

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 860 474**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12M 1/32 (2006.01)

C12Q 1/686 (2008.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.12.2017** **PCT/NL2017/050804**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2018** **WO18111096**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2017** **E 17835720 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2020** **EP 3551763**

54 Título: **Un procedimiento para realizar un ensayo**

30 Prioridad:

12.12.2016 NL 2017982

12.12.2016 NL 2017979

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.10.2021

73 Titular/es:

MINQ SOLUTIONS B.V. (100.0%)

Zwolseweg 28

7412 AN Deventer, NL

72 Inventor/es:

WEENER, JAN WILLEM y

SARAJLIC, EDIN

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 860 474 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

Un procedimiento para realizar un ensayo

5 La presente invención se refiere a un procedimiento para seleccionar una célula mediante la realización de un ensayo para un compuesto excretado por las células usando un dispositivo, en el que el dispositivo comprende

- una parte delantera con una pluralidad de pocillos, y
- una parte trasera;

10 la pluralidad de pocillos del dispositivo contiene células;

comprendiendo dicho procedimiento los pasos de

- transferir líquido desde los pocillos al sustrato, y
- 15 - usar el sustrato para realizar el ensayo.

Christopher Love divulga un procedimiento para realizar un ensayo en "A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies" (Nature Biotechnology, 2006, vol. 24 (6) pág. 703). En este procedimiento, se realiza un ensayo usando un dispositivo que comprende una pluralidad de pocillos, en el que el contenido (sobrenadante) de todos los pocillos se transfiere simultáneamente a un sustrato (placa de vidrio), sustrato que se usa para el ensayo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento alternativo de acuerdo con el preámbulo.

25 Con este fin, un procedimiento de acuerdo con el preámbulo se caracteriza por que cada pocillo de la pluralidad de pocillos comprende una parte inferior provista de un orificio pasante que se extiende desde el pocillo hasta la parte trasera del dispositivo, en el que dicho orificio pasante tiene dimensiones más pequeñas que las células en la pluralidad de pocillos reteniendo por tanto físicamente las células en los pocillos;

30 en el que el procedimiento comprende los pasos de

- poner en contacto la parte trasera del dispositivo con el sustrato,

35 - realizar el paso de transferir líquido desde los pocillos al sustrato transfiriendo líquido de los pocillos por medio de los orificios pasantes al sustrato, y

- realizar el paso de realizar el ensayo usando el sustrato, en el que el compuesto se excreta por las células en el dispositivo, tras lo cual se realiza el paso de realizar el ensayo usando el sustrato, y

40 en el que se selecciona la célula.

La célula seleccionada se puede usar para una variedad de propósitos, tales como propagación, secuenciación, etc. Típicamente, la selección de la célula implicará su extracción del pocillo.

45 Este procedimiento tiene una variedad de aplicaciones, por ejemplo, la selección de células de hibridoma de alta producción.

50 Se ha descubierto que el procedimiento permite la detección conveniente del compuesto. El riesgo de que una célula se salga del pocillo se reduce ya que no es necesario mantener el dispositivo boca abajo. El dispositivo es, por ejemplo, una matriz MEMS, ya que permite una gran cantidad de pocillos (miles o incluso millones). El orificio pasante típicamente no es capaz de dejar que la célula pase a través del orificio pasante y, por tanto, será típicamente de dimensiones más pequeñas que las células en la pluralidad de pocillos.

55 Al menos una parte de la pluralidad de pocillos contiene al menos una célula. Las células son típicamente células eucariotas, tal como una célula de mamífero. Puede ser una célula inmortal (término que incluye una célula inmortalizada) o una célula no inmortal.

60 El líquido que comprende el compuesto excretado por una célula se denomina comúnmente sobrenadante. En el procedimiento de acuerdo con la invención, el líquido que fluye desde el pocillo pasa por la célula, que por lo tanto está en contacto con el medio durante este paso del procedimiento y, por tanto, no se corta del medio durante este paso. Es concebible que haya una capa de medio fresco encima del dispositivo durante este paso.

65 La incubación de las células en los pocillos del dispositivo se puede realizar, por ejemplo, durante al menos 1 minuto o durante períodos más prolongados, tal como al menos una hora o al menos 24 horas, según se desee o sea necesario para el objetivo particular del ensayo y el compuesto que se vaya a detectar usando el ensayo.

Las células están dispuestas en el dispositivo.

5 Se ha descubierto que el procedimiento permite la detección conveniente del compuesto. No es necesario mantener el dispositivo boca abajo. El dispositivo es, por ejemplo, una matriz MEMS. El orificio pasante permite la transferencia del líquido que contiene el compuesto a una mancha de tamaño relativamente pequeño, en particular más pequeño que el área de la superficie del pocillo en el plano principal del dispositivo.

10 De forma ventajosa, el compuesto es un compuesto excretado por una célula.

El compuesto es típicamente un compuesto orgánico, tal como un metabolito o una proteína.

Típicamente, un ensayo implicará la adición de un reactivo, tal como un anticuerpo marcado o un antígeno marcado.

15 El sustrato tendrá típicamente un lado plano para entrar en contacto con la parte trasera del dispositivo y, en general, será un sustrato plano, tal como una lámina de material. Se mantendrá en contacto con la parte trasera del dispositivo para pasar el compuesto del pocillo al sustrato. A medida que el líquido se transfiere desde la multitud de pocillos al sustrato, este sustrato comprende una multitud correspondiente de áreas en contacto con el líquido del dispositivo. Típicamente, el sustrato se retirará (se separará del dispositivo) para realizar el ensayo. Esto permite que las células se mantengan en condiciones adecuadas para mantenerlas vivas y/o reducir el riesgo de contaminación de las células y/o evitar el contacto de las células con cualquier reactivo para el ensayo.

25 Si bien el ensayo puede ser de cualquier tipo, incluyendo un ensayo basado en trazadores radiactivos, es conveniente si el ensayo es algún tipo de ensayo óptico, tal como un ensayo basado en quimioluminiscencia, un ensayo basado en fluorescencia o un ensayo basado en enzimas donde la enzima lleve a cabo un cambio de color (o fluorescencia).

Típicamente, el compuesto transferido a través de los orificios pasantes se adsorberá sobre el sustrato, usando una absorción específica o una adsorción específica según se desee.

30 Se ha descubierto que el procedimiento de acuerdo con la invención se puede realizar con relativamente poca mano de obra.

También se ha descubierto que el ensayo se puede realizar en poco tiempo, tal como en 2 horas o menos.

35 De acuerdo con un modo de realización favorable, al menos el 10 % de la pluralidad de pocillos contiene una única célula.

40 Por tanto, es posible cribar un gran número de células y determinar sus características individuales con respecto al compuesto medido usando el ensayo. Es conocido en la técnica preparar una serie de pocillos con los pocillos que contienen una única célula, por ejemplo a partir del documento EP2855020. El inventor se ha dado cuenta de que el flujo restringido de líquido a través del orificio pasante todavía se puede usar para un ensayo. A diferencia del procedimiento de acuerdo con Love, se reduce el riesgo de que la célula de un pocillo se transfiera al sustrato y se pierda, ya que no es necesario mantener el dispositivo boca abajo, y también se puede reducir el riesgo de contaminación cruzada a medida que la distancia más cercana entre los sobrenadantes de dos pocillos adyacentes transferidos al sustrato es mayor. Además, se reduce el riesgo de que la célula entre en contacto con un reactivo implicado en el ensayo.

50 De acuerdo con un modo de realización favorable, el orificio pasante tiene unas dimensiones que no permiten que la célula pase a través del orificio pasante.

Por tanto, la célula se retiene físicamente en el pocillo, lo que permite que esté disponible para otro uso, tal como para otro ensayo. También garantiza que la célula no entre en contacto con el sustrato.

55 La célula se mantiene físicamente separada del sustrato.

En términos generales, para un dispositivo de acuerdo con la invención adecuado para realizar un ensayo en una célula eucariota, las dimensiones típicas del orificio pasante son de 5 μm o menores en al menos una dimensión paralela a la parte trasera del dispositivo y preferentemente menos de 3 μm . Preferentemente, estos valores van para ambas dimensiones paralelas a la parte trasera del dispositivo.

60 De acuerdo con un modo de realización favorable, el ensayo es un inmunoensayo.

65 Un inmunoensayo permite detectar una gran variedad de compuestos. El inmunoensayo puede ser de cualquier tipo, tal como un ensayo intercalado. Se ha descubierto que el procedimiento de acuerdo con la presente invención es capaz de determinar proteínas tales como anticuerpos en una cantidad inferior a 1 ng.

De acuerdo con un modo de realización especialmente preferente, el sustrato comprende un sustrato microporoso.

Se puede introducir más líquido desde los pocillos, lo que permite una mayor sensibilidad. También permite que el compuesto se absorba en un volumen relativamente compacto, mejorando aún más la sensibilidad. Además, la distancia de difusión media es pequeña, lo que permite que el procedimiento de acuerdo con la presente invención sea relativamente rápido. De acuerdo con un modo de realización preferente, el sustrato permite una mayor velocidad de transporte de líquido en una dirección transversal al plano principal del sustrato que en una dirección paralela al plano principal. Esto ayuda a evitar la contaminación cruzada y a mantener el compuesto fuera de un pocillo en particular en un área más localizada del sustrato. En contraste, el procedimiento de Love no permitiría el uso de sustrato microporoso ya que los sobrenadantes adyacentes entrarían en contacto entre sí y/o las células estarían desprovistas de medio durante la incubación durante la noche.

El sustrato es, por ejemplo, fibra de vidrio, papel o nitrocelulosa.

