



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 267 518**

⑤1 Int. Cl.:
C12N 15/87 (2006.01)
C12N 13/00 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **00920881 .0**

⑧6 Fecha de presentación : **17.04.2000**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **1173599**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **23.01.2002**

⑤4 Título: **Aparato y método para introducir una sustancia en una célula mediante electroporación.**

③0 Prioridad: **16.04.1999 GB 9908681**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.03.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.03.2007

⑦3 Titular/es: **AstraZeneca AB.**
151 85 Södertälje, SE

⑦2 Inventor/es: **Dodgson, John y**
Corless, Anthony, Robert

⑦4 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Aparato y método para introducir una sustancia en una célula mediante electroporación.

Esta invención se refiere a un aparato y a un método para introducir una sustancia en una célula.

Más particularmente, pero no de manera exclusiva, la invención es capaz de introducir sustancias en células, sustancias las cuales pueden incluir un agente de transfección tal como: un producto químico, una molécula, una proteína, un virus, un prión o un material de ADN.

Previamente, el material se introducía en las células por medio de un dispositivo similar a una jeringa. Estos dispositivos similares a jeringas tenían que ser operados manualmente o mediante sistemas robóticos complejos, y en consecuencia el proceso de inyección era muy lento.

La presente invención surge para superar estos y otros problemas asociados con los dispositivos similares a jeringas.

Es un objeto de la invención aumentar la eficacia de la inyección de material en células mediante el procedimiento de electroporación actualmente conocido. En este procedimiento, las células suspendidas en un medio se exponen a un campo eléctrico suficientemente elevado para provocar que la membrana sea permeable. En la técnica actual, las células se suspenden en un medio que contiene la especie requerida a inyectar. Cuando la membrana se ha hecho permeable, la especie a inyectar se difundirá o se moverá mediante electroforesis dentro de la célula. Después de un tiempo, la membrana celular se recuperará de los efectos del pulso, y se hará no permeable una vez más. En la técnica actual, se usan concentraciones elevadas de células, junto con electrodos macroscópicos (es decir, con una dimensión mínima típica del orden de 100 μm). Esto significa que, en general, más de una célula estará en serie con cada una de las líneas del campo en el sistema - siendo aleatorio el número preciso. Por tanto, el campo experimentado por las células en el sistema puede variar enormemente, desde una cantidad por debajo de la requerida para la apertura de la membrana, hasta una cantidad por encima de aquella que las células pueden soportar y permanecer viables. Es un objeto de la invención proporcionar un sistema microfabricado, con dimensiones y características considerablemente más pequeñas que las encontradas en dispositivos de electroporación usados actualmente, en el que las células se pueden electroporar, y el material se puede inyectar, en condiciones que son muy similares de una célula a otra, permitiendo que se reduzcan las incertidumbres de la potencia del campo y del tiempo.

Los dispositivos microfabricados para manipular células y exponerlas a campos eléctricos son conocidos. Ayliffe *et al.* (IEEE J MEMS 8(1)50-57 (1999)) muestra canales microfabricados con microelectrodos, que se pueden usar para medidas de impedancia eléctrica en líquidos y células, estos últimos dirigidos a detectar el tipo de célula presente y medir (si es posible) algunas de sus propiedades. El dispositivo no está diseñado con el fin de realizar una electroporación, y no se menciona nada de esto. Tanaka *et al.* (documento US 4.894.343) describe un dispositivo microfabricado para manipular células en pocillos, diseñado con el fin de fundir juntas dos células localizadas en el mismo pocillo. Su dispositivo comprende

un conjunto de pocillos grabados en silicio que están diseñados para atrapar las células, mientras que permiten que el líquido pase a través de las salidas en el fondo del pocillo. Sin embargo, el dispositivo no está diseñado para que sea adecuado para la electroporación; la presente invención usa un diseño mejorado.

Según la presente invención, se proporciona un aparato microfabricado para introducir una sustancia en una célula, que comprende un canal (22) microfabricado a través del cual fluye o pasa la célula en un fluido hasta un sitio en el que se va a permear; medios para introducir la sustancia en la célula; medios de electroporación para provocar la permeabilidad de la pared de la célula, para permitir que dicha sustancia entre en dicha célula; incluyendo el medio de electroporación un primer y un segundo electrodo (14, 16) dispuestos para permear en la pared de la célula con la aplicación de un pulso de voltaje, en el que el canal (22) y los electrodos (14, 16) tienen dimensiones y características para aplicar el pulso de voltaje a lo largo de una célula individual, y el canal tiene un diámetro entre uno y cinco veces el diámetro de la célula, o es más estrecho que la célula en su estado relajado.

El canal es preferiblemente estrecho, por ejemplo entre una y cinco veces el diámetro de las células, el cual puede ser típicamente alrededor de 5-20 μm . Preferiblemente, una dimensión característica de un canal a través o a lo largo del cual pasa o fluye una célula es del orden de 50 μm , más preferiblemente es menor que 30 μm , y lo más preferible menor que 4 veces el diámetro de la célula.

Las células suspendidas en un medio líquido se introducen en una cámara, en la que está o están localizados los aparatos, por medio de una bomba o mediante alimentación por gravedad u otro mecanismo de desplazamiento de fluido adecuado, por ejemplo mediante electroósmosis.

Preferiblemente, al menos se proporcionan dos electrodos, de forma que la célula está localizada con respecto a los electrodos de manera que se puede aplicar una diferencia de potencial a fin de hacer la pared celular temporalmente permeable.

Se pueden proporcionar medios para restringir o localizar la célula, de forma que esté situada con respecto al o a cada uno de los electrodos. Una ventaja de localizar la célula es que está situada en una parte particular de un campo eléctrico predeterminado. En consecuencia, el campo eléctrico se puede aplicar con una mayor precisión.

Ventajosamente, se incluye un detector de proximidad, de forma que, cuando una célula está en la localización correcta para que esté en una parte predeterminada del campo eléctrico, se aplique automáticamente el pulso de voltaje. Se puede usar un medio de procesamiento, incluyendo un dispositivo lógico electrónico, para mejorar y potenciar este proceso.

Preferiblemente, se proporciona una pluralidad de los aparatos mencionados anteriormente, dispuestos en un conjunto. Una ventaja de tal conjunto es que se puede trabajar en paralelo sobre muchas células. Esto incrementa el rendimiento.

Un conjunto de aparatos se puede formar sobre un sustrato semiconductor, tal como, por ejemplo, silicio o germanio. Se pueden incluir en el sustrato detectores de proximidad, electrodos y medios de procesamiento, por ejemplo en una capa diferente de una estructura semiconductor integrada.

