

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 563**

51 Int. Cl.:

G01N 35/10 (2006.01)

G01N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2017 PCT/EP2017/064969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.12.2017 WO17220509**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2017 E 17736883 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020 EP 3472627**

54 Título: **Método para detectar células o partículas en un recipiente de líquido**

30 Prioridad:

21.06.2016 DE 102016211038

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

24.03.2021

73 Titular/es:

**CYTENA GMBH (100.0%)
Neuer Messplatz 3
79108 Freiburg, DE**

72 Inventor/es:

**SCHÖNDUBE, JONAS y
GROSS, ANDRE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 813 563 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para detectar células o partículas en un recipiente de líquido

La presente invención se refiere a aparatos y métodos para detectar células o partículas dispensadas por un dispensador al interior un subvolumen definido de un fluido ubicado en un recipiente de fluido.

Después de insertar células o partículas en un recipiente de fluido, es, a menudo, generalmente necesario detectar si la célula o la partícula se encuentra realmente en el recipiente de fluido. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales y otras proteínas, que subsiguientemente se denominan productos, se preparan mediante las llamadas líneas celulares monoclonales. Estas son poblaciones de células que se originan a partir de una sola célula. Esto asegura en la mejor medida que todas las células de la población comprenden aproximadamente el mismo genotipo y, por lo tanto, generan un producto que es lo más igual posible.

Para generar una línea celular monoclonal, se transfieren individualmente células a las llamadas placas de microtitulación y se multiplican allí de manera controlada hasta que se alcanza el tamaño de población deseado. El depósito de células individuales en las placas de microtitulación se realiza mediante métodos de impresión de chorro libre o pipeteando células individuales al interior de los cuencos o cavidades individuales de la placa de microtitulación, que en adelante se denominan 'pocillos'. Estos pocillos constituyen recipientes. Cuando se fabrican productos terapéuticos a partir de cultivos celulares, se debe demostrar por razones regulatorias que, en efecto, solo una célula estaba ubicada en el pocillo al comienzo del proceso. Es importante que el fondo del pocillo sea lo suficientemente grande, es decir, significativamente más grande que una célula, para permitir que la población crezca hasta el tamaño requerido. En última instancia, de una serie de unos pocos cientos a miles de tales poblaciones de clones, se transfiere para su fabricación la que produce el producto deseado de la manera más estable y en la mayor cantidad.

Se conocen en la técnica anterior métodos para detectar células en recipientes de fluido, por ejemplo, los pocillos de una placa de microtitulación.

El documento US 2014/0072997 A1 divulga un sistema y un método en donde las partículas clasificadas por un citómetro de flujo pueden ser depositadas directamente en el seno de una capa de deposición formada en la superficie de un disco óptico. Puede haber pocillos formados en la capa de deposición y las células depositadas pueden colocarse dentro de los pocillos individuales. La luz reflejada en la capa de deposición es detectada por un fotodetector para detectar el aterrizaje de gotitas.

En la divulgación "Aseguramiento de la monoclonalidad en una única ronda de clonación a través de la clasificación de células para el depósito de células individuales asociado con la obtención de imágenes de células de alta resolución", 2015, Instituto Americano de Ingenieros Químicos, Biotechnol. Prog., Vol. 00, N° 00, <http://doi.org/10.1002/btpr.2145>, K. Evans et al. describen un procedimiento para producir líneas celulares monoclonales. Las células son transferidas al pocillo de una placa de microtitulación por medio de un denominado aparato de FACS (FACS = clasificación de células activadas por fluorescencia –"fluorescent activated cell sorting"–). Después de eso, este es centrifugado para transportar las células al fondo. Subsiguientemente, se examina todo el fondo del pocillo bajo el microscopio, por lo común por medio de un denominado dispositivo de obtención de imágenes, y se buscan células individuales en el mismo, lo cual es efectuado por el usuario. En este caso, resulta extremadamente difícil reconocer una célula individual en el gran volumen de observación.

La citometría de flujo constituye un método conocido para analizar células haciendo pasar un voltaje eléctrico o un rayo de luz. Por ejemplo, el documento US 3.380.584 A describe un método para separar partículas en donde se emplea un método de impresión que comprende un chorro continuo, que tiene la desventaja de que se generan continuamente gotas sin que se pueda interrumpir la corriente de gotas de manera controlada. A la hora de clasificar selectivamente células o partículas mediante esta técnica, es, por tanto, necesario depositar las gotas en diferentes posiciones de acuerdo con el contenido. Esto ocurre por una desviación electrostática durante el vuelo. Cuanto mayor sea el número de posiciones y la precisión de deposición requerida (por ejemplo, en placas de 96 o 384 pocillos), más difícil y técnicamente complejo será el procedimiento. Se conocen por el documento EP 0 421 406 A2 aparatos y métodos para separar partículas en los que se usa un cabezal de impresión térmica para dispensar partículas. Las partículas se disponen arbitrariamente en el depósito y se analizan ópticamente tras su eyección, durante el vuelo. Los métodos descritos anteriormente permiten depositar células individualmente, pero no pueden lograr una eficiencia del 100 por ciento. Por lo tanto, las placas de microtitulación deben examinarse bajo el microscopio posteriormente mediante los denominados dispositivos de obtención de imágenes.

Se conocen por los documentos US 7.310.147 B2, EP 1 686 368 A2, US 8.417.011 B2 y US 8.795.981 B2 aparatos y métodos para detectar células y partículas en placas de microtitulación.

El documento US 7.646.482 B2 describe un método para encontrar automáticamente el plano focal correcto con el fin de, por ejemplo, examinar las células situadas en el fondo de un pocillo bajo un microscopio. En el curso de esto, el método detecta patrones en la señal del sensor, al tiempo que el microscopio enfoca a través de la parte inferior de la placa.

El documento US 8.383.042 B2 describe un dispositivo de obtención de imágenes que comprende un soporte de vacío. El soporte de vacío aspira la placa de microtitulación para mantener el fondo de la placa de microtitulación de manera plana y, de esta forma, proporciona una variación menor de la distancia del fondo del pocillo al objetivo.

5 Se conocen por el documento WO 2011/154042 A1 aparatos y métodos para dispensar una célula o una partícula en una gotita que vuela libremente.

10 El documento EP 1 626 278 A2 preconiza métodos para distribuir células dentro de un chip de cultivo celular. Una suspensión celular que incluye una célula es extraída de una primera pipeta insertada en una capa de aceite de silicio, y se extrae una solución de cultivo de una segunda pipeta insertada dentro de la capa de aceite de silicio. Al poner en contacto las puntas de la primera y la segunda pipetas con las paredes de un pocillo situado en un sustrato, se forma automáticamente una gotita dentro del pocillo. El área del pocillo destinada a formar la gotita y las puntas de las pipetas se vigilan con una cámara dispuesta por debajo del sustrato.

15 El documento US 2015/253223 A1 describe un sistema de separación de partículas que utiliza un dispositivo de manipulación de partículas microfabricado, basado en MEMS, el cual tiene un canal de entrada, canales de salida y un miembro móvil formado en un sustrato para clasificar una o más partículas objetivo de una corriente de muestra. El sistema puede incluir un dispositivo de interposición que recibe la partícula clasificada y dispensa con ella un fluido portador para formar una gotita de líquido que contiene la partícula. La gota se puede dispensar, a continuación, a una placa de microtitulación, de modo que cada pocillo en la placa de titulación pueda contener una única partícula objetivo. Se proporciona un sistema de detección, tal como un dispositivo de obtención de imágenes ópticas, para determinar si ha caído una gotita.