Típicamente, los poros del sustrato microporoso estarán entre 0,05 μm y 10 μm , preferentemente entre 0,2 μm y 2 μm .

De acuerdo con un modo de realización favorable, el líquido se transfiere usando una diferencia de presión con una presión relativamente baja en un lado del sustrato opuesto al dispositivo.

La presión se puede lograr, por ejemplo, aumentando la presión del aire en la parte frontal del dispositivo. Además o de forma alternativa, la succión se puede aplicar de cualquier manera adecuada, por ejemplo, usando presión reducida ("vacío") en la parte trasera del sustrato o usando una almohadilla absorbente en contacto con la parte trasera del sustrato.

De acuerdo con un modo de realización favorable, el sustrato es un polímero, preferentemente un polímero elegido entre i) difluoruro de polivinilideno y ii) nitrocelulosa.

Estos sustratos son muy adecuados para ensayos, en particular ensayos ópticos e inmunoensayos. Actualmente, el difluoruro de polivinilideno es el más preferente. Se prefiere en particular que el sustrato polimérico sea un polímero microporoso.

De acuerdo con un modo de realización favorable, el dispositivo comprende una parte frontal con la pluralidad de pocillos y una parte trasera, comprendiendo la parte trasera una pluralidad de capilares salientes, circulando los capilares transversalmente al plano principal del sustrato.

Esto ayuda a reducir la propagación del sobrenadante en una dirección paralela a la parte trasera del dispositivo. El compuesto permanece más localizado en el sustrato, haciéndolo más fácil de detectar.

De acuerdo con un modo de realización favorable, la parte trasera del dispositivo es una parte trasera hidrófoba.

Esto ayuda a evitar que el flujo de líquido emane desde un orificio pasante hacia los lados. La parte trasera puede, por ejemplo, haber estado provista de un recubrimiento hidrófobo o puede haberse tratado químicamente para hacerla hidrófoba. Si el dispositivo es un dispositivo a base de silicio, se puede tratar, por ejemplo, con tetrametilsilano.

De acuerdo con un modo de realización favorable, el compuesto es un anticuerpo.

Este es un campo de aplicación importante.

De acuerdo con un modo de realización favorable, se propaga la célula seleccionada.

Por tanto, se pueden aprovechar las propiedades de la célula seleccionada usando el ensayo.

De acuerdo con un modo de realización favorable, la célula seleccionada contiene una secuencia de ácido polinucleico y el procedimiento comprende al menos un paso adicional elegido entre i) la multiplicación de la secuencia de ácido polinucleico, ii) la determinación de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ácido polinucleico, y iii) el aislamiento de la secuencia de ácido polinucleico.

Dicho paso adicional es importante para la valorización del procedimiento de acuerdo con la invención.

De acuerdo con un modo de realización favorable, después del paso de transferir el líquido al dispositivo y, antes del uso del sustrato para el ensayo, el dispositivo se separa del sustrato.

Por tanto, el sustrato se elimina antes de añadir cualquier reactivo para el ensayo, evitando que las células se sometan

al o a los reactivos usados en el ensayo. También puede reducir el riesgo de contaminación de las células. La transferencia del compuesto se puede hacer durante la incubación del dispositivo que contiene las células, o se puede hacer estampando el dispositivo que contiene las células sobre el sustrato y las células se pueden incubar más según se desee.

La invención se ilustrará ahora con referencia a la sección de ejemplo a continuación, y con referencia al dibujo en el que

la Fig. 1 muestra una fotografía de un experimento modelo para estimar la sensibilidad mínima alcanzable mediante el procedimiento de acuerdo con la invención;

la Fig. 2 muestra una fotografía de un experimento que demuestra la viabilidad de la transferencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia desde un microtamiz sobre una membrana PVDF; y

las Fig. 3A-Fig. 30 muestran esquemáticamente un procedimiento de fabricación de un microtamiz adecuado para su uso en la presente invención tanto en vista superior como en sección transversal.

En primer lugar, se describirá un procedimiento contemplado para la fabricación de un microtamiz 390 (Fig. 30) adecuado para su uso en la presente invención, microtamiz 390 que tiene capilares 360' (tubos) que sobresalen de la parte trasera del dispositivo 390.

El silicio monocristalino se puede usar como material estructural principal para la membrana.

Pasos de fabricación:

Fig. 3A. El proceso comienza con una oblea de silicio 300. Se prefiere una oblea de silicio (100) porque, en ese caso, se puede usar un grabado anisotrópico húmedo para liberar la membrana.

Fig. 3B. Deposición de una capa de nitruro de silicio 310 usando Deposición de Vapor Químico a Baja Presión (LPCVD).

Fig. 3C. Modelado de nitruro de silicio 310 usando Grabado Reactivo Iónico (RIE). Aquí se muestra esquemáticamente una matriz de 3 x 3, pero en la práctica la matriz es mucho mayor, por ejemplo, de 100 x 100. La pluralidad de pocillos que se vayan a formar no se limita a una forma particular, tal como rectangular, aunque se prefiere una colocación de los pocillos en forma de rejilla.

Fig. 3D. Oxidación Local de Silicio (LOCOS) para formar una capa temporal de óxido de silicio 319.

Fig. 3E. Modelado protector, con capa protectora 329.

Fig. 3F. Extracción selectiva de nitruro de silicio usando RIE.

Fig. 3G. Grabado Reactivo Profundo de Silicio (DRIE) para formar pequeños orificios redondos 330.

Fig. 3H. Extracción protectora usando cenizas de O_2 y limpieza química con 100 % de HNO_3 .

Fig. 3I. Extracción selectiva de óxido de silicio de la capa temporal 319 usando el grabado químico húmedo en ácido fluorhídrico (HF) o HF tamponado.

Fig. 3J. Grabado Reactivo Profundo de Silicio (DRIE) para formar copas 340 (pocillos 340) y al mismo tiempo profundizar aún más los orificios 330.

Fig. 3K. Extracción de la primera capa de nitruro de silicio 310 usando HF o ácido fosfórico caliente (H_3PO_4).

Fig. 3L. Deposición de una primera capa de nitruro de silicio de baja tensión 350' (Si_3N_4) y una segunda capa de nitruro de silicio de baja tensión 350" en la parte trasera de la oblea 300 por LPCVD.

Fig. 3M. Modelado de la segunda capa de nitruro de silicio 350' en la parte trasera de la oblea 300 usando RIE de nitruro de silicio.

Fig. 3N. Grabado de la parte trasera de silicio para formar una membrana de silicio y exponer tubos de nitruro de silicio 360 cerrados. Obsérvese que la parte inferior de las copas 340 no está expuesta en este paso. Para este paso, se puede usar un grabado anisotrópico húmedo de silicio en TMAH. El proceso DRIE también se podría usar, solo o en combinación con el grabado anisotrópico húmedo.

Fig. 30. Grabado direccional RIE de nitruro de silicio desde la parte trasera de la oblea 300 para crear capilares abiertos 360' (que definan los orificios pasantes 370). Este es un dispositivo 390 adecuado para su uso en el procedimiento de acuerdo con la invención, con una parte delantera 391 y una parte trasera 392. El orificio pasante 370 de un capilar 360' conecta un pocillo 340 con la parte trasera 392.

Fig. 3P. Grabado de la parte trasera para exponer la parte inferior de las copas 340 para hacer que la membrana sea localmente ópticamente transparente, más específicamente las partes inferiores (finas) de las copas 340.

La invención también se refiere a un procedimiento de fabricación de un dispositivo usando los pasos del procedimiento descritos anteriormente, sin cualquier paso que implique la extracción de la capa protectora o sin que una capa previamente formada se limite a los productos químicos específicos y/o a concentraciones de los mismos mencionados.

EJEMPLO 1

Experimento de depósito para estimar la sensibilidad mínima (modelo de experimento no de acuerdo con la invención)

La membrana PVDF (difluoruro de polivinilideno) (membrana PVDF de baja fluorescencia Immun-Blot®, BioRad Laboratories BV, Veenendaal, Países Bajos) se activó en metanol y MilliQ de acuerdo con el fabricante del protocolo.

La membrana PVDF se colocó sobre papel de filtro (Bio-Rad, incluido con el PVDF adquirido) humedecido en PBS.

Se preparó una serie de diluciones de rhEpCAM (proteína EpCAM humana recombinante, Biosistemas ACRO, EPM-H5223, Bethesda, MD, EE. UU.) en el tampón PBS:

A) 100 ng/μL

B) 10 ng/μL

C) 1 ng/μL

D) 100 pg/μL

E) 10 pg/μL

F) 1 pg/μL

G) 0 pg/μL

Se pipeteó manualmente 1 μl de cada concentración sobre la membrana de PVDF tratada previamente.

Después de 10 minutos para permitir que se absorbieran las gotas, la membrana PVDF con manchas A) - G) se incubó con 2 ml de tampón de bloqueo (PBS, BSA al 1 %) durante 15 minutos.

La preparación de la solución de FITC de EpCAM antihumana 2,32 μl de FITC de EpCAM antihumana (0,43 mg/ml de AcZon, Bolonia, Italia) se pipeteó en 2,32 ml de tampón PBS.

Se extrajo el tampón de bloqueo y se incubó la membrana PVDF durante 15 minutos en 2 ml de solución de FITC de EpCAM antihumana.

Se extrajo la solución de anticuerpo y se lavó la membrana PVDF en el tampón de lavado (PBS) durante 2 x 5 minutos.

La tira de PVDF se observó con un microscopio de fluorescencia. El diámetro de la mancha era de 2 mm y una concentración de 1 ng/μl (C) era claramente visible (Fig. 1) mientras que la mancha de 100 pg/μl era perceptible a simple vista.