En una realización particularmente preferida, se

introduce ADN en células vivas haciendo permeable la pared celular mediante el proceso de electroporación. El ADN entra entonces en la célula desde el medio circundante. Las células están mantenidas en un fluido que está bajo una presión suficiente para hacer que las células se muevan con respecto a los electrodos. Los medios para localizar cada célula con respecto a un electrodo pueden comprender una estructura mecánica o eléctrica. Un ejemplo puede ser un pocillo o una estructura similar a un pocillo, formado por ejemplo grabando por ataque químico un sustrato de silicio en el que se sitúa la célula. Se puede colocar una malla o una disposición similar a un tamiz, a la salida del pocillo, de forma que permita el paso de fluido pero que evite que la célula salga del pocillo. Preferiblemente, una diferencia de presión, mantenida a lo largo del sustrato, empuja a las células en las estructuras similares a pocillos.

A medida que se sitúan más células en los pocillos, la diferencia de presión aumenta debido a que hay menos pocillos disponibles, a través de los cuales puede fluir el fluido. Este incremento de presión tiende a forzar a las células en los pocillos, ya que se deforman relativamente fácil. Una manera de prevenir esto es obtener una indicación de los pocillos que están ocupados, y usar esta información para reducir o aumentar la diferencia de presión. Esta información se obtiene fácilmente a medida que se conoce la presencia de una célula a partir de detectores de proximidad, y se puede usar un contador en un microprocesador para aumentar cada vez que un pocillo sea ocupado.

Preferiblemente, el aparato está microfabricado a partir de un material biocompatible. El aparato microfabricado puede incluir uno o más canales microfabricados. Estos se pueden formar, por ejemplo, grabando por ataque químico en silicio. Los pocillos o los sitios para la introducción de material pueden estar en un lugar en un canal de flujo de fluido.

El canal es preferiblemente estrecho, por ejemplo entre 1 y 5 veces el diámetro de las células (que puede ser típicamente alrededor de 5-20 μm) a electroporar. Tales canales estrechos son ventajosos en electroporación, puesto que se puede aplicar una mayor cantidad de voltaje de electroporación a través de la célula por se, en lugar de a través de la célula, cualquier célula vecina, y del fluido soporte. Esto permite controlar precisamente el campo experimentado por la célula. En una realización alternativa, el canal puede ser incluso más estrecho que el diámetro de la célula en su estado relajado. En esta realización, las células se deforman y fluyen a lo largo del canal, y están en contacto muy próximo con las paredes.

Como alternativa, el canal o el pocillo puede ser relativamente ancho, excepto por una constricción en la región en la que se produce la introducción de material, diseñándose la constricción, y/o los electrodos de electroporación, de manera que los poros, abiertos en la membrana celular para permitir la introducción del material, estén orientados preferiblemente hacia una fuente del material.

En un dispositivo microfabricado, se puede usar una lógica electrónica para controlar la amplitud del pulso del voltaje de electroporación o la secuencia. El circuito lógico puede estar integrado en un sustrato semiconductor, por ejemplo usando CMOS, DMOS o componentes bipolares, fabricados en una secuencia de proceso conveniente. Preferiblemente, el sustrato

también forma un soporte para canales microfabricados. Se pueden usar técnicas de postprocesamiento durante la fabricación del sustrato para interconectar los componentes electrónicos a electrodos en el canal o en los canales de flujo.

Es especialmente ventajosa la integración de un dispositivo de tipo interruptor (usado para controlar el voltaje de electroporación) de un voltaje moderadamente elevado (típicamente 5-25 voltios, aunque se pueden usar otros voltajes), ya que la impedancia eléctrica mínima entre el interruptor y el canal se puede usar para mejorar el control de los parámetros de electroporación. Es más preferible la inclusión de uno o más elementos capacitores, adyacentes al interruptor, puesto que esto mejora la capacidad de suministrar corriente rápidamente, sin requerir un circuito de distribución de corriente complejo al interruptor. Esto puede ser de particular ventaja cuando hay una integración de múltiples dispositivos de electroporación, por ejemplo en un conjunto. Es una ventaja del presente dispositivo que, a medida que los canales son pequeños, los electrodos se pueden aproximar, y los voltajes necesarios para lograr la electroporación son bajos y se controlan fácilmente.

La introducción de componentes electrónicos o de circuitería lógica, mediante una técnica de sustrato activo, es elegante y es de especial beneficio cuando un conjunto o conjuntos de dispositivos de electroporación se cofabrican en un sustrato común. Existe la posibilidad de sustituir o aumentar tales componentes o circuitos, añadiendo componentes microelectrónicos adicionales, en las posiciones apropiadas, al sustrato. Tales componentes se pueden unir mediante montaje superficial, fijación por matriz e hilos, fijación TAB o fijación del chip directamente al sustrato (*flip chip*). Se prefiere especialmente la unión de los dispositivos usando medios adhesivos conductores, puesto que esto minimiza cualquier esfuerzo térmico proporcionado a la estructura durante la fabricación.

Los dispositivos y medios de unión y dispositivos capacitores preferidos se unen mediante montaje superficial (incluyendo unión mediante adhesivos conductores), o mediante fijación por hilos. Los dispositivos mencionados anteriormente se prefieren particularmente cuando el sustrato es pasivo o contiene componentes de bajo voltaje. También se pueden integrar sobre el sustrato una circuitería de procesamiento analógica, convertidores analógicos a digitales, dispositivos de procesamiento de señales digitales, elementos de microcomputación o microcontroladores, y dispositivos de comunicación. Estos últimos dispositivos incluyen dispositivos de comunicación ópticos. La integración facilita la conexión del circuito de procesamiento de control a procesadores externos, tales como un microprocesador para el control de flujo de bucle cerrado y/o para la aplicación del pulso de electroporación.

Preferiblemente, se proporciona un medio sensible que opera en conjunción con un electrodo y una tierra común, o un par de electrodos, para interrogar un canal o pocillo para determinar la presencia de una célula.

Preferiblemente, el medio de control controla el instante del tiempo del pulso de electroporación en colaboración con la detección de una célula en el pocillo o canal. Por ejemplo, se puede integrar un microcontrolador, un cronómetro o una máquina de estado, y se puede usar para controlar el momento de aplica-

ción y/o la amplitud de un pulso de electroporación, en respuesta a una señal que indica la presencia de una célula.

Preferiblemente, se proporciona un medio para determinar el estado o condiciones de las células tras la transfección, indicando si una célula no está afectada, si se ha introducido material con éxito, o si está dañada. Por ejemplo, se puede utilizar para este fin el aparato como se describe en la Solicitud de Patente Internacional Publicada n° WO-A-9402846 (BTG). De este modo, es posible caracterizar la célula, en un lugar o lugares, tanto antes como después de un intento de introducción de material, y determinar el éxito o no mediante la diferencia en la respuesta de las células en lugar de mediante una calibración absoluta.

