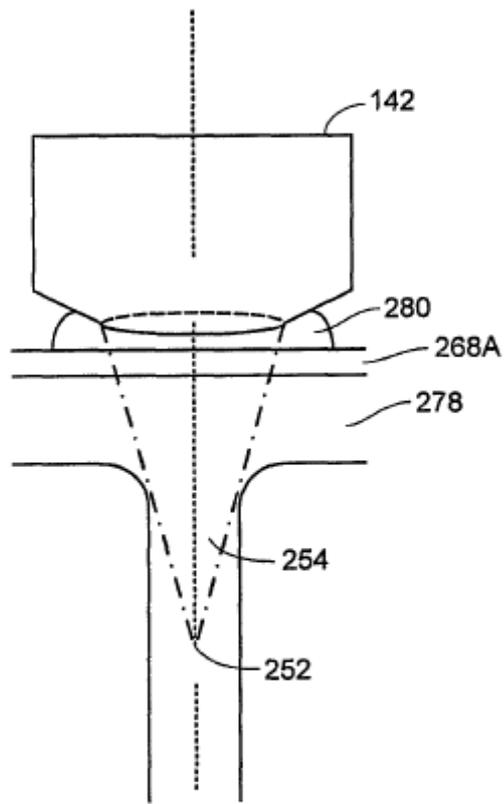
**FIG. 7**



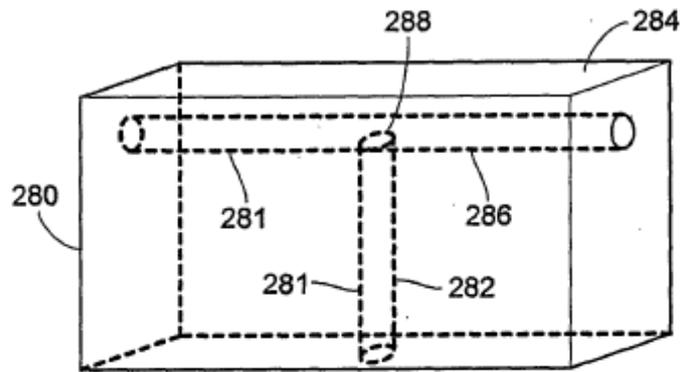
**FIG. 8A**



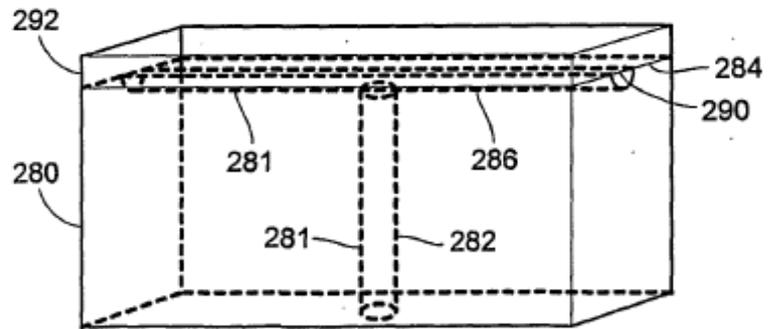
**FIG. 8B**



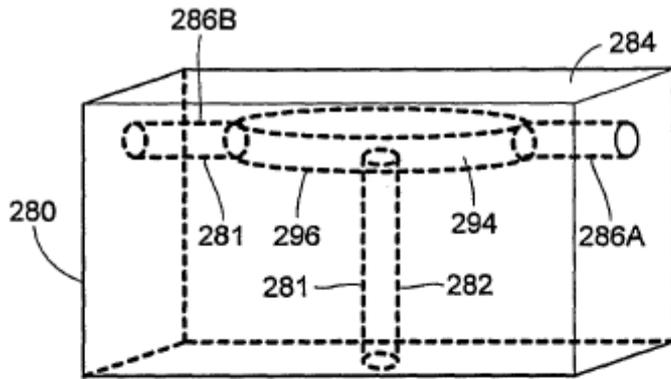