El diámetro de la mancha en la Fig. 1 es de 2 mm, es decir, bastante grande, lo que indica que la sensibilidad de lectura para manchas más pequeñas con la misma concentración de proteína fluorescente es inferior a 1 ng. Si el diámetro de las manchas es menor, la sensibilidad está incluso muy por debajo de 1 ng.

EJEMPLO 2

Transferencia de un anticuerpo marcado con fluorescencia de un microtamiz sobre una membrana PVDF

Preparación del dispositivo

Se desaireó un microtamiz en metanol y se lavó con MilliQ. El microtamiz se obtuvo de VyCap BV (Deventer, Países Bajos) y se usó sin el soporte de plástico en el que se vende. El microtamiz tiene orificios pasantes con un diámetro de 5 µm.

Preparación de la membrana PVDF

La membrana PVDF (difluoruro de polivinilideno) (tamaño de poro de 0,20 µm, membrana PVDF de baja fluorescencia Immun-Blot®, BioRad Laboratories BV, Veenendaal, Países Bajos) se activó en metanol y MilliQ de acuerdo con el fabricante del protocolo.

Transferencia del anticuerpo marcado con fluorescencia a la membrana PVDF

El microtamiz sin soporte se colocó sobre una membrana PVDF húmeda que flotaba sobre MilliQ en una placa de Petri. (En otro experimento, el microtamiz se colocó sobre papel de filtro (Bio-Rad, incluido con el PVDF comprado humedecido en MilliQ) que también funcionó).

Se pipetearon 6 µl de anti-IgG PE (Sigma-Aldrich, P8547, 0,1-0,3 pg/µl, diluido 1:20, marcado con ficoeritrina) sobre el microtamiz.

Se extrajo el microtamiz levantándolo verticalmente y se obtuvieron imágenes de la membrana PVDF bajo un microscopio de fluorescencia. Se descubrió que la solución pasó con éxito a través del microtamiz y eran visibles pequeñas manchas fluorescentes. Estas manchas tenían un diámetro de aproximadamente 40 µm.

EJEMPLO 3

Ensayo de células de hibridomas únicas que producen un anticuerpo contra un antígeno en PVDF recubierto de antígeno (de acuerdo con la invención)

Preparación de la membrana PVDF

Paso de activación: Activar la membrana PVDF microporosa en metanol y MilliQ de acuerdo con el fabricante del protocolo. La membrana PVDF con un tamaño de poro de 0,45 µm era una membrana PVDF de baja fluorescencia Immun-Blot® (BioRad Laboratories BV, Veenendaal, Países Bajos).

Paso de recubrimiento: Aplicar 500 µL de antígeno 10 ng/µL sobre PVDF e incubar durante 15 minutos.

Paso de bloqueo: Incubar PVDF 15 minutos en PBS, BSA al 1 %.

Preparación del dispositivo

El microtamiz adecuado para su uso en estos experimentos se puede obtener de VyCap BV (Deventer, Países Bajos) y su soporte de plástico se extraerá para nuestros experimentos.

Este microtamiz se desaireará en metanol, se lavará con MilliQ de acuerdo con el protocolo del fabricante y se colocará en PBS.

Carga celular del microtamiz

Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado (tal como hibridoma Gibco® CD, + L-glutamina 4 mM, + penicilina/estreptomicina al 1%). Antes de cargar el microtamiz con las células de hibridoma, las células de hibridoma se lavarán para extraer el anticuerpo ya presente en el medio de cultivo. La suspensión de células de hibridoma se centrifugará a 300 rpm durante 5 minutos. El exceso de medio se extraerá y las células se resuspenderán en un medio fresco a una concentración de aproximadamente 3000 células en un medio de 50 µl. El microtamiz se cargará con células de acuerdo con las instrucciones del fabricante, colocándose el microtamiz en una esponja (Vycap BV). La suspensión de células se pipeteará sobre el microtamiz y, después de que las células se hayan cargado lo suficiente en los pocillos, el microtamiz se puede sumergir completamente en el medio. El exceso de medio se extraerá antes de seguir manipulando el microtamiz.

Transferencia de sobrenadante a la membrana PVDF

El papel de filtro húmedo empapado en PBS se colocará en una placa de Petri.

La membrana PVDF recubierta de antígeno se colocará encima de dicho papel de filtro cuidando que no quede aire atrapado entre el papel de filtro y la membrana.

El microtamiz con células se colocará en la membrana PVDF y se dejará reposar durante la noche en una incubadora a 37 °C, 100 % de humedad, 5 % de CO₂.

5 Incubación con antianticuerpo marcado con fluorescencia

Después del período de incubación, el PVDF se extraerá y se enjuagará con PBS (2 x 5 minutos) y se incubará con 10 ng/μL de anti-IgG-PE durante 15 minutos. Anti-IgG-PE (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE.UU.) contiene ficoeritrina como marcador fluorescente.

10 La membrana PVDF se puede examinar con un microscopio de fluorescencia. Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia son proporcionales a los niveles de producción de anticuerpos de las células de hibridomas individuales.

EJEMPLO 4

15 Ensayo de células de hibridomas únicas que producen anticuerpos contra el antígeno en PVDF no modificado (de acuerdo con la invención)

20 Este experimento se puede realizar de forma análoga al Ejemplo 3 excepto por la preparación de PVDF que no se recubrirá con el antígeno. Después de poner en contacto la membrana PVDF con el líquido de los pocillos, la membrana PVDF se bloquea, por ejemplo, usando la solución de BSA y a continuación se incuba con el antianticuerpo marcado con fluorescencia.

25 La membrana PVDF se puede examinar con un microscopio de fluorescencia. Las diferencias en la intensidad de la fluorescencia son proporcionales a las diferencias en los niveles de producción de anticuerpos de las células de hibridomas individuales.

EJEMPLO 5

30 Estampado en PVDF (de acuerdo con la invención)

El Experimento 3 se puede continuar de la siguiente manera. Después de la incubación durante la noche, el microtamiz del Ejemplo 3 se puede colocar durante 5 minutos sobre una membrana PVDF recién preparada revestida con antígeno como se describe en el Ejemplo 3.

35 Se puede usar un examen visual con un microscopio de fluorescencia para revelar que las manchas fluorescentes están más localizadas.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para seleccionar una célula mediante la realización de un ensayo para un compuesto excretado por las células usando un dispositivo (390), en el que el dispositivo (390) comprende
 - una parte delantera (391) con una pluralidad de pocillos (340), y
 - una parte trasera (392);la pluralidad de pocillos (340) del dispositivo (390) contiene células; comprendiendo dicho procedimiento los pasos de
 - transferir líquido de los pocillos (340) al sustrato, y
 - usar el sustrato para realizar el ensayo; **caracterizado** por que cada pocillo de la pluralidad de pocillos (340) comprende una parte inferior provista de un orificio pasante que se extiende desde el pocillo hasta la parte trasera del dispositivo (390), en el que dicho orificio pasante tiene dimensiones más pequeñas que las células de la pluralidad de pocillos reteniendo por tanto físicamente las células en los pocillos;en el que el procedimiento comprende los pasos de
 - poner en contacto la parte trasera del dispositivo (390) con el sustrato,
 - realizar el paso de transferir líquido desde los pocillos (340) al sustrato transfiriendo líquido desde los pocillos (340) por medio de los orificios pasantes (370) al sustrato, y
 - realizar el paso de realizar el ensayo usando el sustrato, en el que el compuesto se excreta por las células en el dispositivo, tras lo cual se realiza el paso de realizar el ensayo usando el sustrato, yen el que se selecciona la célula.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que al menos el 10 % de la pluralidad de pocillos (340) contiene una única célula.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, el orificio pasante tiene dimensiones que no permiten que la célula pase a través del orificio pasante.
4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ensayo es un inmunoensayo.
5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato comprende un sustrato microporoso.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el líquido se transfiere usando una diferencia de presión con una presión relativamente baja en un lado del sustrato opuesto al dispositivo (390).
7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el sustrato es un polímero, preferentemente un polímero elegido entre i) difluoruro de polivinilideno y ii) nitrocelulosa.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el dispositivo (390) comprende una parte frontal (391) con la pluralidad de pocillos (340) y una parte trasera (392), comprendiendo la parte trasera (392) una pluralidad de capilares sobresalientes (360'), circulando los capilares (360') transversalmente al plano principal del sustrato.
9. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la parte trasera del dispositivo (390) es una parte trasera hidrófoba.
10. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto es un anticuerpo.
11. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se propaga la célula seleccionada.
12. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la célula seleccionada contiene una secuencia de ácido polinucleico y el procedimiento comprende al menos un paso adicional elegido entre

i) la multiplicación de la secuencia de ácido polinucleico, ii) la determinación de la secuencia de nucleótidos de la secuencia de ácido polinucleico, y iii) el aislamiento de la secuencia de ácido polinucleico.

- 5 13. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que, después del paso de transferir el líquido al dispositivo y antes del uso del sustrato para el ensayo, el dispositivo se separa del sustrato.