Preferiblemente, el medio de procesamiento responde a una indicación externa de la presencia o estado de una célula en la vecindad del electrodo. Se puede proporcionar un accionador mediante un operador, o automáticamente mediante una tarjeta i/o digital en un microordenador normal. El accionador a su vez puede derivar mediante un medio de procesamiento de imágenes, tal como una imagen de microscopio por vídeo del canal.

La detección o monitorización de las células se puede realizar por medios ópticos. Las células pueden tener un componente fluorescente introducido en ellas, cuando se introduce el material. Esto permite la detección automática de la fluorescencia de las células tratadas, por ejemplo usando un microscopio por vídeo y/o cualquier otro medio de procesamiento de imágenes, para detectar con éxito la introducción. Estos datos se pueden usar para señalar la presencia de la célula en el aparato de electroporación.

Los componentes o circuitería integrada, y un canal o pocillo asociado, en el aparato o en cada aparato de electroporación, se proporcionan con una única dirección, y se proporciona un medio de comunicación que permite la comunicación a y desde un microprocesador. Preferiblemente, la comunicación es vía un enlace o *bus* normal.

En el caso de que el sustrato soporte sea silicio, existe la posibilidad de visualizar las estructuras de manipulación de las células a través del silicio usando una radiación infrarroja adecuada. En tal realización, se debe tener cuidado en la disposición de las estructuras, para evitar que se oscurezca la ruta de radiación. Una ventaja de esta realización es que el dispositivo no necesita usar ningún miembro que sea ópticamente transmisor en la banda del visible normal, pero es transparente al infrarrojo. Puesto que la radiación infrarroja puede inhibir cualquier detección de la fluorescencia, cualquier detección infrarroja se debe realizar en una localización separada con respecto a la detección de la fluorescencia.

Subsiguientemente a la introducción del material en las células, se proporciona preferiblemente un medio de clasificación para dirigir a las células hacia un flujo de recogida o hacia un flujo de desecho, dependiendo del resultado de la introducción. Tal clasificación se puede lograr mediante un número de métodos, e incluye: electroforesis, dielectroforesis, "pinzas ópticas", y/o pulsos de presión dirigidos.

Se pueden proporcionar medios para destruir las células que no han sido tratadas como se desea. Tal destrucción se puede lograr exterminando la célula o las células dejándolas entonces esencialmente intactas físicamente, o destruyendo físicamente a la célula

o células. Los medios preferidos para lograr esto incluyen: la destrucción eléctrica de la célula, esencialmente mediante electroporación demasiado potente, la introducción de un agente destructor celular; o calentando localmente de forma rápida la célula o el medio fluido en la vecindad de la célula. Para este fin, se puede usar un elemento de microcalentamiento o un radiador infrarrojo dirigido y pulsado.

En los casos en los que el aparato de electroporación tenga conexiones eléctricas encaminadas hacia y alrededor del mismo, por ejemplo en un sustrato activo muy integrado, puede ser deseable proporcionar bandas de protección eléctricas dispuestas adecuadamente alrededor de las partes de la estructura de manipulación del fluido, de forma que se reduzca suficientemente cualquier campo eléctrico aplicado al fluido para que haya un efecto perjudicial mínimo sobre las células que fluyen en el canal.

Se pueden integrar componentes ópticos, tales como instrumentos ópticos de guía de ondas, en las capas procesadas del sustrato, que están fabricados preferiblemente en procesos similares a los que definen los canales del fluido. Tales componentes ópticos pueden incluir guías de ondas para la interrogación de la célula o del medio de soporte en el canal del fluido. Estos pueden incluir un acoplamiento de campo evanescente. Como alternativa, los componentes ópticos se comunican con medios de procesamiento de señales externos. Los componentes ópticos incluyen estructuras que forman una interfaz con elementos ópticos de fibra, tales como ranuras en V de silicio grabadas químicamente.

Los conjuntos de aparatos pueden utilizar conexiones externas habituales para el suministro de fluidos, células y suministros de energía, y se pueden visualizar como imágenes en paralelo usando medios de microscopía de vídeo adecuados.

Las realizaciones de la invención se describirán ahora, a título sólo de Ejemplos, y con referencia a las siguientes Figuras, en las que:

la Figura 1 muestra una vista en diagrama global de una realización de un aparato;

la Figura 2 es una vista general global de un sustrato que incorpora un conjunto de aparatos alternativos a aquellos mostrados en la Figura 1;

la Figura 3 es una vista en sección a través del aparato de la Figura 2;

la Figura 4 a 5 son secciones a través del flujo de fluido alternativo y disposiciones de electrodos que muestran detectores de proximidad; y

la Figura 6 es una vista general de un sistema que incorpora la invención.

Haciendo referencia a las Figuras, en la Figura 1 se muestra un aparato según la invención que incluye un sustrato 10 que está formado de un material semiconductor, tal como silicio, o un aislante, tal como vidrio, material cerámico o plástico. Si se forma a partir de un material semiconductor, se pueden incluir opcionalmente dispositivos activos bipolares o CMOS o DMOS, los cuales están interconectados. Los canales 22 se fabrican en el dispositivo a fin de dirigir el caudal del fluido y de las células. Un par de electrodos 16a y 16b está conectado a un suministro de voltaje (no mostrado) mediante un interruptor que está activado por el dispositivo activo. El par de electrodos 16a y 16b está formado preferiblemente de pilares chapados con oro. Es el par de electrodos el que, cuando se le da energía con un pulso de voltaje, hace la pared celular

permeable para permitir introducir una sustancia. Opcionalmente, los electrodos 16a, 16b funcionan como detectores de la presencia de una célula, por ejemplo mediante variaciones en la capacitancia entre ellos. Se puede proporcionar uno o más pares de electrodos 14a, 14b a fin de detectar células, o aplicar pulsos de electroporación a las mismas. Los contactos a los electrodos se realizan mediante pistas 23 y vías 25, según se requiera. Se apreciará que se pueden usar otros medios para la detección de las células; por ejemplo, estos pueden incluir un detector óptico.

El flujo del fluido a través del canal 22 permite el paso de materia celular soportada en el fluido a través de la configuración del electrodo. El fluido puede pasar a lo largo de la superficie del sustrato 10 hacia una pluralidad de otros canales (no mostrados), desde donde es dirigido hacia un canal más grande, o tubo capilar, para el procesamiento posterior.

El dispositivo lógico microelectrónico 18 se puede formar integralmente con el material sustrato 10, o se puede unir al mismo. Las interconexiones desde el dispositivo 18 se pueden realizar mediante pegamento conductor o bolitas de soldadura 20, por ejemplo como se logra en la fijación mediante la técnica *flip chip*. Una placa de cubierta (no mostrada) cierra el canal 22. Se puede proporcionar opcionalmente un sistema óptico, que incluye una fuente 29 y un detector 31, para la detección o análisis de las células en el canal, por ejemplo para detectar si el material se ha introducido con éxito en la célula. Como alternativa, la interrogación óptica se puede realizar por medio de fibras ópticas montadas sobre o en el sustrato. Las conexiones de fluido al canal se pueden realizar mediante capilares 28 recuadrados en ranuras receptoras, o mediante otros medios de conexión fluidos conocidos en la técnica.