20 El documento US 4 667 830 A preconiza métodos para clasificar partículas individuales situadas dentro de recipientes, tales como los pocillos de una bandeja de microcultivo. Las partículas pueden comprender, por ejemplo, células biológicas individuales que pueden ser entonces cultivadas, clonadas, analizadas o sometidas a procesos similares. Las partículas son incorporadas al seno de una corriente de flujo que es eyectada como un chorro desde una boquilla que se hace vibrar en la dirección de la corriente para romper la corriente de chorro en gotas discretas. Un sensor de partículas detecta partículas en la corriente, y un procesador de señal, en respuesta a la salida del sensor de partículas, produce una salida cuando la partícula detectada es del tipo que se ha de clasificar de la corriente.

25 Los presentes inventores se han dado cuenta de que los métodos de dispensación actuales para depositar individualmente pueden detectar y depositar células con alta eficiencia, pero no son fiables al 100%.

30 Es el propósito de la presente invención proporcionar un método que pueda detectar células o partículas situadas en un recipiente de fluido con una alta fiabilidad.

Este propósito se logra mediante un método de acuerdo con la reivindicación 1.

35 En ciertas realizaciones de la invención, el objeto, es decir, la célula o la partícula, tal como la célula individual o la partícula individual, no se detecta ni en el dispensador ni en una gota que vuela libremente y en la que se ha dispensado el objeto. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la detección no ocurre durante el transporte, por ejemplo, hasta el interior del pocillo de una placa de microtitulación. En lugar de ello, la célula o la partícula es detectada al entrar en el fluido o inmediatamente después de entrar en el fluido que llena al menos parcialmente el recipiente de fluido en donde se ha de detectar la célula o la partícula. Por lo tanto, esas realizaciones permiten una verificación fiable de que la célula o la partícula ha terminado en el recipiente de fluido y está realmente ubicada en el recipiente de fluido. En las realizaciones, el dispensador dispensa una gota que vuela libremente y en la que se encuentra encapsulado el objeto, es decir, la célula o la partícula, de modo que es posible, en tales realizaciones, una verificación fiable de que la gota realmente ha aterrizado dentro del recipiente de fluido, por ejemplo, un pocillo de una placa de microtitulación.

Se detallarán sucesivamente realizaciones de la presente invención, haciendo referencia a los dibujos que se acompañan, en los cuales:

45 La Figura 1 muestra una ilustración esquemática de un aparato para detectar células o partículas en un recipiente de fluido;

La Figura 2 muestra una ilustración esquemática de un aparato que comprende un sensor óptico;

La Figura 3 muestra una ilustración esquemática de un recipiente de fluido;

50 La Figura 4 muestra un diagrama de flujo de una realización de un método para detectar células o partículas en un recipiente de fluido;

La Figura 5 muestra una comparación de una realización de un método que aquí se describe para detectar células o partículas en un recipiente de fluido, con un método conocido; y

La Figura 6 muestra ilustraciones esquemáticas de recipientes de fluido para explicar problemas que ocurren en métodos conocidos.

Antes de que las realizaciones se describan sucesivamente, debe apreciarse que la invención no está restringida por estas realizaciones especiales, sino por la redacción de las reivindicaciones.

Por otra parte, en primer lugar, se describen algunos de los términos utilizados en esta memoria. Se entiende que un dispensador es un aparato configurado para dispensar células o partículas. Ejemplos de dispensadores pueden ser generadores de gotas configurados para dispensar cantidades líquidas en forma de gotas que vuelan libremente. Se entiende que una tecnología de impresión por demanda es una tecnología de impresión que permite generar selectivamente gotas individuales desde una boquilla en un momento escogido en el tiempo. Por el contrario, se entiende que una tecnología de impresión de chorro continuo es una tecnología de impresión en la que se dispensa un chorro de líquido continuo y delgado desde una boquilla de una manera impulsada por presión. Al aplicar una oscilación de alta frecuencia en la boquilla, tras la descarga, el chorro se desintegra en gotas individuales que pueden ser desviadas electrostáticamente, entre otras cosas. Se entiende que un volumen de observación es una zona volumétrica de una altura específica, en la que se realizan mediciones u observaciones. Los volúmenes de observación se pueden disponer en una cuadrícula bidimensional definida de una cierta altura. Se entiende que una placa de microtitulación es una placa que contiene varias cavidades (pocillos) aisladas unas de otras, en filas y columnas. A menudo, las placas de microtitulación son rectangulares y habitualmente son de plástico. Se entiende que un dispositivo de obtención de imágenes es un aparato que forma imágenes, tal como un microscopio automático que, por ejemplo, permite examinar placas de microtitulación completas bajo un microscopio. En este caso, se configuran dispositivos de obtención de imágenes para fotografiar individualmente cada pocillo de la placa de microtitulación en alta resolución. Sucesivamente, esto permite al usuario encontrar células individuales en los pocillos.

Como se ha explicado anteriormente, los sistemas conocidos carecen de la verificación de que una gota dispensada que comprende una célula o una partícula realmente haya aterrizado dentro del pocillo de una placa de microtitulación. Para este propósito, se ha venido utilizando generalmente una tecnología secundaria tal como un dispositivo de obtención de imágenes. De acuerdo con ello, el usuario, luego, no sabe si la célula individual deseada realmente ha alcanzado el pocillo, en tanto en cuanto ella/él únicamente está usando el sistema dispensador.

Por otra parte, también se ha constatado que hay más problemas a la hora de utilizar dispositivos de obtención de imágenes. El área que ha de ser fotografiada por el dispositivo de obtención de imágenes es enorme en comparación con una célula, en un factor de aproximadamente 1: 1.000.000. A fin de garantizar que solo haya una célula en el pocillo, se debe hacer un barrido de toda el área del pocillo. Al mismo tiempo, la resolución debe ser lo suficientemente alta como para que la célula pueda identificarse como tal de manera fiable. Cuanto mayor sea la resolución, menor será el campo de la imagen, y más tiempo llevará el barrido. Por otra parte, el barrido requiere captar varias imágenes de una manera desplazada espacialmente y combinar estas en una imagen global. Si la célula se encuentra exactamente entre dos de esas imágenes, puede producirse un recorte o, en el peor de los casos, la desaparición de la ilustración de la célula como consecuencia de la combinación. Además, la profundidad focal óptica es limitada debido a la alta resolución óptica. Si el sistema no es enfocado con precisión, las células se ven borrosas y, en el peor de los casos, pueden pasarse por alto. El barrido de todo el volumen del pocillo, es decir, de todos los planos focales desde el fondo hasta la superficie del líquido, es costoso en lo que respecta al tiempo y al consumo de datos y, por lo tanto, difícilmente factible. Usando la tecnología actual de dispositivos de obtención de imágenes, tomaría aproximadamente diez horas efectuar un barrido de una placa de 96 pocillos. El volumen de datos resultante sería de unos 40 GB. De acuerdo con la cantidad de placas y el tiempo que tendrían que estar almacenados los datos, esto no sería posible. Por otra parte, es necesario transportar las células hasta el plano focal, es decir, hasta el fondo del pocillo, antes del barrido. Por lo común, esto se logra por centrifugación después de la deposición de las células. Para este propósito, las placas son centrifugadas a altas fuerzas centrífugas hasta que las células se sitúan en el fondo. Debido a la ocurrencia de fuerzas centrífugas radiales durante la aceleración y desaceleración, las células pueden ser transportadas al exterior. Entonces, a menudo vienen a reposar en las esquinas de los pocillos. Allí, son muy difíciles de identificar. Las placas de microtitulación están sujetas a tolerancias de fabricación, a pesar de su generalizada normalización. La altura del fondo del pocillo puede variar tanto en el total como de pocillo a pocillo. Esto hace que el nivel en donde se encuentran las células y, por lo tanto, el foco no sea uniforme. Un enfoque incorrecto puede emborronar los objetos hacia el borde.