**FIG. 9**



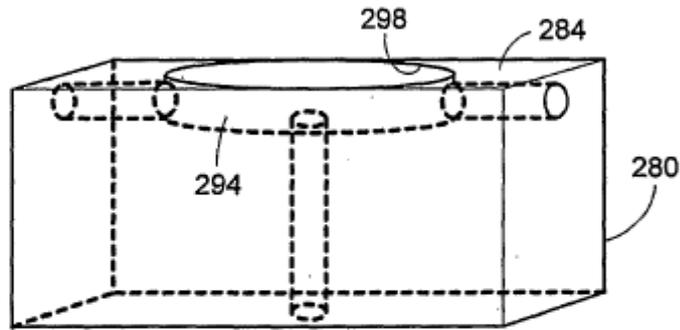
**FIG. 10**



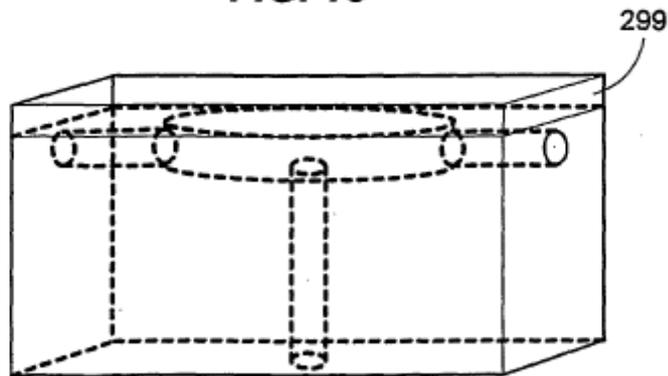
**FIG. 11**



**FIG. 12**



**FIG. 13**



**FIG. 14**

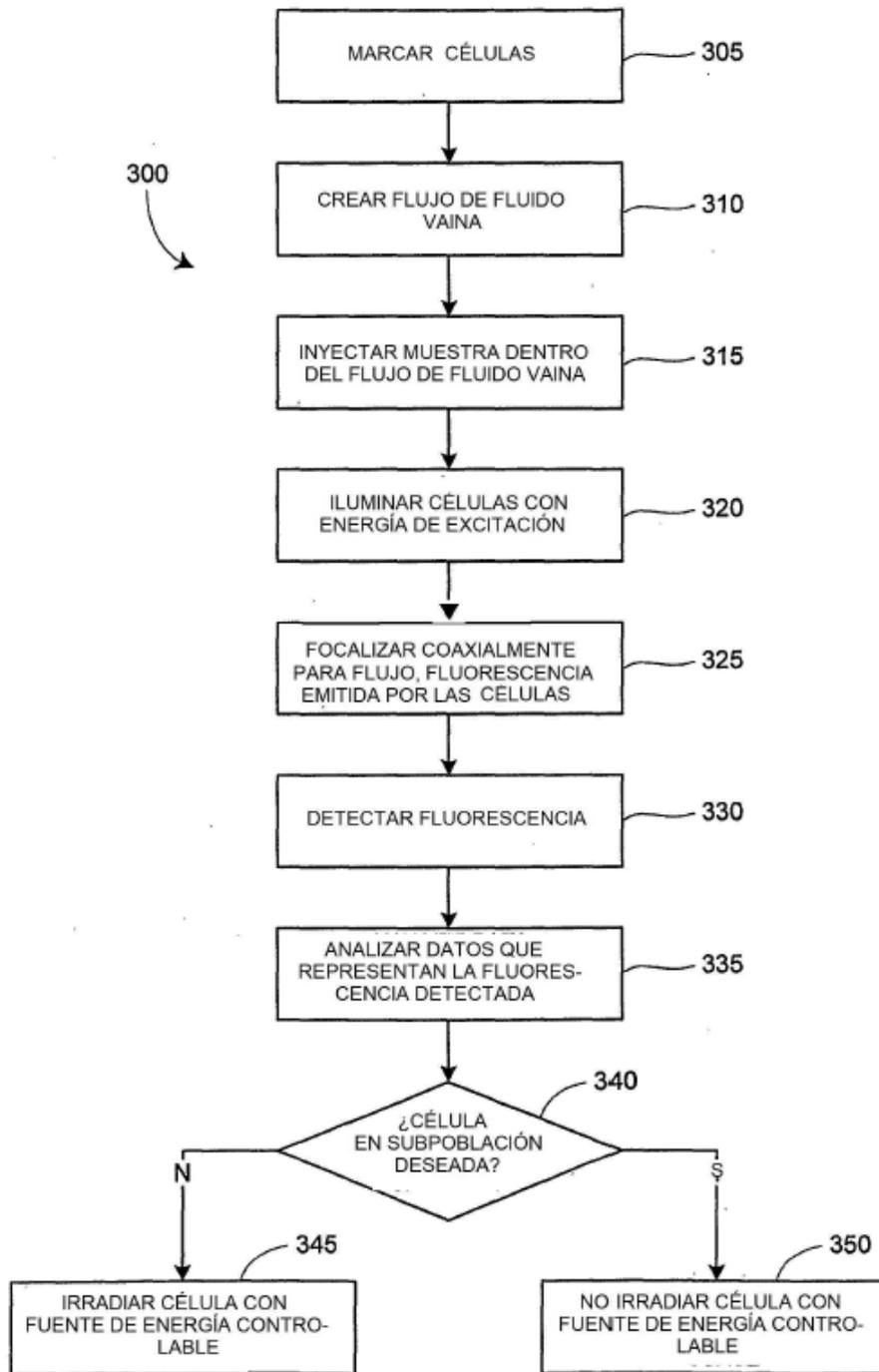


FIG. 15