Como alternativa, como se muestra en la Figura 2, los canales se pueden formar a través del sustrato. En la realización mostrada en la Figura 2, en la que características similares tienen los mismos números de referencia que aquellos en la Figura 1, las células están situadas en la estructura 15 similar a pocillos, y se aplica a cada célula, en paralelo, una diferencia de potencial. La ventaja de la realización mostrada en la Figura 2 es que se puede transfectar un número muy grande de células sustancialmente al mismo tiempo. Para los fines de facilidad de referencia, los objetos pequeños se denominan aquí como células. Sin embargo, el término célula o células pretende incluir todos los objetos inanimados pequeños, tales como partículas.

En la realización mostrada en la Figura 2, y en la sección transversal en la Figura 3, los canales se forman a través de un sustrato 10 que tiene una estructura 15 similar a pocillos en al menos un lado, estando los canales a una distancia tal de la base del pocillo que cualquier célula que entre en el pocillo sea retenida en el pocillo, bloqueando sustancialmente de ese modo el canal, en lugar de pasar a través del canal. El sustrato está en contacto con dos disoluciones, una por encima y otra por debajo, aisladas eléctricamente entre sí excepto en el punto de contacto en los canales. Las células están situadas en cada pocillo desde la disolución por encima del pocillo, por ejemplo mediante una diferencia de presión a lo largo del sustrato, conduciendo a un flujo a través de los canales. La ocupación de los pocillos se puede medir mediante diferencia de presión a lo largo del sustrato, mediante la

velocidad de flujo a través de los canales, mediante la conductividad a través del sustrato (que será aproximadamente igual al número de canales abiertos), etc. Esta medida también se puede usar para controlar la fuerza de localización, para no deformar las células excesivamente. Cuando se alcanza la ocupación mínima requerida de los pocillos, las células se pueden electroporar aplicando un pulso de voltaje entre las dos disoluciones. El material a introducir en las células puede estar localizado en la disolución en el lado opuesto del sustrato desde el lado al que se suministran las células, y la polaridad del pulso de electroporación se puede escoger para abrir la membrana celular y provocar que el material entre preferentemente en este lado. En este caso, es necesario eliminar la disolución aspirada desde el lado frontal de la localización de las células, del colector y sustituirla con una que contenga el material a introducir. Como alternativa, las células se podrían suspender en un medio que contiene el material a introducir, y la poración se podría realizar de manera que funcionara preferentemente desde este lado. Cuando se termina el proceso de poración, una inversión de la diferencia de presión a lo largo del sustrato puede eliminar las células desde el pocillo, y se pueden hacer fluir fuera del aparato (a través de canales no mostrados). Opcionalmente, la localización de las células en los pocillos se puede lograr mediante impulso a partir de un elemento de hoja móvil conformada, por encima del sustrato, que actúa para empujar las células hacia los pocillos, por ejemplo en la Figura 3, por medio de una placa 29 de cubierta deformable conformada.

En una realización particularmente preferida, los electrodos 16 se montan sobre el propio sustrato, por ejemplo sobre las superficies superior e inferior, que pueden actuar para realizar la electroporación. El electrodo sobre la superficie superior se puede segregar en un número de electrodos individuales, uno por cada pocillo o subgrupo de pocillos en el conjunto, de forma que se pueda electroporar individualmente una célula en un pocillo individual (o grupo de células en un grupo de pocillos). Los electrodos también se pueden usar para detectar la presencia de una célula en un pocillo dado, anotándose entonces las coordenadas de ese pocillo y contándose el número total de células, usándose el recuento para controlar los parámetros (voltaje o corriente y tiempo) del pulso de electroporación. Si es necesario, se pueden aplicar pulsos sólo a aquellos pocillos en los que haya célula. Este concepto difiere del descrito por Tanaka *et al.* (documento US 4.894.343) por cuanto, en su dispositivo, se proporciona un par de electrodos en cada pocillo, y se hace pasar la corriente entre el par dentro del pocillo, sustancialmente paralela a la superficie superior del sustrato (su Figura 11). Este diseño es apropiado para su objetivo expuesto de fundir juntas a dos células presentes en el pocillo. El patrón de electrodo de la presente invención, con el campo que pasa a través de los canales sustancialmente perpendicular al plano del sustrato, conducirá a un campo mayor experimentado por la célula, y por tanto a una mayor eficacia de electroporación. Aunque en Tanaka *et al.* se especifica que es esencial una oblea de silicio para la fabricación de su dispositivo, en la presente invención se puede usar cualquier sustrato con canales a su través, que permitan el contacto entre las células sobre su superficie y la disolución que contiene el material a introducir. Por lo tanto, también se pueden usar otros materiales tales

como vidrio y materiales cerámicos, material plástico sintético o un metal recubierto con un aislante.

La Figura 4a muestra una sección a través del dispositivo 2 microfabricado, por ejemplo hecha de vidrio, silicio o plástico moldeado, grabados por ataque químico, que tiene un canal 40 de flujo. El canal tiene típicamente entre 1 y 5 veces el diámetro de las células que fluyen a su través para transfección. En esta realización, las células están soportadas en un medio. Se proporcionan medios 60 de conexión de entrada y de salida (entrantes, clavijas, manguitos, etc.) que permiten conectar los capilares u otras conexiones 80 ahuecadas al canal de flujo. Se proporciona uno o más pares de electrodos 100, 120 en contacto con el canal, con conexiones eléctricas a los dispositivos externos vía pistas 140 y contactos 160. Los potenciadores de electroporación se proporcionan mediante fuentes de energía no mostradas. Como alternativa, se puede configurar inicialmente un par de electrodos en un modo de detección y, cuando se detecte una célula, se puede cambiar al modo de electroporación. Se puede proporcionar una serie de pares de electrodos para dar tratamientos potenciales secuenciales. Los electrodos también se pueden usar para medir propiedades de las células.

Como se muestra en la Figura 4b, los electrodos pueden usar un electrodo 200 de tierra normal, en lugar de pares discretos. Se puede usar un electrodo 240 de electroporación, configurado a fin de concentrar el campo alrededor de la célula o de un área particular de la célula. Los electrodos 220 de detección se pueden configurar para la máxima sensibilidad o simplemente planos. Como en la Figura 4c, el canal 40 puede ser próximo o incluso más pequeño que el diámetro de las células en todo o en parte, a fin de dar un contacto estrecho entre los electrodos y la pared de la célula.