Debido a la forma en que las placas de microtitulación se producen mediante moldeo por inyección o embutición profunda, los pocillos generalmente comprenden bordes de desmoldeo y las esquinas de la parte inferior no están a 90°, sino que siempre son ligeramente redondeadas. Esto da como resultado fuertes efectos de difracción y de sombreado en el dispositivo de obtención de imágenes. Por lo tanto, las células que vienen a descansar en las esquinas posiblemente no se identifiquen de manera inequívoca o de ningún modo en absoluto. Si el fondo del pocillo se hace más alto hacia el borde, las células solo están enfocadas en el centro, y están fuera de foco en el exterior. Por otra parte, las células individuales pueden ser representadas dos veces debido a los efectos de refracción. Puede aparecer una imagen denominada fantasma de la célula en las proximidades inmediatas de la imagen real. Por lo tanto, sin embargo, no se puede determinar de manera fiable si se trata de una imagen fantasma o realmente de una segunda célula.

Como se ha descrito anteriormente, las placas de microtitulación habitualmente se llevan de un sistema dispensador a un sistema de obtención de imágenes para verificar si hay células o partículas dispuestas en los pocillos de las placas de microtitulación. A través de las necesarias etapas de centrifugación y cambio de las placas de microtitulación entre aparatos, así como a través del tiempo transcurrido entre el depósito de la célula por dispensación y su detección

dentro del pocillo, las células del pocillo prácticamente pueden llegar a descansar en cualquier lugar del fondo del pocillo. En el lado izquierdo, la Figura 6 muestra un recipiente de fluido 100 en donde una célula 102 se ha hundido hasta el fondo del recipiente de fluido 100, por ejemplo, el pocillo de la placa de microtitulación, por asentamiento debido al tiempo transcurrido. La ilustración del medio de la Figura 6 muestra un movimiento de la célula 102 sobre el fondo por un transporte. La ilustración del lado derecho de la Figura 6 muestra un movimiento de la célula 102 por medio de fuerzas centrífugas, ya que estas pueden ocurrir debido a la centrifugación, por ejemplo. Estas observaciones muestran que las células del pocillo prácticamente pueden descansar en cualquier parte del fondo, y ocurre que, a menudo, llegan a descansar en las esquinas.

El hecho de cambiar a otros sustratos que comprendan un área inferior del pocillo más pequeña resolvería teóricamente algunos problemas, tales como la combinación de las imágenes. Sin embargo, esto tiene otros inconvenientes. La relación entre una superficie plana del fondo del pocillo y la región del borde no plana, en la que se producen sombreado y desenfoque, pasaría al terreno negativo. La probabilidad de que una célula quedase reposando en el borde aumentaría. El área del fondo del pocillo o, sobre todo, el volumen del pocillo disponible para el crecimiento de las células sería significativamente menor. Las células crecerían peor y no podrían formar poblaciones suficientemente grandes. Esto haría que todo el procedimiento de trabajo fuera más complejo. Debido al pequeño volumen del pocillo, el medio tendría que sustituirse o aportarse hasta el llenado con el fin de suministrar nutrientes a las células durante un período de tiempo suficientemente largo. Aumentaría el riesgo de contaminación cruzada o la probabilidad de muerte prematura de la población.

Por lo tanto, los presentes inventores se han dado cuenta de que una tecnología de dispensación por sí sola no es suficiente para la verificación de la presencia de una sola célula dentro de un recipiente de fluido, tal como un pocillo de una placa de microtitulación. Además, debido a los problemas descritos anteriormente, los dispositivos de obtención de imágenes también ven limitada su significación en este caso. En última instancia, esto puede llevar al hecho de que la población óptima seleccionada para la producción no pueda ser identificada de manera fiable como monoclonal y, por lo tanto, tenga que ser desechada. Esto conduce a altos riesgos económicos y elevados costos.

Las realizaciones de la invención proporcionan aparatos y métodos que resuelven los problemas descritos anteriormente y permiten una detección fiable incluso de células o partículas individuales contenidas en un recipiente de fluido.

En la Figura 1, se muestra un aparato para detectar células o partículas. El aparato incluye un recipiente de fluido 10. Por ejemplo, el recipiente de fluido puede ser un pocillo (cavidad) de una placa de microtitulación que comprende un conjunto geométricamente ordenado de pocillos correspondientes. El recipiente de fluido puede comprender un fondo y paredes laterales que limitan un volumen del recipiente de fluido y permiten que el recipiente de fluido se pueda llenar al menos parcialmente con un fluido. El recipiente de fluido 10 está hecho de un material transparente. El recipiente de fluido 10 está al menos parcialmente lleno con un fluido 12, tal como un líquido. Por ejemplo, el líquido puede ser una solución nutritiva para un cultivo celular. A continuación, se hace referencia a un líquido 12. El aparato comprende, además, un dispensador 14, configurado para dispensar al menos una célula o partícula 16 dentro de un subvolumen definido 18 del líquido 12. El dispensador 14 puede ser un dispensador de goteo por demanda configurado para dispensar una sola gota, dentro de la cual se encapsula una célula o una partícula, desde una boquilla 22. El dispensador 14 se coloca o se puede colocar en relación con el recipiente de fluido 10 de un modo tal, que la célula o la partícula se dispense dentro del subvolumen definido 18. En consecuencia, el dispensador puede haberse configurado para dispensar gotas individuales desde una suspensión celular o una suspensión de partículas, y puede comprender una estructura como la que se describe en el documento WO 2011/154042 A1, por ejemplo.

El aparato comprende, además, un aparato de detección 22 configurado para realizar, de manera coordinada en el tiempo con la dispensación de la al menos una célula 16 (o de la al menos una partícula) por el dispensador 14, una detección dentro del subvolumen 18 definido y/o de uno o varios subvolúmenes situados por debajo del subvolumen definido, con el fin de detectar al menos una célula 16 cuando entra en el fluido 12 o inmediatamente después de entrar en el fluido 12.

En ciertos ejemplos, el recipiente de fluido forma parte del aparato. En ciertos ejemplos, el recipiente de fluido no forma parte del aparato y puede proporcionarse independientemente del aparato.

Con respecto a la explicación del subvolumen definido y de los uno o varios subvolúmenes dispuestos por debajo del subvolumen definido, se hace referencia a la Fig. 3, que muestra una vista esquemática en perspectiva del recipiente de fluido 10. En la Figura 3, los subvolúmenes se ilustran como rodajas, de tal manera que el subvolumen definido 18 está constituido por la rodaja superior. El subvolumen definido 18 se extiende hacia abajo en una profundidad predeterminada desde la superficie líquida del líquido dispuesto en el recipiente de fluido 10. La profundidad de cada subvolumen puede corresponder a la profundidad de foco de un plano focal del aparato de detección. Por ejemplo, esta puede encontrarse en el intervalo de 40 μm a 60 μm . En la ilustración de la Figura 3, por razones de simplificación, se supone que el líquido llena completamente el recipiente 10. En realidad, el recipiente solo se llenará habitualmente de forma parcial con el líquido. Como puede observarse en la Figura 3, el área A1 del subvolumen definido 18 es significativamente más pequeña que el área A2 del recipiente de fluido 10. Aquí, se entiende que el área es el área paralela a la superficie del líquido. Los uno o varios subvolúmenes bajo el subvolumen definido 18 están dispuestos por debajo del subvolumen 18 con profundidad creciente. Los subvolúmenes pueden solaparse en una dirección

perpendicular a la superficie del líquido. Los subvolúmenes 18 y 18a-18d pueden haberse configurado, cada uno de ellos, de modo que pueda producirse una detección por parte del aparato de detección 22 en todo el subvolumen. Por ejemplo, los subvolúmenes están dimensionados de tal manera que un sensor de obtención de imágenes puede generar una imagen enfocada del subvolumen respectivo.