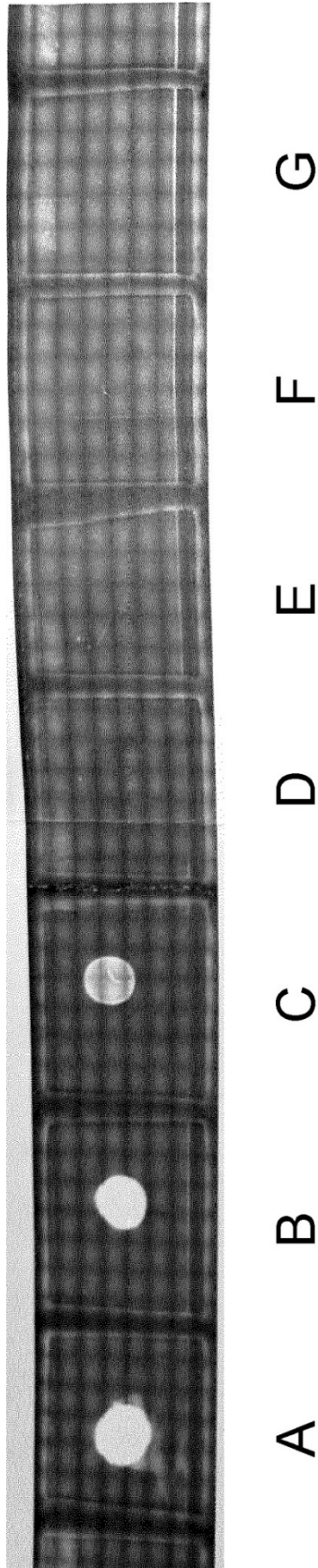


Fig. 1

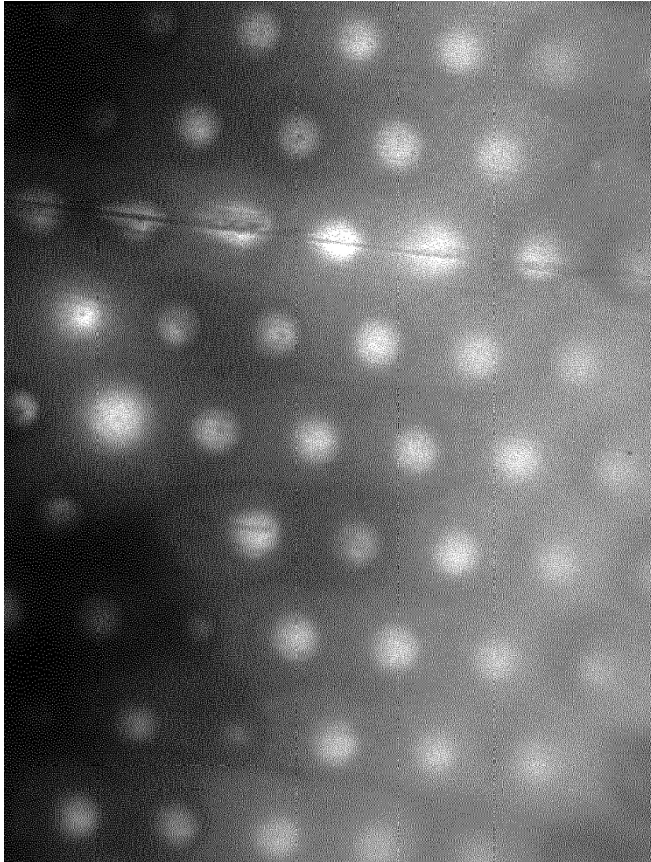


Fig. 2

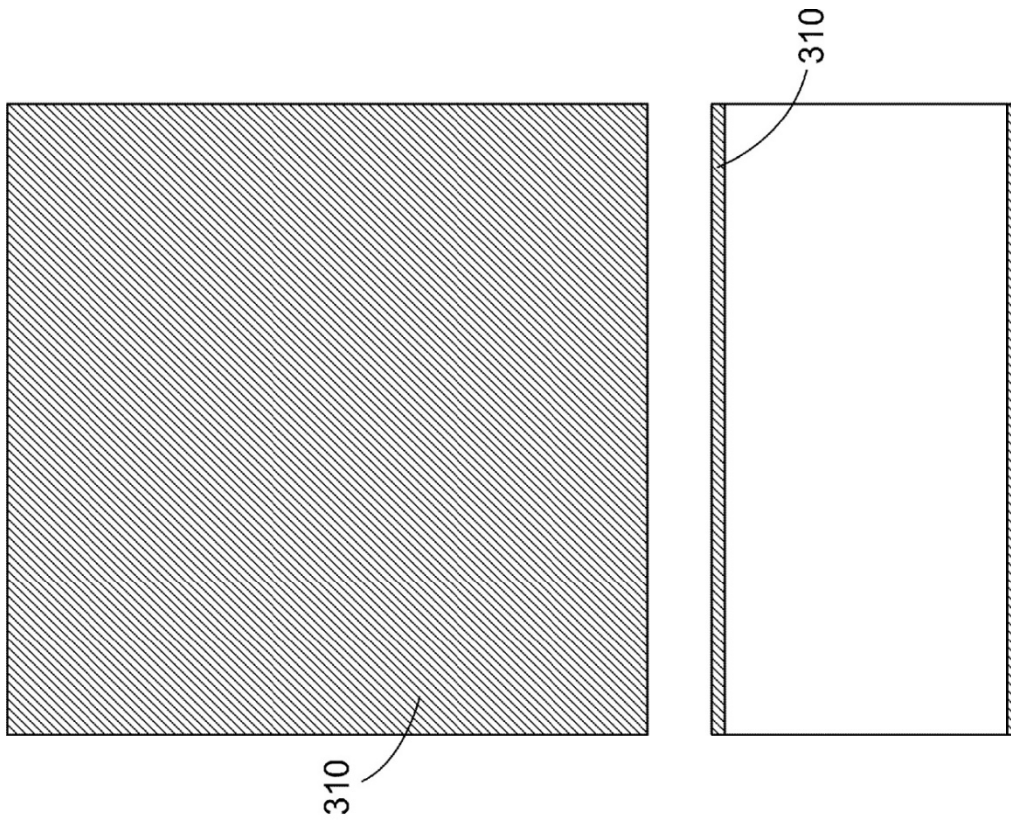


Fig. 3B

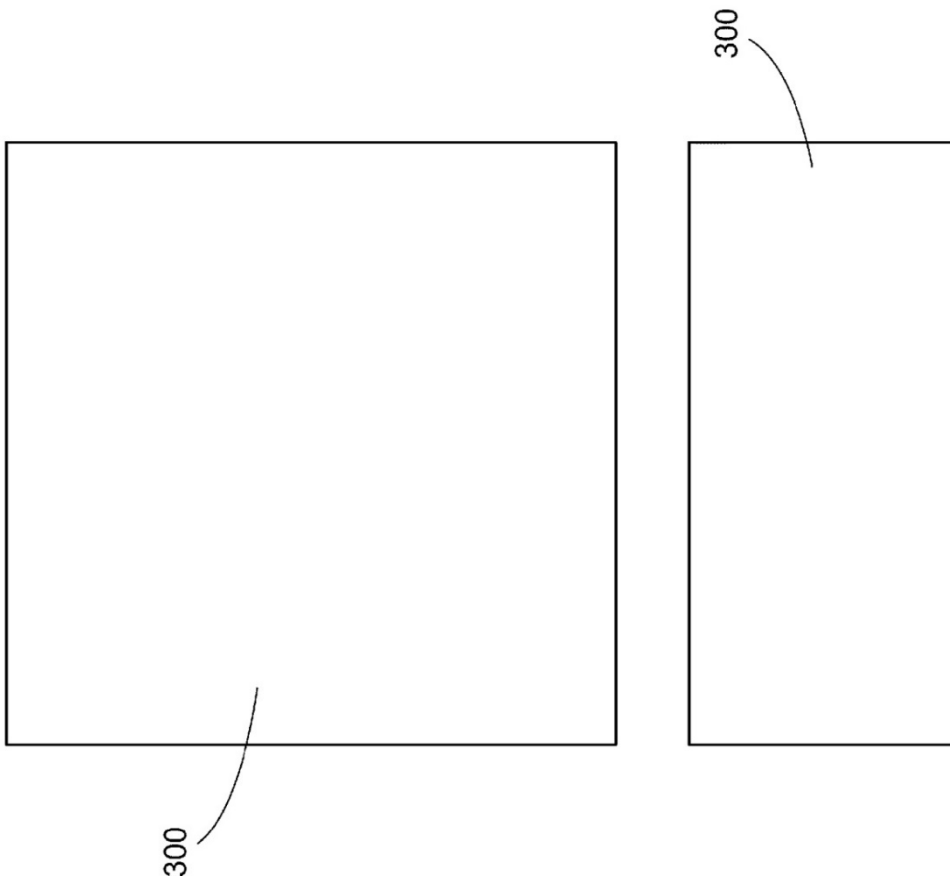


Fig. 3A

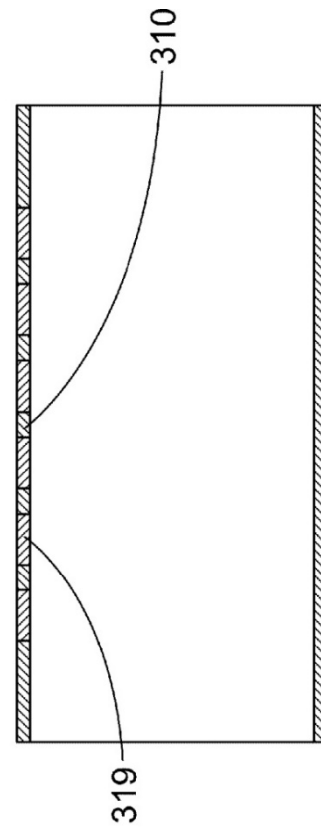
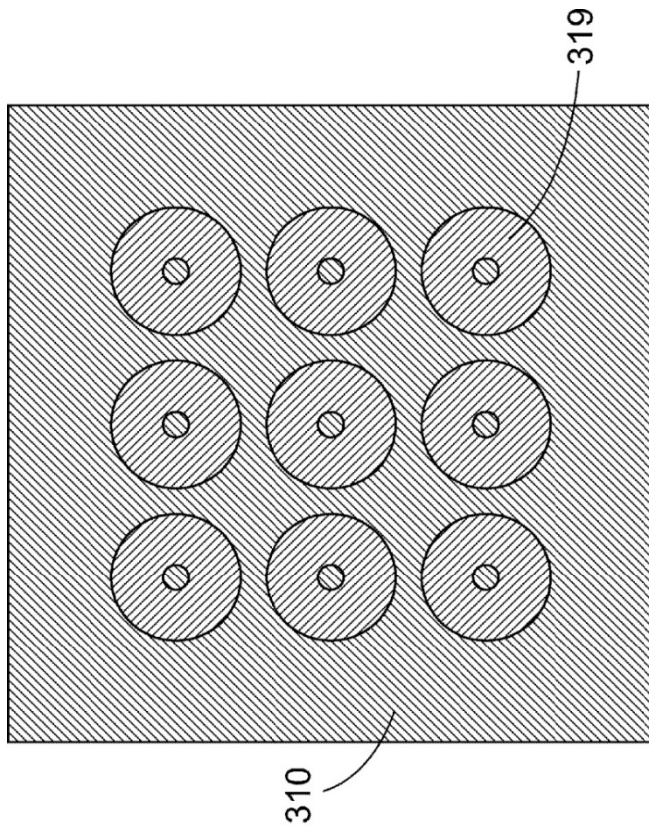