En todas las realizaciones anteriores, los pares de electrodos pueden estar en el mismo lado del canal, o en lados opuestos.

La Figura 4d muestra una realización en la que se hace circular a las células 180 en un canal 40 de flujo desde un depósito de suministro no mostrado, en un medio portador sin el material a introducir; el dispositivo 20 tiene una unión 300 mostrada como una T con un segundo canal 320 para el suministro del material 340. Los electrodos 380 a,b, y opcionalmente 400 y 420, son electrodos de electroporación. Nuevamente, estos pueden ser pares discretos, o electrodos con una tierra común. Nuevamente, la fuente de energía para la electroporación puede ser un único potencial aplicado a cada par de electrodos durante un tiempo dado, o puede ser una secuencia de potenciales aplicada a uno o más pares de electrodos. El material 340 se puede hacer circular continuamente en el canal 40, o se puede aplicar como un lingote sólo cuando está presente una célula, envolviendo así el lingote durante la electroporación. Los electrodos 360 de detección, aguas arriba de la unión, pueden controlar la inyección del material 340 a fin de lograr esto; los electrodos 360 también pueden controlar el proceso de electroporación. Como en la Figura 4b, los electrodos se pueden configurar a fin de potenciar el proceso de electroporación. La posición de la célula se puede monitorizar ópticamente usando detectores (mostrados diagramáticamente como 430) a diversas etapas del proceso. La monitorización después del proceso, por ejemplo para comprobar que se ha introducido en la célula un colorante fluorescente junto con el mate-

rial deseado, permite clasificar a las células según el éxito o el fracaso de la introducción.

Se pueden proporcionar canales de flujo laterales adicionales para suministrar a la vecindad de las células materiales adicionales que ayuden al suministro del material dentro de la célula. Por ejemplo, la poración química localizada se puede lograr introduciendo un producto químico apropiado. Esta introducción puede ser transitoria y bajo un estrecho control en canales microfluídicos, dando así ventajas con respecto a la técnica anterior. El control de la introducción adicional se puede lograr por medio de electrodos o por medios ópticos.

La Figura 4e muestra una disposición alternativa a aquellas en la Figura 4a-d, en la que la presión aplicada a las células ayuda al proceso de introducción del material. La célula 180 entra en el dispositivo a lo largo de un canal 4 de flujo, arrastrado en un medio portador. La célula es capturada desde este flujo mediante un flujo secundario a lo largo de los canales 52, y se sitúa en un pocillo 50. La célula se sitúa frente al orificio del canal 54 que contiene el material 34, mediante una fuerza creada por la caída de presión del flujo entre los canales 4 y 52, o, si la célula está fijada fuertemente al pocillo 50, mediante una diferencia de presión estática entre estos canales. Como alternativa, la célula se puede mantener en el sitio mediante una fuerza física a partir de un pistón o una sección deformable en la pared 55 superior del canal 4. Un pulso de presión, aplicado al material 34 en el canal 54, forzará entonces al material dentro de la célula. El pulso se puede aplicar, por ejemplo, mediante deformación de una membrana 60 en una cámara 56. La gran relación de área de 60 y el orificio del canal 54 producirá fácilmente una gran presión repentina para la inyección.

La introducción puede ser ayudada mediante un pulso de electroporación aplicado entre un electrodo, en contacto con el material 34, y otro en contacto con el medio portador, en el canal 4.

Se pueden proporcionar electrodos 62, 64 adicionales y/u opcionales, para electroporar la membrana celular alrededor del orificio del canal 54. Los electrodos 62, 64 también o alternativamente se pueden usar para detectar la presencia de la célula a fin de iniciar o controlar el proceso. Los electrodos se pueden colocar adicional o alternativamente en otras posiciones, tales como sobre las paredes laterales o alrededor de la parte superior del pocillo 50, por ejemplo como se muestra en las posiciones 66, 68, a fin de lograr lo anterior.

La Figura 5 muestra una disposición de flujo de cubierta, usado para evitar que las células se adhieran a las paredes laterales, y para controlar su comportamiento usando un flujo fluido. Las células se introducen al dispositivo a través de un canal 100 de flujo que está unido mediante uno o más canales 102 adicionales para proporcionar un flujo laminar de cubierta, mostrándose los límites entre los flujos de forma diagramática en 104. Los electrodos 106 con conexiones 108 logran entonces la electroporación. Estos electrodos se pueden configurar ventajosamente a fin de concentrar el campo y/o localizar la poración. Se pueden incorporar otros pares de electrodos u otras variantes como se describe anteriormente. El material 34 a introducir en las células se puede inyectar en el canal 100 hacia abajo del flujo de la célula, como se describe anteriormente, o alternativamente se puede intro-

ducir en el flujo de cubierta, usando opcionalmente otros canales 110. El material 34 se puede inyectar como lingotes 114 que rodean a las células; el control de la inyección de 34 se puede realizar mediante electrodos 112 de detección como antes. El éxito de la introducción de material en las células se puede monitorizar usando electrodos u ópticamente (122), como antes; se puede proporcionar más de una salida 116, 118 a fin de que se clasifique a las células según la salida del monitor. Tales procesos de clasificación son bien conocidos en la técnica.

Se entiende que, aunque se ha descrito en lo anterior un único dispositivo de sitio, la invención pretende cubrir un solo dispositivo o múltiples dispositivos, posiblemente en un conjunto sobre un sustrato común, con conexiones fluidas y eléctricas separadas o comunes, según pueda ser necesario o ventajoso.

Ahora se describirá el funcionamiento de la invención mediante referencia global a las figuras y referencia específica a la Figura 6, que muestra una vista diagramática de un sistema que incorpora la realización mostrada en las Figuras 2 y 3.

Se muestra el sustrato 10 en el que se ilustran los pocillos 15 de forma diagramática. Un bus 17 de dirección proporciona un medio para interconectar las líneas de datos desde los electrodos 16 hasta un microprocesador 50. Cuando hay una célula en un pocillo 15, según se detecta mediante los electrodos 16, se envía una señal que indica esto, vía un bus 17 de dirección hacia el microprocesador 50. Una función separada realizada por el microprocesador aumenta un contador cada vez que se detecta una célula en el pocillo 15. Usando una tabla de consulta y/o un algoritmo, el microprocesador envía una señal a lo largo de la línea L1 hasta la bomba 52. La bomba se puede sustituir por un medio de presión adecuado, o por cualquier mecanismo adecuado para desplazar fluido,

tal como un medio electrostrictivo o mediante electroósmosis. Esta señal varía la presión aplicada por la bomba 52 al fluido presente en el aparato. La razón por la que se varía la presión del fluido es porque, a medida que entran más células en los pocillos 15, se requiere menos presión a fin de llevar a las células a los pocillos vacantes que quedan. Si la presión se mantuviese, debido al incremento de la impedancia a medida que los pocillos son ocupados, la presión en un lado del sustrato se elevaría y esto tendería a empujar a las células a través de los pocillos. Como alternativa, o además de esto, se puede aplicar a la cara posterior de los pocillos una malla muy fina (no mostrada), u otro medio restrictivo, medio restrictivo el cual permite el flujo de fluido a su través, pero evita el paso de las células. Al final de un ciclo, el medio restrictivo se puede mover o eliminar, permitiendo de este modo que las células pasen a través de los pocillos, y que se introduzca una carga fresca de células. Las células se almacenan en un depósito 54, y se introducen vía la válvula 56 que está bajo el control del microprocesador 50.