El dispensador 14 y el aparato de detección 22 pueden estar conectados con un control 24 que coordina la dispensación de la célula o la partícula por parte del dispensador y su detección por parte el aparato de detección 22 de una manera regulada en el tiempo. El control puede estar dispuesto en el dispensador o en el aparato de detección. Como es obvio para las personas expertas en la materia, el control puede implementarse mediante, por ejemplo, medios informáticos programados en consecuencia o mediante un circuito integrado específico del usuario. En un ejemplo que no forma parte de la presente invención, el aparato de detección puede estar configurado para detectar la al menos una célula o la al menos una partícula no más tarde de diez segundos después de entrar en el fluido, es decir, el fluido 12. Por ejemplo, el aparato de detección puede haberse configurado para realizar la detección en uno de los subvolúmenes cuando se espera que la célula o la partícula se encuentre en el subvolumen. Si la detección se produce en el subvolumen 18 dispuesto directamente debajo de la superficie del líquido 12, la detección puede ocurrir inmediatamente después de la dispensación por el dispensador, por ejemplo, dentro de un segundo o en un período de tiempo aún más corto. En ciertas realizaciones de la invención, el aparato de detección está configurado para detectar la célula o la partícula en un subvolumen dispuesto por encima del fondo del recipiente de fluido. Por lo tanto, el objeto puede detectarse antes de que llegue al fondo del recipiente de fluido.

La Figura 2 muestra un aparato para detectar células o partículas, de tal manera que el aparato de detección comprende un sensor óptico 32. Un dispensador (no mostrado en la Figura 2) está configurado para dispensar gotas 34 de una suspensión celular, estando dispuesta una célula 16 en la gota 34. El dispensador dispensa la gota al interior del recipiente de fluido 10, por ejemplo, que tiene la forma de un pocillo de una placa de microtitulación, y que se ha llenado previamente con un medio celular 12. En ciertas realizaciones, la forma del recipiente de fluido se puede seleccionar de tal modo que la superficie del fluido sea plana. Un sensor óptico 32, tal como un microscopio que comprende un foco ajustable, se encuentra situado debajo del recipiente de fluido transparente 10. Una célula/una partícula ya se ha captado con el sensor óptico cuando el fluido entra en el recipiente de fluido 10. El sensor óptico comprende una cámara y una óptica. El sensor óptico 32 se enfoca sobre el sistema a través del recipiente de fluido transparente. Para esto, el sensor óptico 32, que consiste en un aparato de captación de imágenes, se enfoca sobre un subvolumen definido, situado directamente debajo de la superficie del líquido 12. Por ejemplo, el sensor óptico 32 puede enfocarse sobre un subvolumen situado directamente por debajo de la superficie del líquido o sobre un subvolumen situado a una profundidad de menos de 5 mm desde la superficie del líquido 12. El objetivo es verificar que la célula/la partícula aterrice realmente dentro del depósito. No es necesario esperar hasta que la célula/la partícula se haya hundido hasta el fondo del depósito. En la detección descrita, no es importante dónde del fondo del recipiente de fluido se detenga finalmente la célula/la partícula.

En ciertas realizaciones, se pueden dispensar gotas individuales de una suspensión celular o una suspensión de partículas, cada una de las cuales comprende un volumen de aproximadamente 200 pl, al interior de un pocillo de una placa de microtitulación. Por ejemplo, el pocillo puede llenarse hasta la mitad con un líquido de antemano, al tiempo que el foco del sensor óptico puede mantenerse constantemente por debajo de la superficie del líquido. De esta forma, la célula/la partícula puede asentarse a través del plano focal del sensor óptico 32, que puede ser un microscopio óptico. La captación de una imagen de manera coordinada en el tiempo con la dispensación de la célula/la partícula permite una detección fiable de la célula/la partícula en el recipiente de fluido. Además, en ciertas realizaciones, se pueden captar una serie de imágenes del subvolumen definido (o de varios subvolúmenes definidos) con el fin de hacer posible una detección aún más fiable de la célula/partícula. Experimentos prácticos han demostrado que, mediante el uso de una estructura de este tipo, es fácilmente posible reconocer que el objeto (la célula/la partícula) contenido en el volumen de observación (el subvolumen definido) penetra en el líquido y, subsiguientemente, se asienta hacia el fondo, donde puede ser observado por el sensor óptico.

En realizaciones alternativas, el plano focal del sensor óptico puede ser desplazado en contra del movimiento de asentamiento del objeto con el fin de reducir el tiempo hasta su detección. En otras palabras, el aparato de detección puede haberse configurado para, comenzando por un subvolumen a una profundidad mayor, realizar detecciones sucesivas en varios subvolúmenes a una profundidad respectivamente decreciente.

El hecho de realizar varias detecciones, mediante un aparato de captación de imágenes, permite que el objeto esté exactamente enfocado durante la realización de al menos una detección y, por lo tanto, puede detectarse de manera absolutamente fiable. Experimentos prácticos han demostrado que, por ejemplo, una partícula de poliestireno que comprende un diámetro de 15 μm puede detectarse fácilmente mediante un procedimiento en correspondencia.

Por ejemplo, en la Figura 3 de la presente Solicitud se muestran varios subvolúmenes que comprenden una profundidad respectivamente decreciente, los cuales se han denotado con los números de referencia 18a-18d. Por ejemplo, puede iniciarse una detección en el subvolumen 18d inmediatamente después de la dispensación de la gota por el dispensador, y pueden realizarse detecciones sucesivamente en subvolúmenes que comprenden una profundidad respectivamente decreciente, es decir, de 18c a 18b, a 18a, y a 18. Debido a esto, es posible detectar con una alta fiabilidad una célula o una partícula introducida en el líquido 12 contenido en el recipiente de fluido 10.

En realizaciones alternativas, el aparato de detección puede también haberse configurado para, comenzando por un subvolumen a una profundidad menor, realizar detecciones sucesivamente en varios subvolúmenes que comprenden una profundidad respectivamente creciente.

En ciertas realizaciones de la invención, el subvolumen definido puede comprender un área de menos de 10 mm². Por ejemplo, el subvolumen puede comprender un área de 2 mm x 2 mm, a una profundidad correspondiente a la profundidad de foco de un plano focal del aparato de detección. En ciertas realizaciones, el aparato de detección puede haberse configurado para captar una secuencia de imágenes en un subvolumen hasta que la célula o la partícula se asiente dentro del subvolumen. En ciertas realizaciones, el aparato de detección puede haberse configurado para enfocarse en un subvolumen dispuesto directamente bajo la superficie del líquido, o bien en un subvolumen dispuesto a una profundidad de menos de 5 mm por debajo de la superficie del líquido. En ciertas realizaciones de la invención, el aparato de detección puede haberse configurado para realizar varias detecciones del subvolumen respectivo, por ejemplo, con una velocidad de captación de entre 50 Hz y 150 Hz, por ejemplo, de 100 Hz. En ciertas realizaciones, el aparato de detección puede ser un aparato de captación de imágenes con una velocidad de captación de imágenes de 100 Hz. En ciertas realizaciones, el foco del aparato de captura de imágenes puede disponerse transversal para realizar un barrido vertical en una región lateral limitada. En ciertas realizaciones, por ejemplo, una velocidad transversal puede ser de 5 mm/s mientras se captan las imágenes, a fin de captar imágenes a diferentes profundidades. En ciertas realizaciones, por ejemplo, el volumen del líquido en el recipiente de fluido puede ser 150 µl, los que es un volumen típico en un cultivo celular.

Se pueden usar ciertas realizaciones para dispensar un número documentado de partículas. En particular, ciertas realizaciones de la invención pueden usarse en una producción de línea celular con el fin de dispensar células individuales al interior de cavidades de una placa de microtitulación de una manera fiable y documentada. En ciertas realizaciones de la invención, pueden imprimirse células individuales o un número concreto de células de cultivos de células monoclonales para verificar su condición monoclonal y para su tratamiento adicional. En particular, pueden usarse ciertas realizaciones para el análisis de células individuales.