Fig. 3D

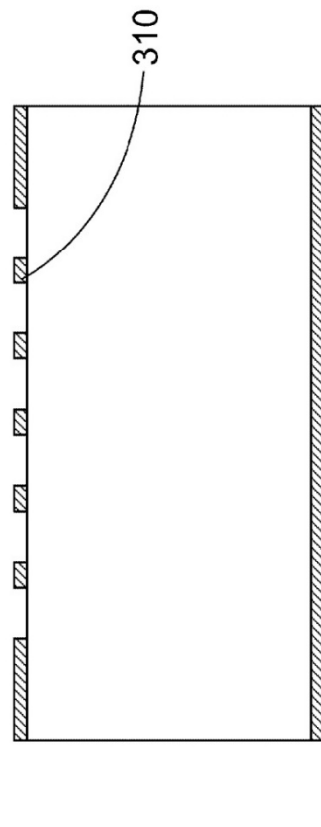
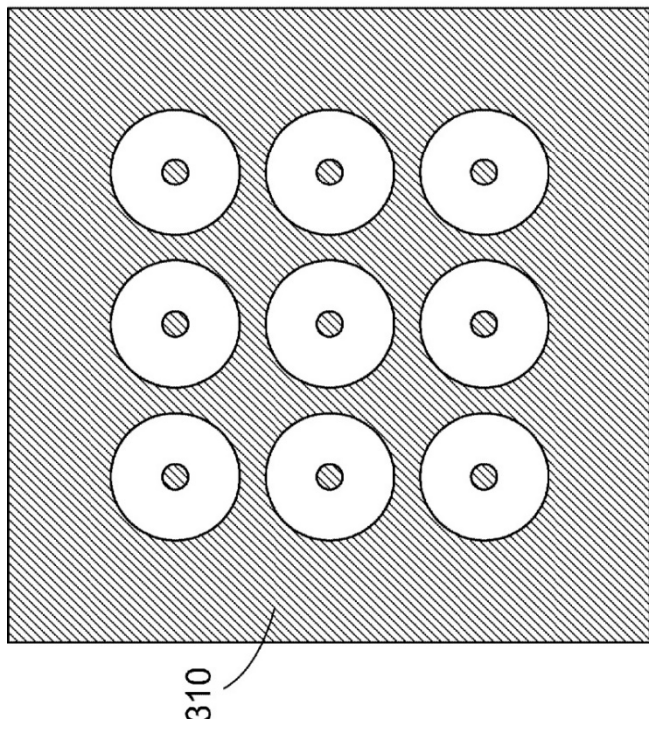