El método se describirá ahora con referencia general a todas las Figuras. Una célula 18 se hace pasar al pocillo 15, y su presencia es detectada por detectores de proximidad. Se envía una señal a un contador en el microprocesador 50. El contador aumenta, y el valor almacenado allí se puede usar para modificar uno o más parámetros del sistema, por ejemplo la presión bombeante. Después se produce la electroporación ya sea sobre la célula individual, o simultáneamente con una o más células diferentes.

La invención se ha descrito a título de ejemplos solamente. Se entenderá que se pueden realizar variaciones a los ejemplos sin separarse del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato microfabricado para introducir una sustancia en una célula, que comprende un canal microfabricado (22) a través del cual la célula en un fluido fluye o pasa hasta un sitio en el que se va a permeear; medios para introducir la sustancia a la célula; medios de electroporación para provocar la permeabilidad de la pared de la célula, para permitir que dicha sustancia entre en dicha célula; incluyendo el medio de electroporación un primer y segundo electrodo (14, 16), dispuesto para permeear la pared de la célula con la aplicación de un pulso de voltaje, en el que el canal (22) y los electrodos (14, 16) tienen dimensiones características para aplicar el pulso de voltaje a través de una célula individual, y el canal tiene entre una y cinco veces el diámetro de la célula, o es más estrecho que la célula en su estado relajado.

2. Aparato según la reivindicación 1, en el que el canal tiene entre una y cinco veces el diámetro de la célula, y el diámetro de la célula es alrededor de 5 hasta 20 μm .

3. Aparato según la reivindicación 1, en el que las dimensiones características del canal (22) microfabricado es del orden de 50 μm , más preferiblemente el canal tiene aproximadamente menos de 30 μm .

4. Aparato según la reivindicación 1, en el que las dimensiones características del canal es menor que 4 veces el diámetro de la célula.

5. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pulso del voltaje se aplica a la célula automáticamente cuando la célula está en el sitio de permeación.

6. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que tiene una bomba para llevar a la célula a una localización en la que se aplica un pulso de voltaje.

7. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la sustancia está presente en el fluido.

8. Aparato según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, comprendiendo el medio además un segundo canal en comunicación fluida con el primer canal, a través del cual pasa un segundo fluido o fluye dentro del primer canal, incluyendo el segundo fluido la sustancia a introducir en la célula.

9. Aparato según la reivindicación 8, que incluye un medio para controlar la introducción de la sustancia en el primer canal.

10. Aparato según la reivindicación 7 o reivindicación 8, en el que se proporciona una bomba para introducir la sustancia en el primer canal.

11. Aparato según cualquier reivindicación anterior, en el que se proporciona un medio para restringir o localizar una célula en una posición deseada.

12. Aparato según la reivindicación 11, en el que el medio para restringir o localizar la célula es una estructura similar a un pocillo, proporcionada en un lugar en el primer canal.

13. Aparato según la reivindicación 11 o reivindi-

cación 12, en el que la célula está restringida o localizada en contacto con las paredes del canal.

14. Aparato según cualquier reivindicación anterior, que tiene un detector de proximidad dispuesto para accionar un pulso de voltaje cuando se localiza correctamente una célula.

15. Aparato según cualquier reivindicación anterior, formado sobre un sustrato semiconductor.

16. Aparato según la reivindicación 15, en el que el sustrato semiconductor incluye silicio.

17. Aparato según cualquier reivindicación anterior, en el que el medio para introducir la sustancia en la célula incluye una jeringa.

18. Aparato según cualquier reivindicación anterior, que incluye medios para determinar el estado o condición de la célula tras la introducción de la sustancia.

19. Aparato según la reivindicación 18, que depende de la reivindicación 16, en el que el medio para determinar el estado o condición de una célula incluye un sensor óptico o una fuente de infrarrojos.

20. Aparato según la reivindicación 18, en el que el medio para determinar el estado o condición de una célula incluye una detección por fluorescencia.

21. Aparato según cualquier reivindicación anterior, que incluye medios de gasificación dispuestos para dirigir las células transfectadas hacia un primer depósito, y las células no transfectadas hacia un segundo depósito.

22. Una pluralidad de aparatos, según la reivindicación 1, dispuesta en un conjunto.

23. Un método para introducir una sustancia en una célula, que comprende las etapas de hacer pasar la célula en un fluido a lo largo de un canal (22) microfabricado hasta un sitio de terminación; hacer que la pared de la célula se haga permeable, para permitir que la sustancia entre en la célula, y empujar a la sustancia y a las células entre sí de forma que la sustancia entre en la célula, **caracterizado** porque la célula se hace permeable mediante electroporación sometiéndola a un pulso de voltaje, aplicándose el pulso de voltaje a través de una célula individual en el sitio de permeación, y teniendo el canal entre una y cinco veces el diámetro de la célula, o siendo más estrecho que la célula en su estado relajado.

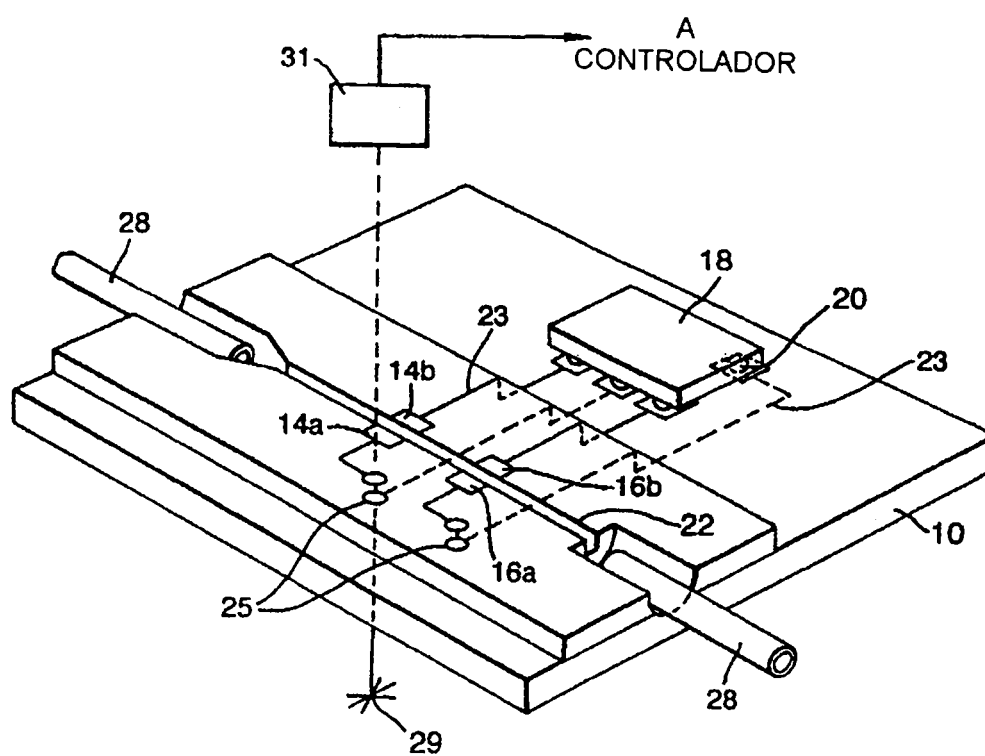
24. Método según la reivindicación 23, en el que el pulso de voltaje se aplica automáticamente cuando la célula está en una posición deseada para ser permeada.