Por lo tanto, realizaciones de la invención proporcionan un método en donde un objeto, es decir, una célula o una partícula, es dispensado dentro de un subvolumen definido de un fluido con el que se ha llenado, al menos parcialmente, un recipiente de fluido; etapa 50 de la Figura 4. El objeto se detecta cuando entra en el fluido o inmediatamente después de entrar en el fluido. Para ello, se pueden realizar una o varias detecciones en el subvolumen definido y/o en uno o varios subvolúmenes situados bajo el subvolumen definido, de manera coordinada en el tiempo con la dispensación de al menos una célula o al menos una partícula; etapa 52 de la Figura 4. La detección del objeto se produce no más tarde de cinco segundos y, más preferiblemente, no más tarde de un segundo después de entrar en el fluido. En ciertas realizaciones, el subvolumen definido comprende un área que es más pequeña que el área de una abertura de entrada del recipiente de fluido. En ciertas realizaciones, el objeto es dispensado sobre una superficie del fluido. En ciertas realizaciones, el objeto es dispensado dentro de un volumen de fluido definido situado bajo la superficie del líquido.

En ciertas realizaciones, el dispensador está configurado para transferir suspensión de partículas o suspensión celular selectivamente al interior del recipiente de fluido en una posición predefinida. Posibles mecanismos para esto son: impresión de goteo por demanda (de manera accionada piezoeléctrica o térmicamente), una simetría de flujo basada en fluorescencia (FACS - clasificación de células activadas por fluorescencia –“fluorescence activated cell sorting”–), pipeteo (manualmente o por medio de un robot de pipeteo), un aparato de dosificación (basado en válvula, por medio de un desplazador, por medio de una bomba de jeringa, etc.) o un micromanipulador. En ciertas realizaciones, el aparato de detección está configurado para enfocarse en el borde superior del nivel de líquido en el centro del recipiente (depósito) de fluido. Con esto, la región del impacto de la gota, es decir, del volumen de transporte que comprende el objeto en su seno, puede estar en foco automáticamente. Alternativamente, como se ha descrito en lo anterior, el volumen de líquido en el centro del recipiente de fluido puede ser enfocado comenzando desde abajo tan pronto como el dispensador haya dispensado la gota. Esto asegura que el objeto esté en foco en un instante aleatorio en el tiempo. Para este propósito, no es necesario conocer el nivel exacto de llenado del recipiente de fluido para encontrar el foco.

Con el fin de mantener el menisco del líquido en el depósito lo más plano posible y para, así, tener un nivel de líquido reproducible en el recipiente de fluido, se pueden usar depósitos que tengan formas especiales, por ejemplo, como los descritos en el documento EP 1 880 764 B1. Por ejemplo, los escalones planos son excelentemente adecuados para forzar el menisco a ser plano cuando el recipiente de fluido se llena con un volumen de líquido conocido con precisión.

En ciertas realizaciones de la invención, el objeto puede ser aplicado a la superficie de un fluido contenido en el recipiente de fluido, o insertado por debajo de la superficie, en el seno del fluido. En ciertas realizaciones, la detección se produce por medio de un aparato de captación de imágenes que se enfoca en un subvolumen correspondiente. En ejemplos que no forman parte de la presente invención, se pueden usar diferentes aparatos de detección.

Por ejemplo, un aparato de detección puede implementarse mediante electrodos formados en la pared del recipiente de fluido, que están configurados para detectar una capacidad entre ellos. Por ejemplo, pueden disponerse varios de

estos electrodos a diferentes profundidades del recipiente de fluido con el fin de realizar la detección a varias profundidades diferentes.

Por lo tanto, ciertas realizaciones de la invención proporcionan métodos en los que se observa en el recipiente de fluido (depósito) un volumen de observación que es más pequeño que el volumen del recipiente. En ciertas realizaciones, se observa únicamente el lugar de entrada del objeto en el fluido o el líquido. En consecuencia, se puede proporcionar un sensor para observar el volumen de observación y un mecanismo para dispensar selectivamente partículas únicamente al interior del volumen de observación. Por consiguiente, los aparatos y métodos para reconocer partículas y células en un líquido comprenden un depósito o una cavidad para recibir líquidos, un mecanismo para transferir líquidos con una o varias células/partículas, y un sensor para reconocer una única o varias partículas o células. En ciertas realizaciones, el depósito es un depósito para recibir suspensiones de partículas o suspensiones celulares, el mecanismo es un mecanismo para transferir selectivamente la suspensión de partículas o la suspensión celular al depósito en una posición predefinida, y el sensor es un sensor para reconocer una o varias partículas o células en un medio celular, en la posición predefinida.

El sensor es un sensor de imagen. El sensor de imagen puede comprender un foco ajustable y puede haberse configurado para enfocar a través del volumen de observación. En otras palabras, el sensor de imágenes puede haberse configurado para realizar un barrido vertical del volumen de observación. En ciertas realizaciones, esto se produce desde debajo del recipiente de fluido, de modo que se produce un ajuste del foco en una dirección de profundidad. En ciertas realizaciones, la transferencia de una suspensión de partículas o una suspensión celular al fluido contenido en el recipiente de fluido se produce sin contacto, en forma de gotas que vuelan libremente. En ciertas realizaciones, la gota en vuelo libre comprende un volumen de un máximo de 100 nL. En ciertas realizaciones, el recipiente de fluido se llena previamente con un líquido. En ciertas realizaciones, el líquido con la célula/la partícula es introducido en el recipiente de fluido. En ciertas realizaciones, el recipiente de fluido está configurado de tal manera que un líquido ubicado en su interior comprende una superficie plana (menisco). En ciertas realizaciones, para esto, el recipiente de fluido comprende un borde de una profundidad particular, y el volumen del líquido en el recipiente de fluido se ha adaptado de tal manera que el líquido llega hasta el borde. En ciertas realizaciones, el recipiente de fluido comprende un volumen de al menos 100 µL.

En realizaciones, se proporciona un mecanismo mediante el cual el recipiente de fluido, el dispensador y el aparato de detección pueden disponerse atravesados unos hacia otros con el fin de insertar subsiguientemente células/partículas dentro de varios recipientes de fluido, por ejemplo, dentro de los pocillos de una placa de microtitulación. Por ejemplo, dicho mecanismo puede estar configurado para mover los diversos recipientes de fluido, por ejemplo, la placa de microtitulación, con respecto al dispensador y al aparato de detección, o bien para mover el dispensador y el aparato de detección con respecto a los diversos recipientes de fluido. De esta forma, es posible insertar subsiguientemente células/partículas dentro de varios recipientes de fluido e, inmediatamente, detectar de manera fiable si una célula/partícula ha terminado en cada uno de los recipientes de fluido.

La técnica aquí descrita proporciona ventajas significativas sobre los métodos conocidos.

Un inconveniente significativo de las tecnologías de dispensación conocidas en combinación con los dispositivos de obtención de imágenes es el tiempo y las etapas de procedimiento necesarios entre la dispensación, es decir, el transporte de las células al interior del recipiente de fluido (el pocillo) y la obtención de imágenes del pocillo. Aquí, se depositó primeramente una sola célula en un pocillo de la placa de microtitulación, se retiró, a continuación, la placa de microtitulación del dispensador, luego se centrifugó la placa, seguidamente se insertó la placa en dispositivo de obtención de imágenes y, a continuación, se produjo su detección por parte del dispositivo de obtención de imágenes. Además, también existen las malas condiciones para obtener imágenes del fondo del pocillo debido a las geometrías de los pocillos relacionadas con la fabricación. Estos inconvenientes se compensan gracias a la técnica descrita en la presente memoria. La detección ocurre directamente en el momento de depositar la célula, es decir, con su dispensación. El depósito se puede realizar de manera muy precisa, de tal modo que la célula llegue al pocillo en una posición predefinida, por ejemplo, centralmente, y esta puede ya ser explorada o barrida directamente en el punto de entrada del líquido contenido en el pocillo. Con esto, no es necesario que la placa sea movida y/o las células no necesitan centrifugarse hasta el fondo del pocillo. Con esto, se pueden omitir las etapas de retirar la placa del dispensador, centrifugar la placa e insertar la placa dentro del dispositivo de obtención de imágenes. Por otra parte, la detección (barrido) puede ocurrir únicamente desde el fondo hacia arriba utilizando un cambio de foco en la ubicación de entrada de la célula en el recipiente de fluido (el pocillo). Esto puede producirse muy rápidamente y la célula puede automáticamente estar siempre en la imagen.