Fig. 3C

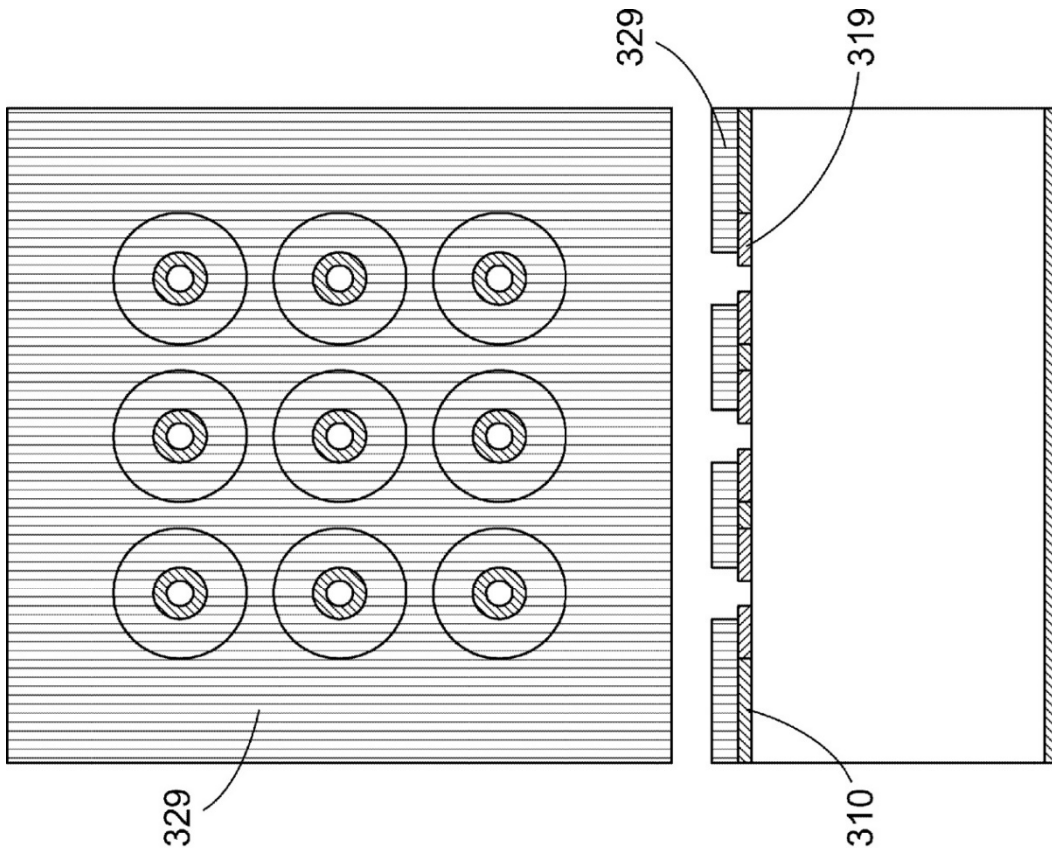


Fig. 3F

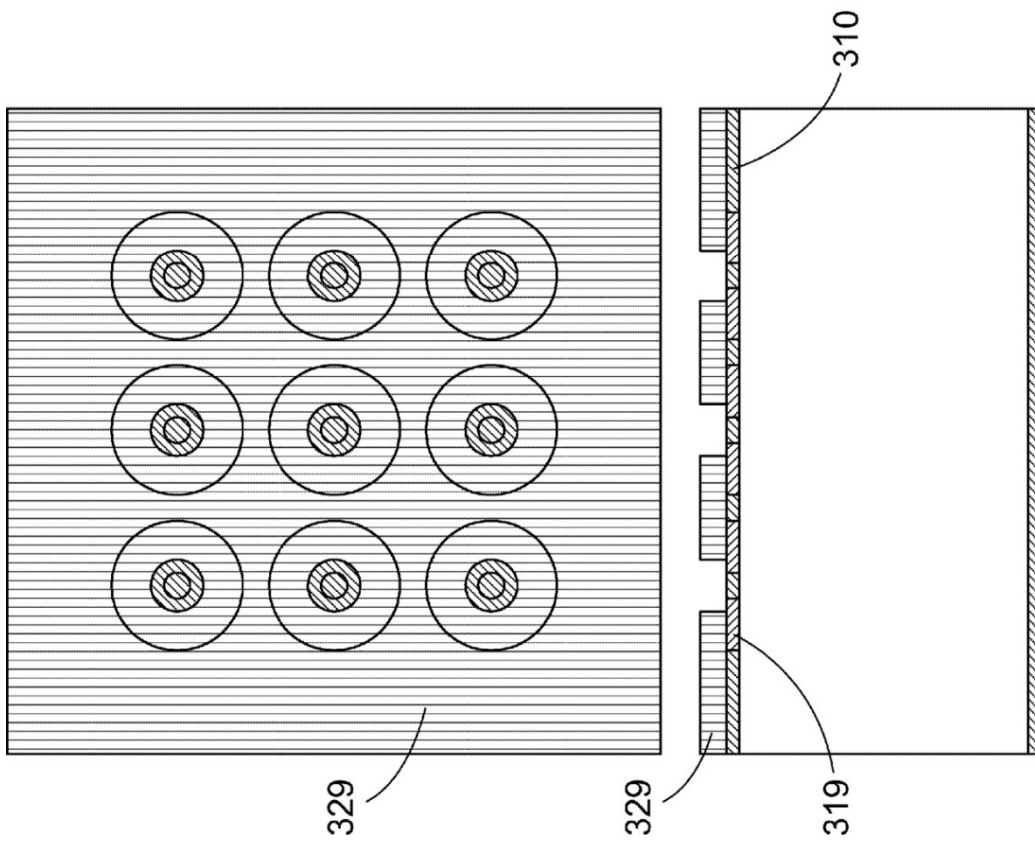


Fig. 3E

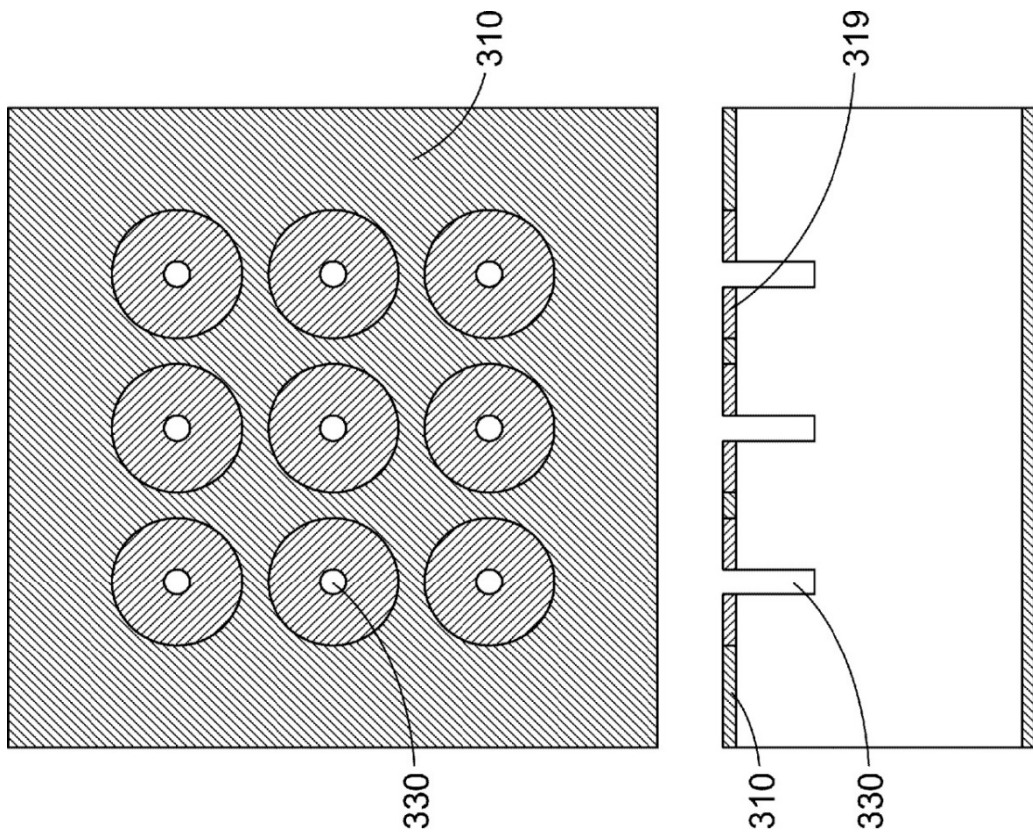


Fig. 3H

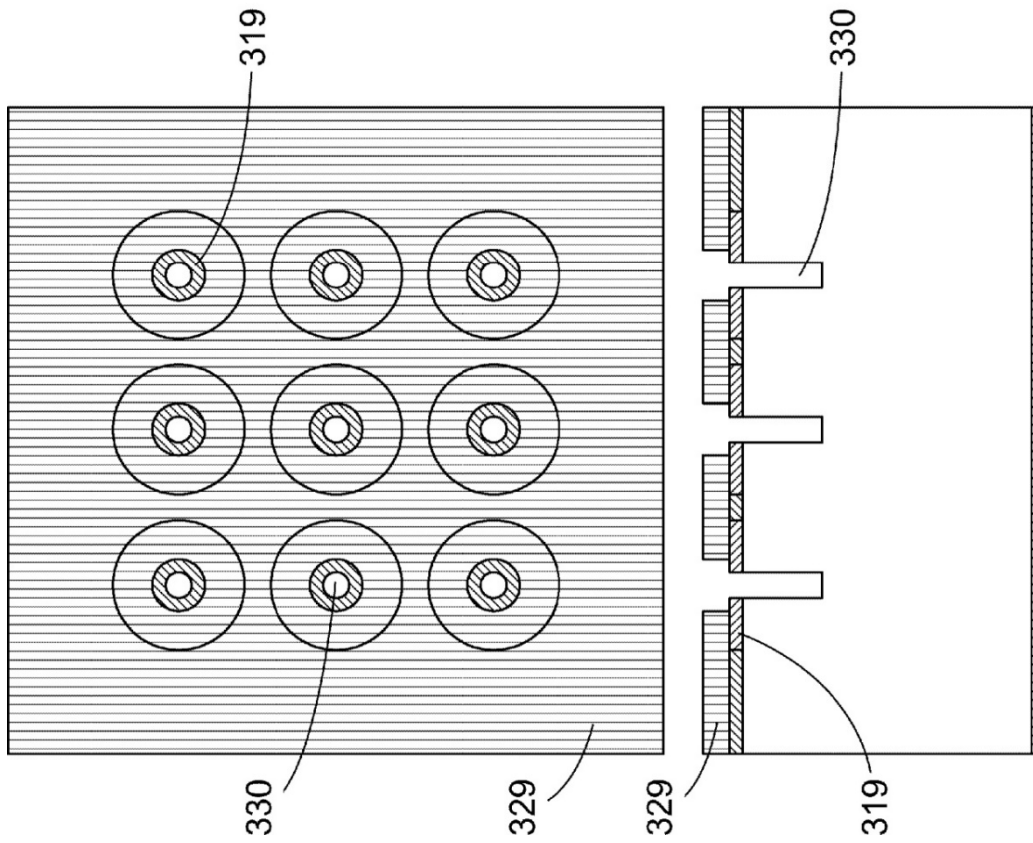