25. Método según la reivindicación 23 ó 24, en el que el canal tiene entre una y cinco veces el diámetro de la célula, y el diámetro de la célula es alrededor de 5 hasta 20 μm .

26. Método según la reivindicación 23 ó 24, en el que las dimensiones características del canal (22) microfabricado es del orden de 50 μm , más preferiblemente el canal tiene menos de 30 μm .

27. Método según la reivindicación 23 ó 24, en el que las dimensiones características del canal son menores que 4 veces el diámetro de la célula.

Fig.1.



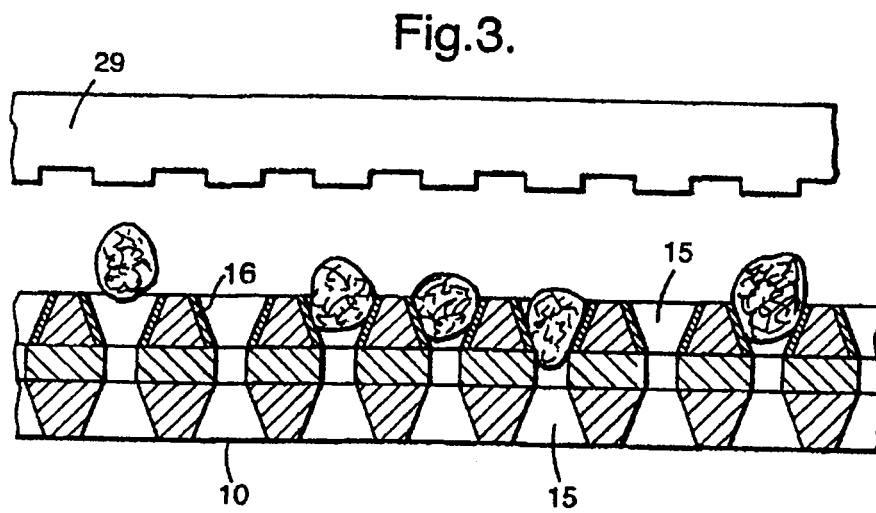
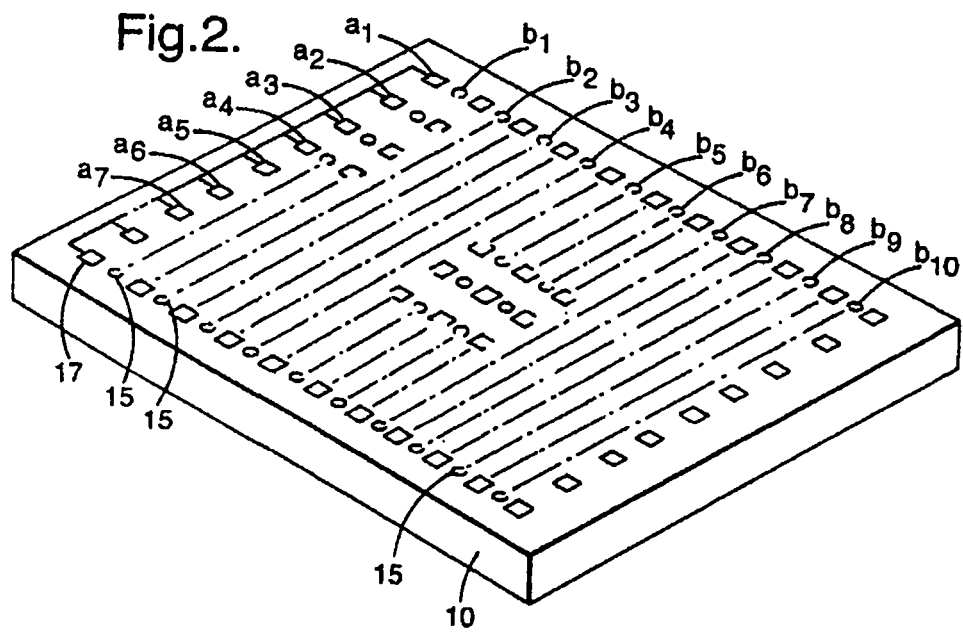


Fig.4a.

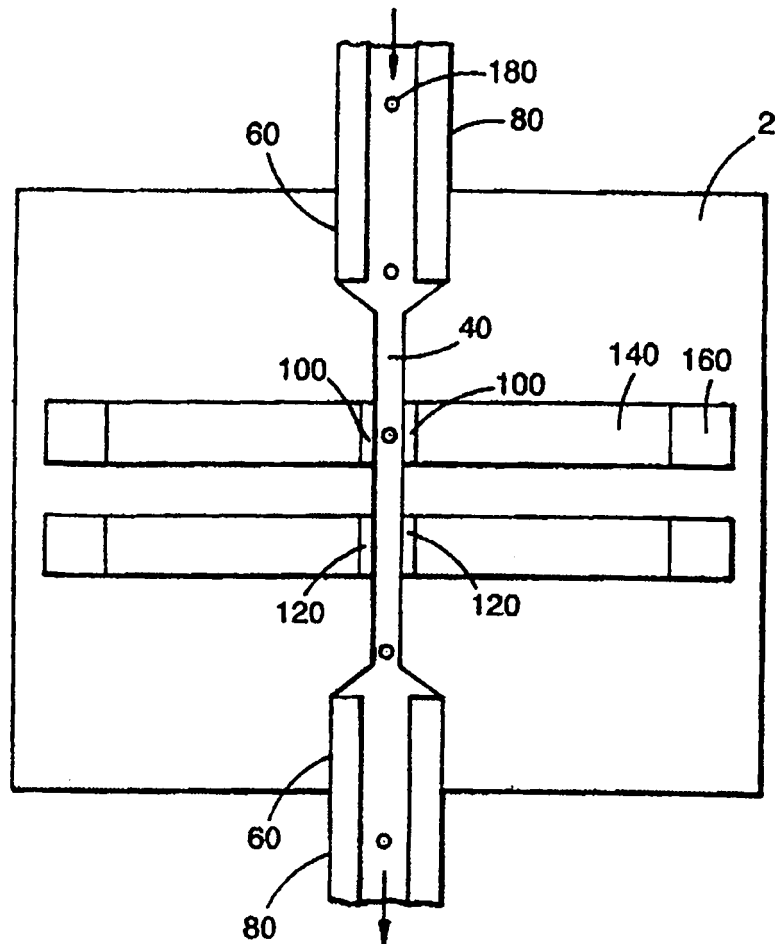


Fig.4b.