Por lo tanto, ciertas realizaciones de la presente invención son ventajosas porque la dispensación y la detección se producen directamente en sucesión y moviendo la placa, y, por lo tanto, no se produce el movimiento de la célula dentro del recipiente de una manera incontrolable. No hay etapas intermedias entre la dispensación y la detección. Por otra parte, la detección se produce en el líquido libre y no en el fondo del pocillo. Por lo tanto, no hay efectos de sombreado ni efectos de refracción, y no hay imágenes fantasma de las células. Además, se pueden evitar otros inconvenientes que pueden perjudicar la detección en el fondo del pocillo, por ejemplo, arañazos, huellas dactilares (en el fondo/fuera), polvo atraído (electrostáticamente) (en el fondo/fuera) o suciedad (residuos) desde arriba/dentro, que, por ejemplo, se haya centrifugado hasta el fondo del pocillo junto con la célula. En ciertas realizaciones de la invención, se usa un barrido vertical en lugar del barrido horizontal para que no haya problemas de

enfoque ni la necesidad de combinar imágenes. El volumen que se ha de explorar es sustancialmente más pequeño que el volumen total del pocillo. A diferencia del barrido horizontal, se omite atravesar la placa, lo que, a su vez, permite una detección más rápida. Finalmente, la calidad de la imagen ya no depende de la calidad del recipiente de fluido, por ejemplo, de los sustratos de la placa de microtitulación o de sus fondos, ya que la detección se produce mientras la célula/la partícula se encuentra en el líquido libre.

5

La figura 5 ilustra una comparación de una realización descrita en la presente memoria con un método conocido, de tal manera que el eje de tiempos se ha representado de arriba a abajo. En cada caso, se utiliza una suspensión celular como material de base. En el método descrito en esta memoria, la suspensión celular se transfiere a depósitos en una posición predefinida; etapa 60. Simultáneamente, se produce un examen directo bajo un microscopio de la posición predefinida; etapa 62. Como resultado de las etapas 60 y 62, se proporciona información sobre el cómputo de células por depósito.

10

En contraste, en los métodos conocidos, la suspensión celular se transfiere a los depósitos, etapa 70, los depósitos se centrifugan, etapa 72, y se lleva a cabo un examen de todo el fondo del depósito bajo un microscopio, etapa 74. Por lo tanto, los métodos conocidos conllevan el ejemplo de una cantidad de tiempo significativamente mayor, estando la altura de los bloques individuales de procedimiento de la Figura 5 correlacionada con la duración de las etapas correspondientes. Se ha encontrado que se logra una simplificación y aceleración del procedimiento global mediante los métodos que se describen en la presente memoria.

15

Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención permiten una verificación mejorada de células individuales en una separación celular, al tiempo que todo el procedimiento se simplifica y agiliza. Simultáneamente, el prerrequisito sigue siendo que la célula se pueda dispensar en un volumen suficientemente grande que permita un cultivo subsiguiente (crecimiento de las células). Las realizaciones incluyen una etapa correspondiente de un cultivo celular en el recipiente de fluido después de detectar una célula en el mismo.

20

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar células o partículas (16) en un recipiente de líquido transparente (10), que comprende:
dispensar (50, 60) una gota que vuela libremente y en la cual está encapsulada al menos una célula (16) o al menos una partícula (16), en un subvolumen definido (18) de un líquido (12) con el cual un recipiente de líquido (10) está al menos parcialmente lleno, de tal manera que el subvolumen definido (18) está situado directamente por debajo de la superficie del líquido (12) y se extiende hacia abajo en una profundidad predeterminada desde la superficie de líquido (12) con el que el recipiente de líquido (10) está al menos parcialmente lleno;
detectar la al menos una célula (16) o la al menos una partícula (16) al entrar esta en el líquido (12) o inmediatamente después de haber entrado en el líquido (12), no más tarde de cinco segundos después de haber entrado en el líquido, realizando (52, 62), de una manera coordinada en el tiempo con la dispensación de la al menos una célula (16) o la al menos una partícula (16), una detección en el subvolumen definido (18) y/o en uno o varios subvolúmenes (18a-18d) de líquido situados bajo el subvolumen definido (18),
en donde realizar una detección comprende enfocar un aparato de captación de imágenes (32) dispuesto por debajo del recipiente de líquido (10), en el subvolumen definido (18) y/o en los uno o varios subvolúmenes (18a-18d) situados bajo el subvolumen definido (18), y captar una imagen del subvolumen definido (18) y/o de los uno o varios subvolúmenes (18a-18d) situados bajo el subvolumen definido (18).
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la detección de la al menos una célula (16) o la al menos una partícula se produce no más tarde de 1 segundo después de que esta entre en el líquido (12).
3. Método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el subvolumen definido (18) comprende un área (A1) que es más pequeña que el área (A2) de una abertura de entrada del recipiente de líquido (10).
4. Método de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se realiza una detección de la al menos una célula (16) o la al menos una partícula (16) en el subvolumen definido (18) que comprende una profundidad de menos de 5 mm desde la superficie superior del líquido (12).
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, comenzando por un subvolumen (18d) situado a una profundidad mayor, las detecciones se realizan sucesivamente en varios subvolúmenes (18-18c) que comprenden una profundidad respectivamente decreciente, o bien, comenzando por un subvolumen situado a una profundidad menor (18), las detecciones se realizan sucesivamente en varios subvolúmenes (18a-18d) que comprenden una profundidad respectivamente creciente.
6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la dispensación de (50, 60) una gota que vuela libremente y en la que está encapsulada al menos una célula (16) o al menos una partícula (16) se realiza mediante un dispensador (14), comprendiendo el método colocar el dispensador (14), el aparato de captación de imágenes (32) y cada uno de varios recipientes de líquido unos con respecto a otros con el fin de detectar la al menos una célula o la al menos una partícula cuando esta entra en el líquido o inmediatamente después de haber entrado en el líquido de este recipiente de líquido, no más tarde de cinco segundos después de haber entrado en el líquido.
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el recipiente de líquido (10) comprende una pared lateral con un borde, de tal manera que un ángulo de contacto del líquido es ajustado con respecto a la pared lateral de modo que el líquido (12) comprenda una superficie plana.