Fig. 3G

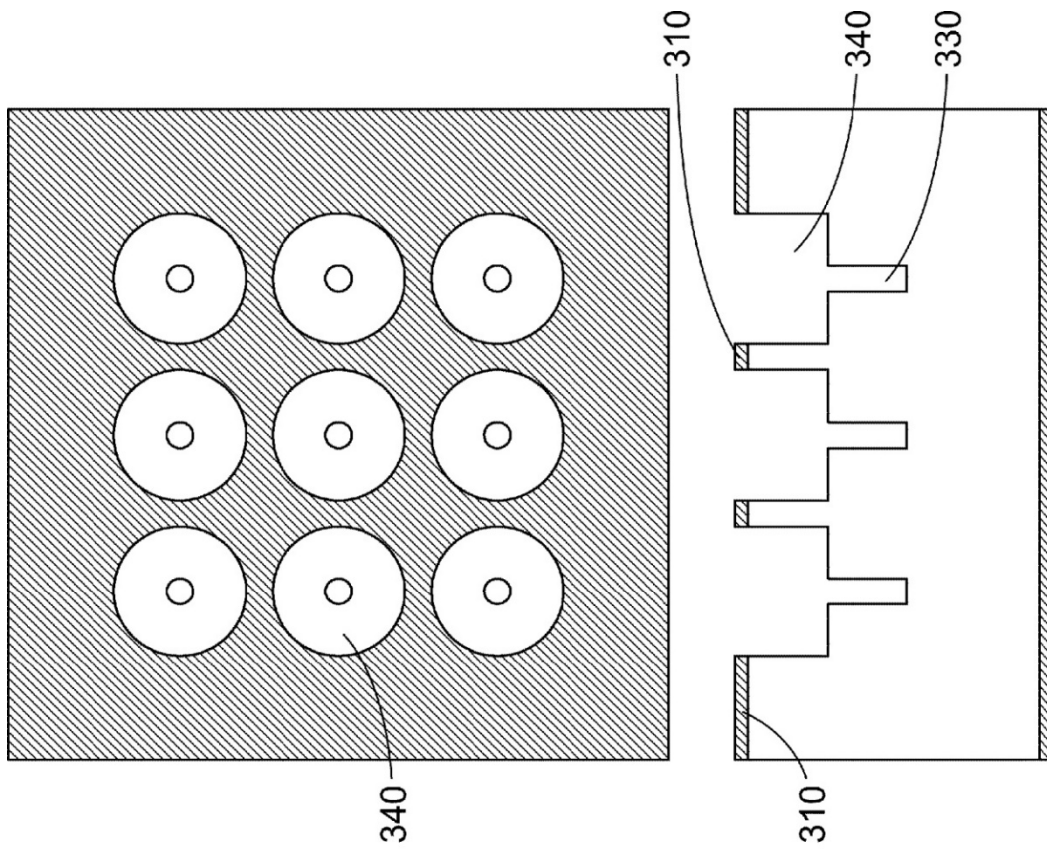


Fig. 3J

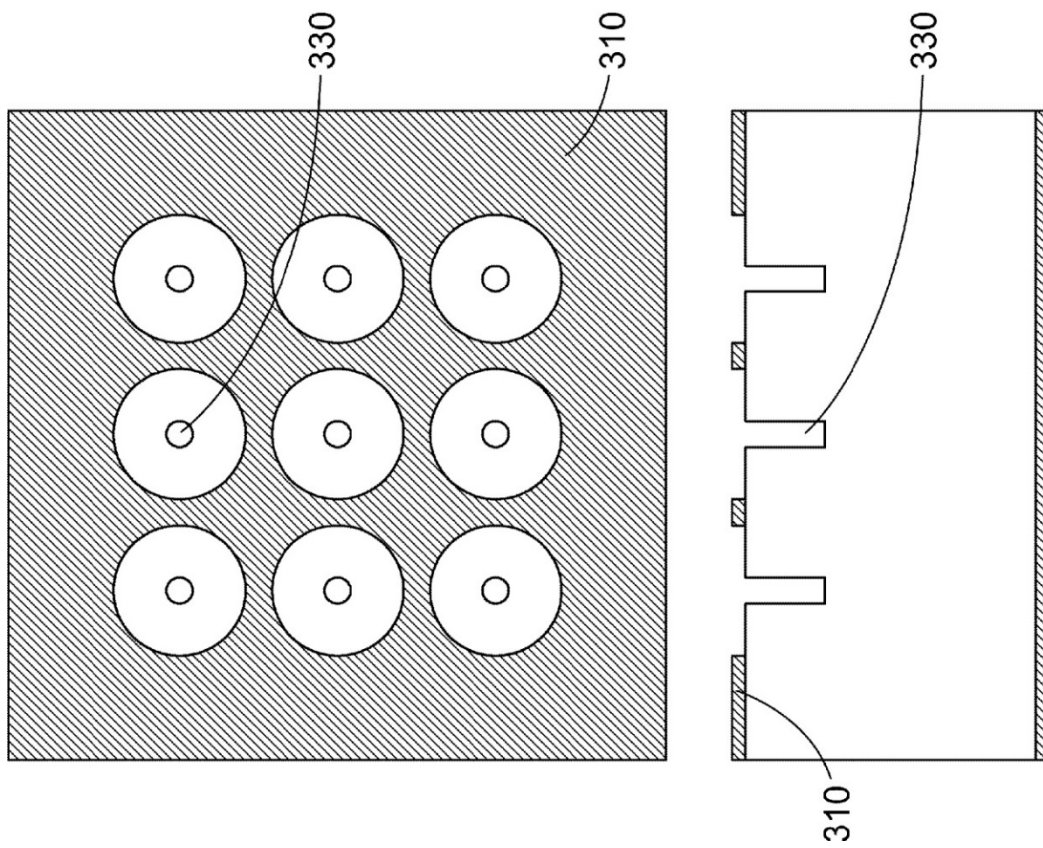


Fig. 3I

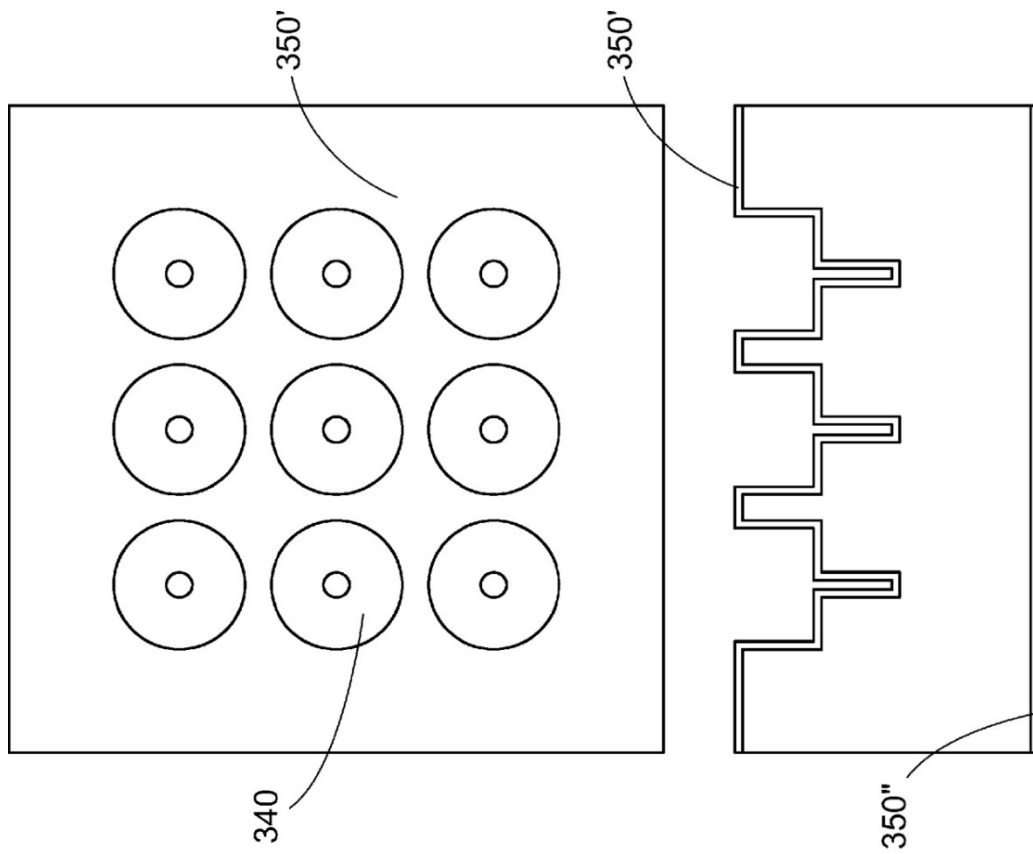


Fig. 3L

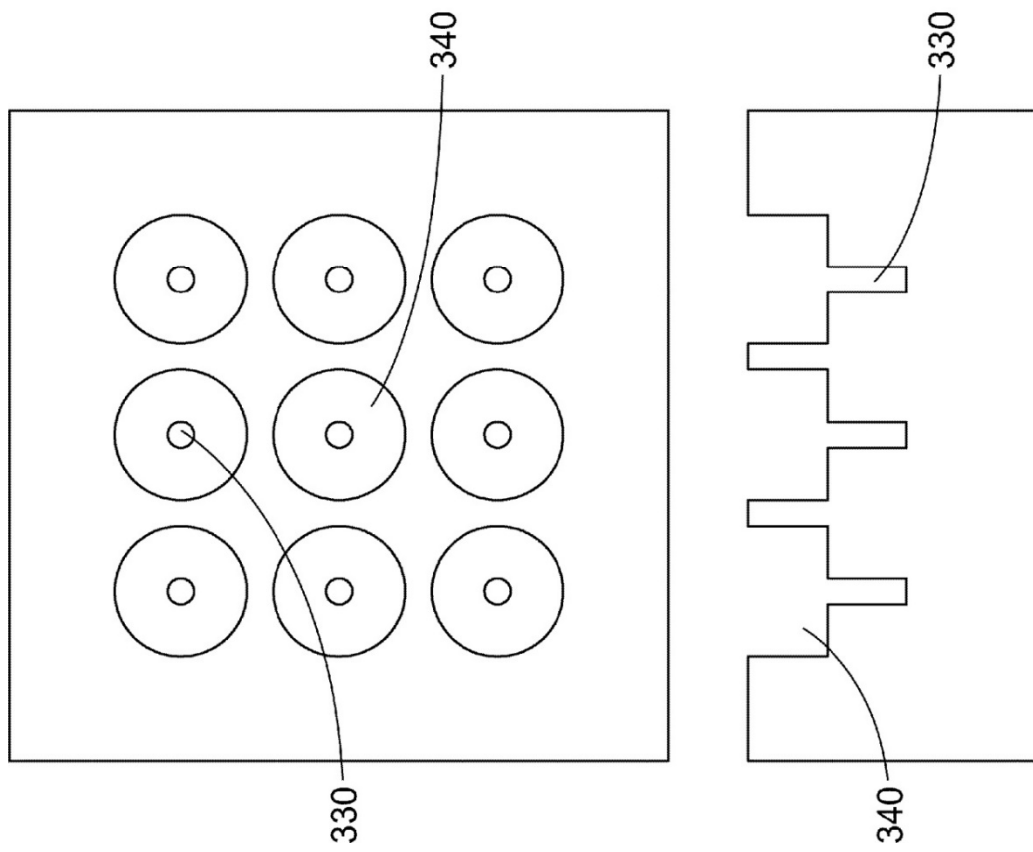


Fig. 3K