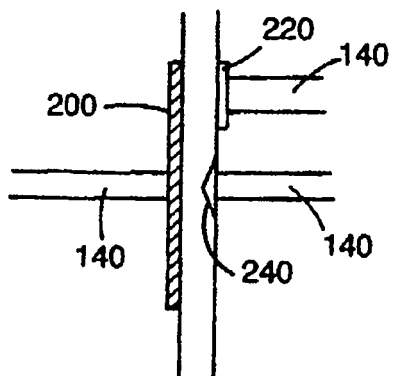


Fig.4c.

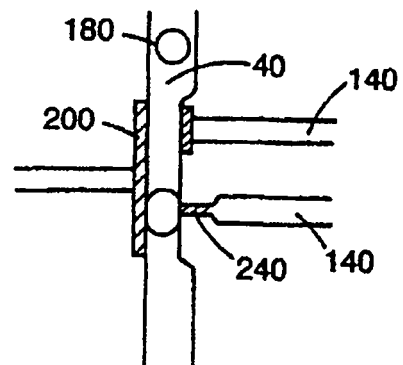


Fig.4d.

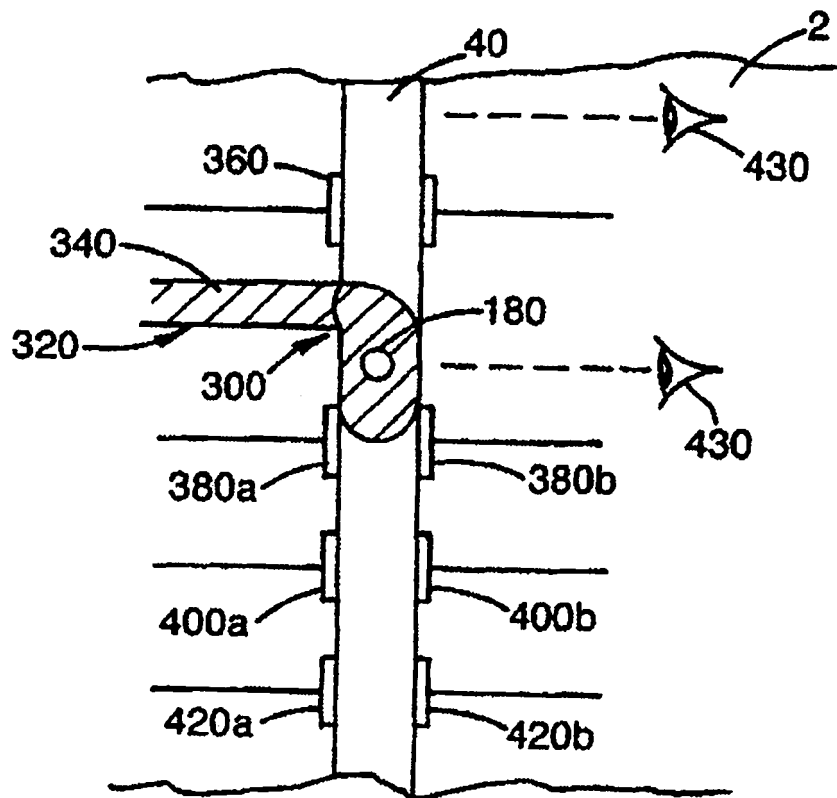


Fig.4e.

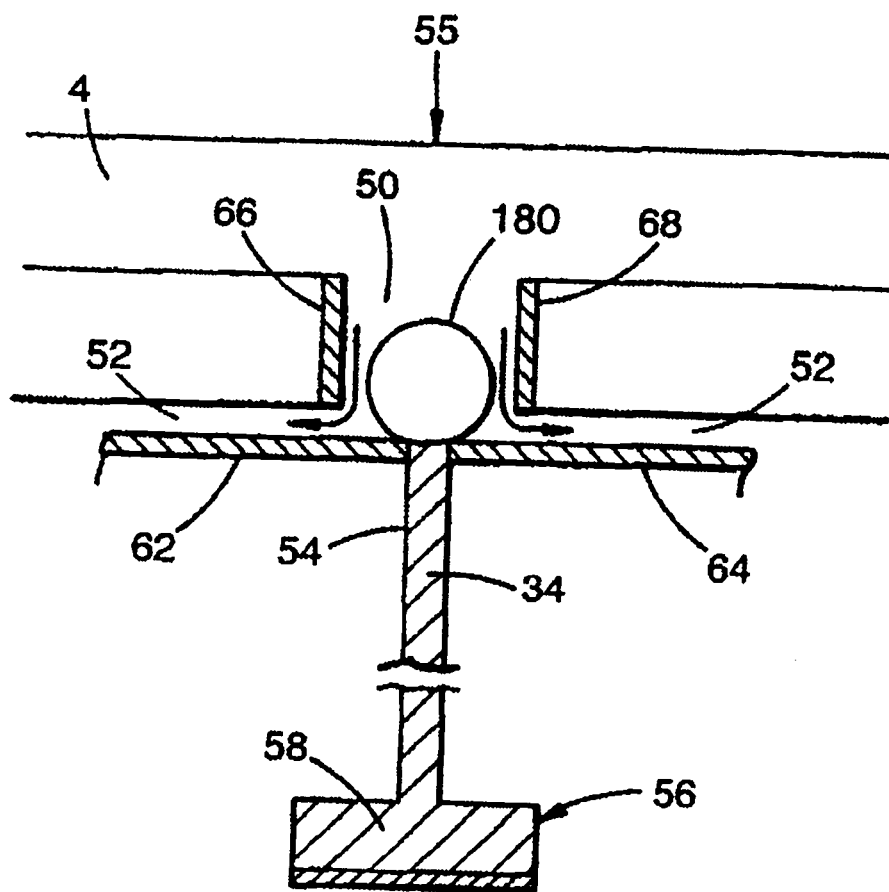


Fig.5.