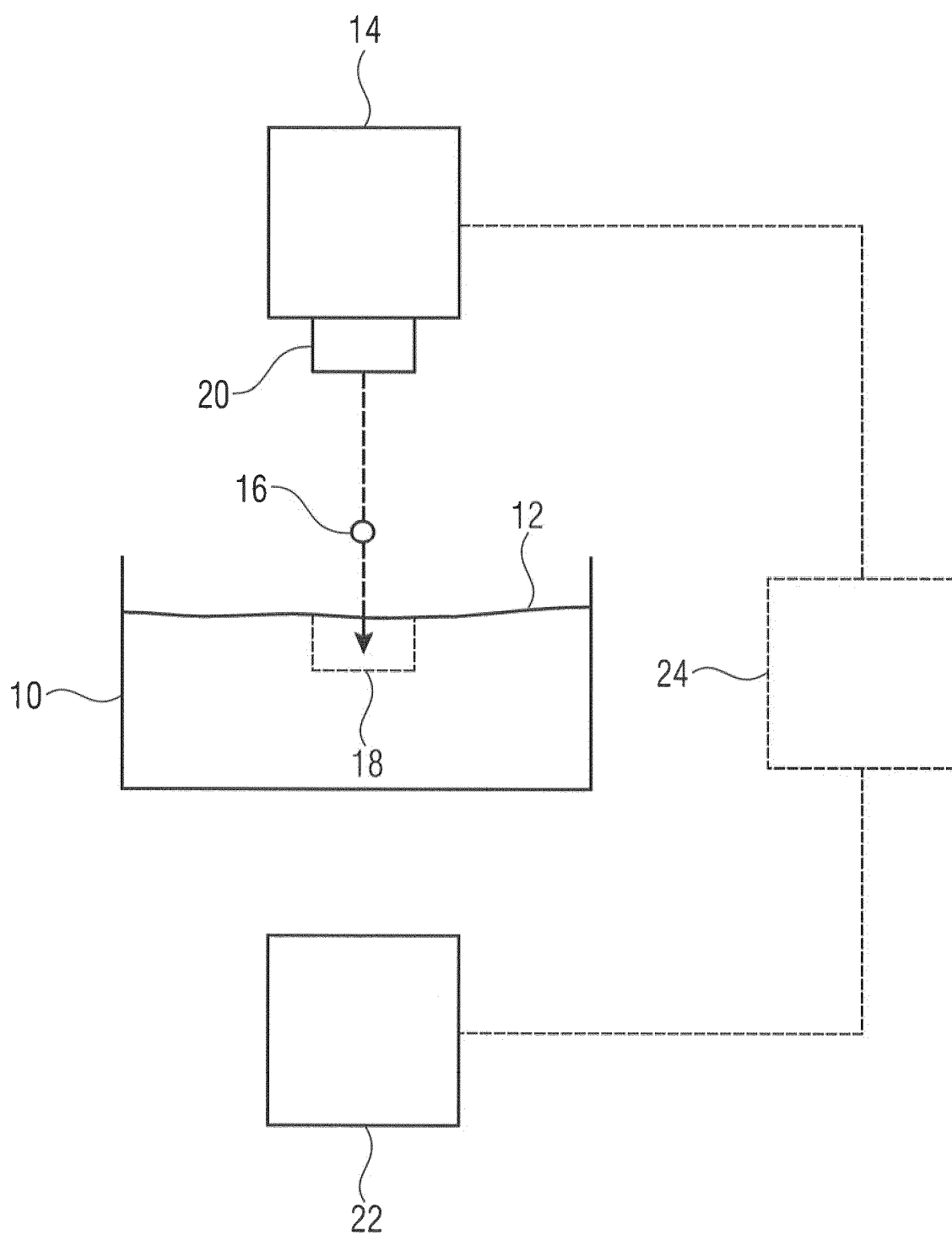


Fig. 1

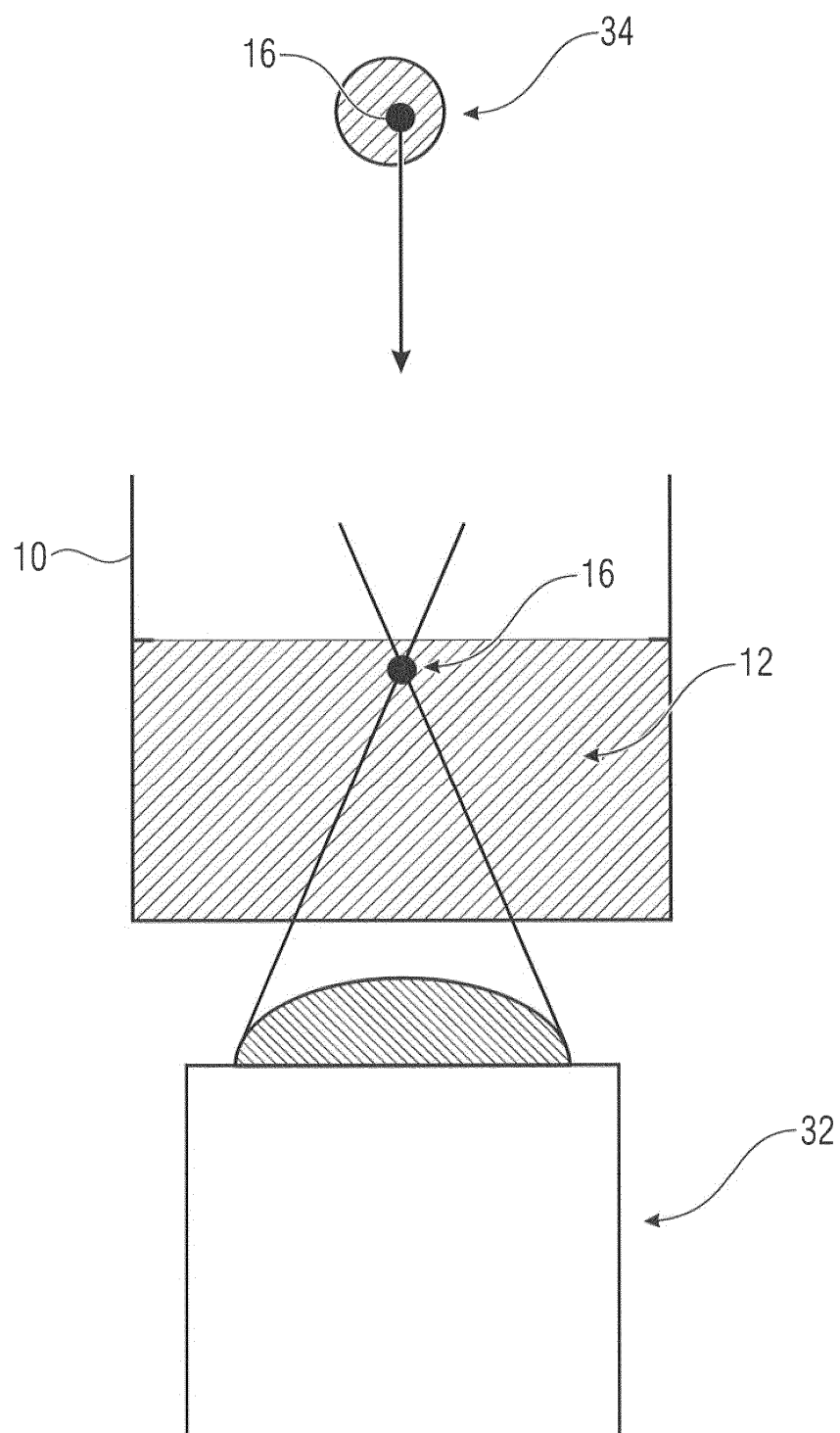


Fig. 2

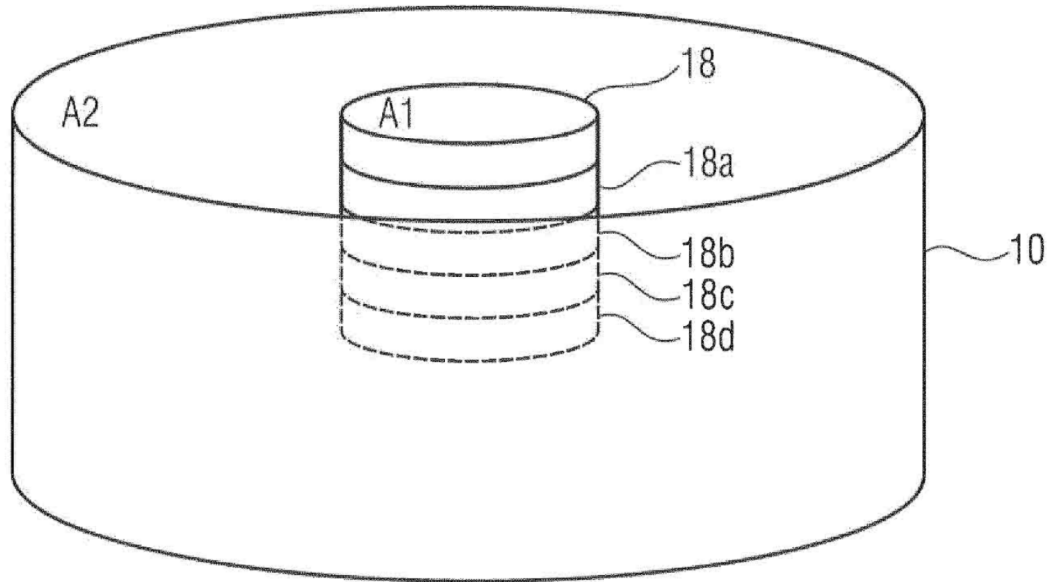


Fig. 3