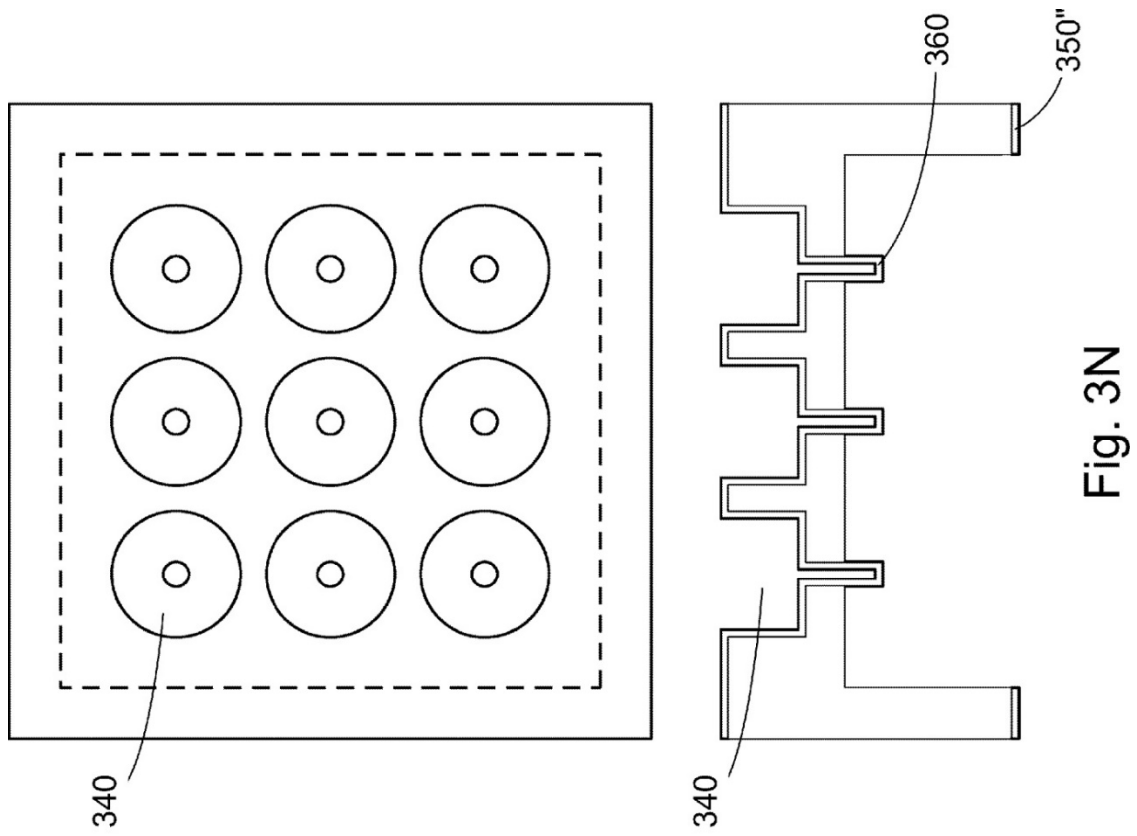


Fig. 3N

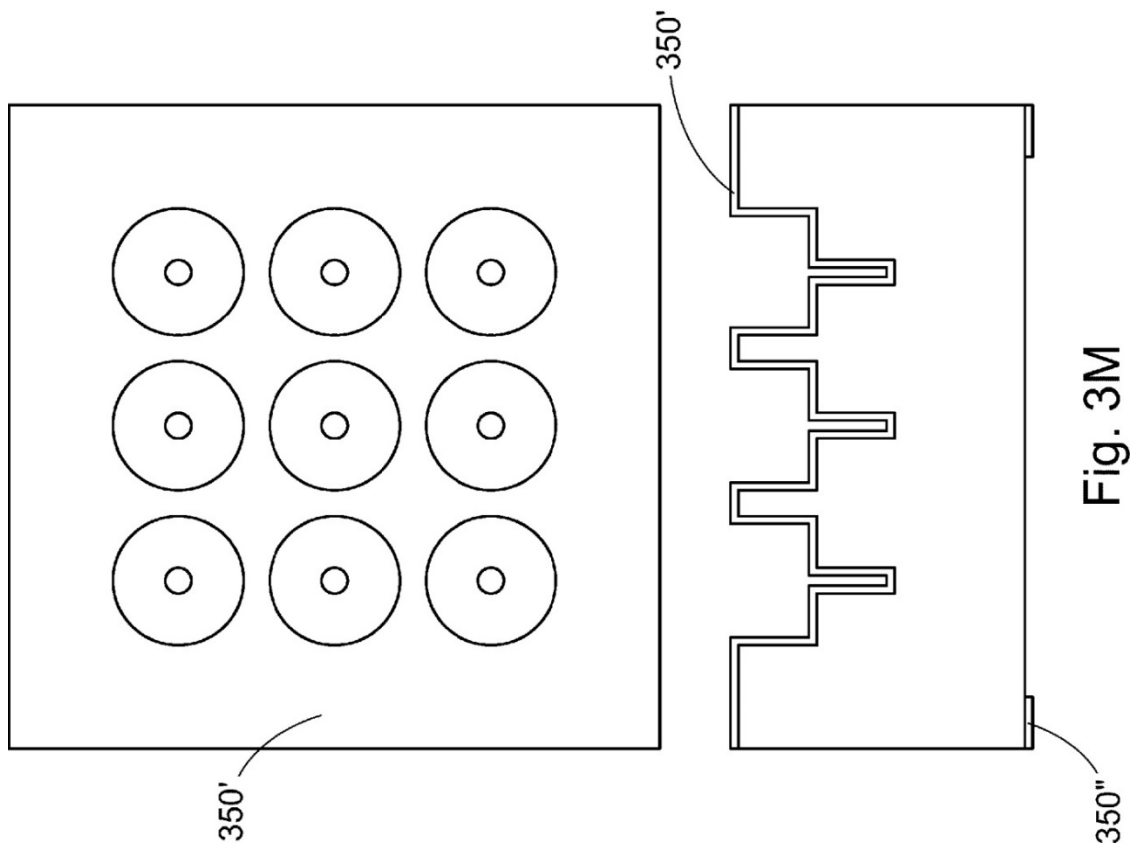


Fig. 3M

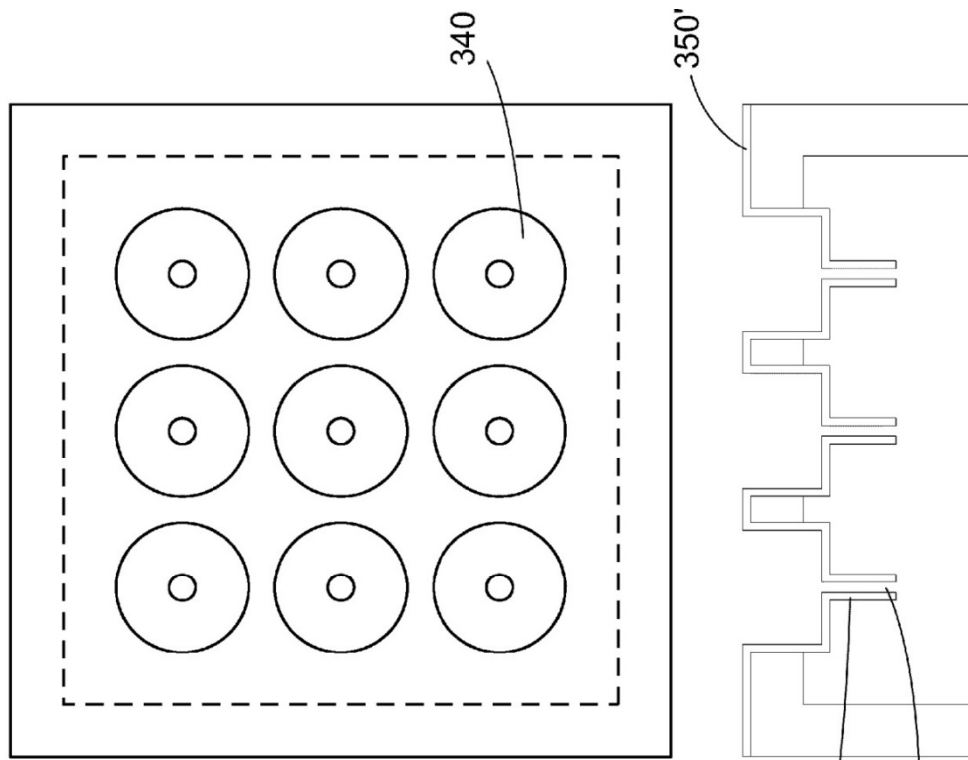


Fig. 3P

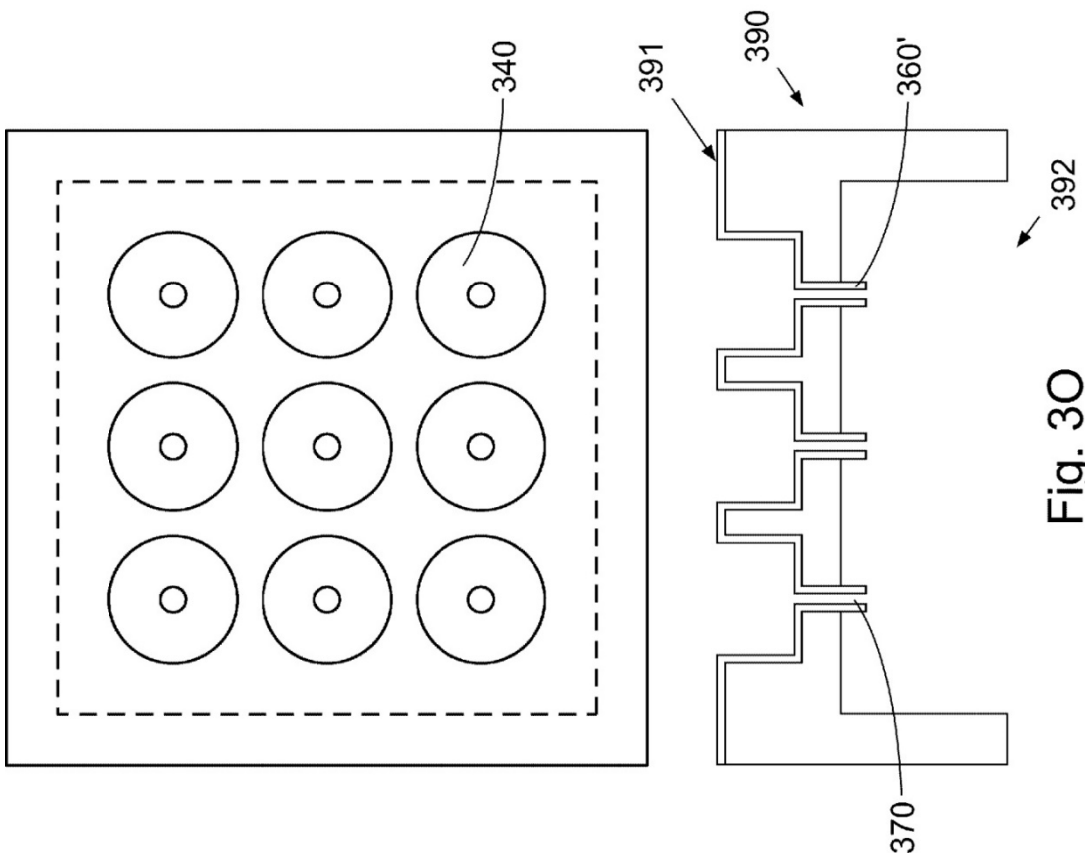


Fig. 3O