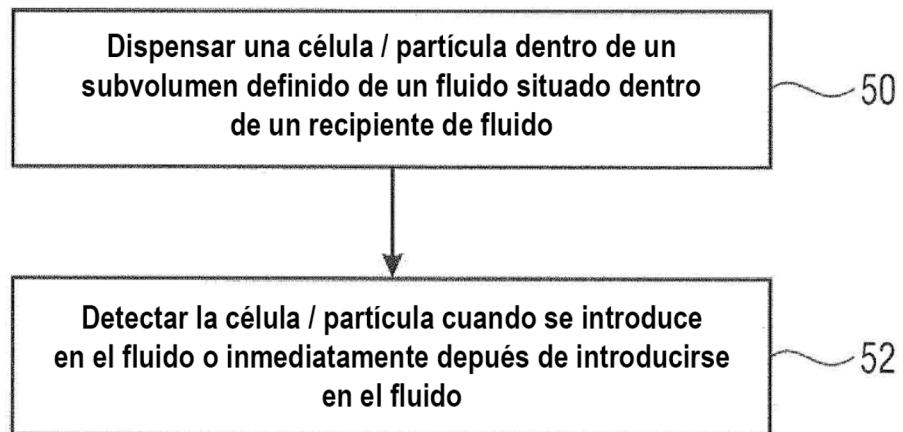


Fig. 4

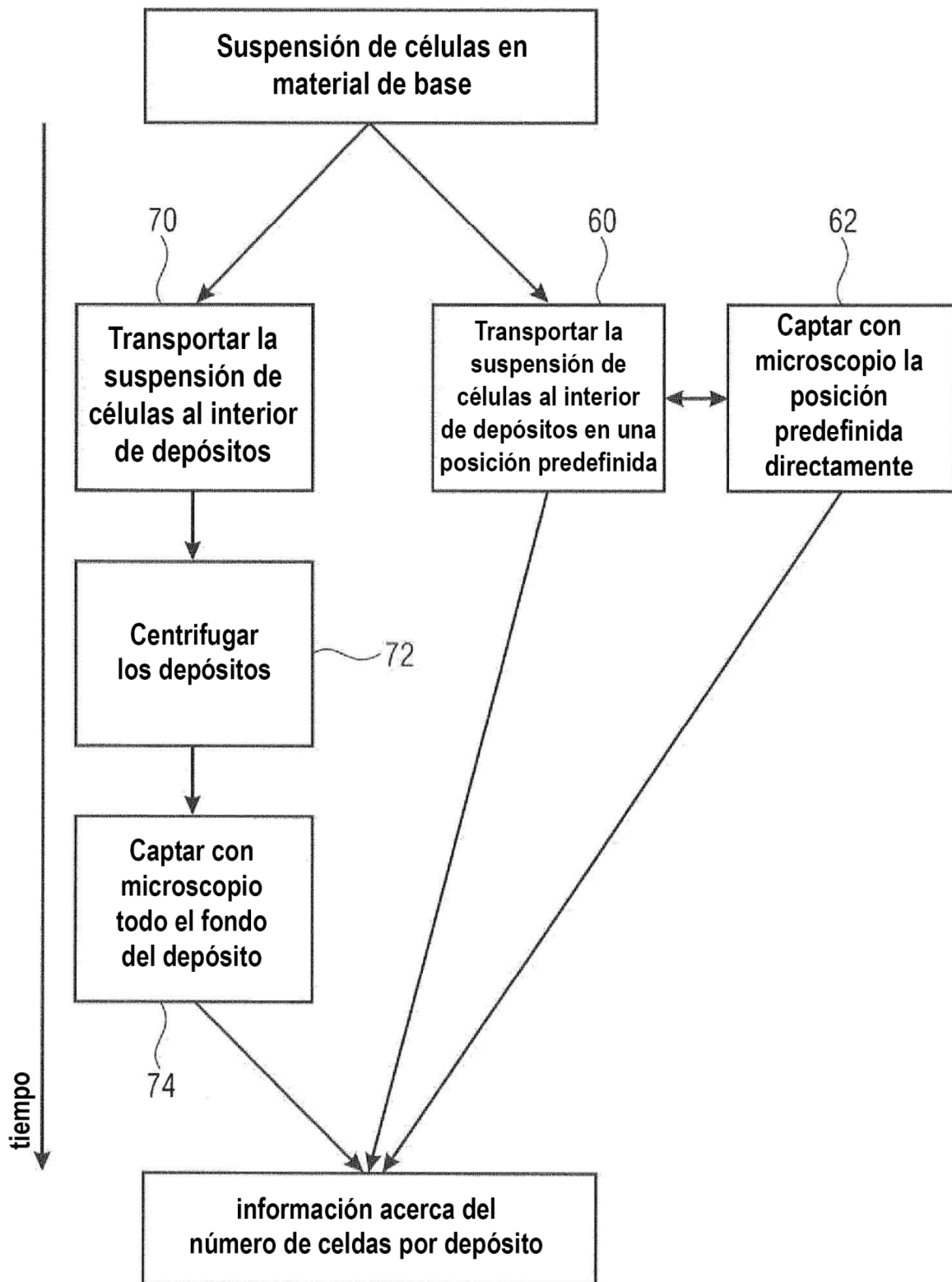


Fig. 5

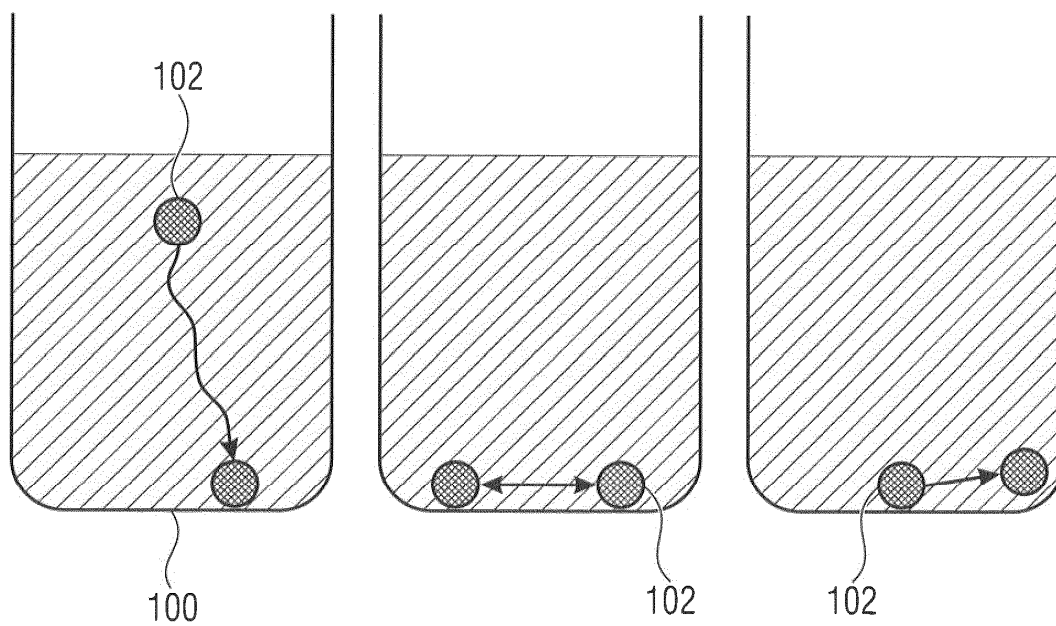


Fig. 6