

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 975**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 1/02 (2006.01)

B01F 13/00 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08735283 .7**

96 Fecha de presentación: **16.04.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2136921**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.12.2009**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para la manipulación de gotas**

30 Prioridad:

17.04.2007 DE 102007018056

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

17.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

17.12.2012

73 Titular/es:

**FRAUNHOFER-GESELLSCHAFT ZUR
FÖRDERUNG DER ANGEWANDTEN
FORSCHUNG E.V. (50.0%)
Hansastraße 27c
80686 München, DE y
INSTITUT FÜR BIOPROZESS- UND
ANALYSENMESSTECHNIK E.V. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ZIMMERMANN, HEIKO;
FUHR, GÜNTER;
GASTROCK, GUNTER y
METZE, JOSEF**

74 Agente/Representante:

ESPIELL VOLART, Eduardo María

ES 2 392 975 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y dispositivo para la manipulación de gotas

La invención se refiere a un procedimiento para la manipulación de gotas líquidas, en particular, de gotas con muestras biológicas, bajo la acción de campos eléctricos, y a un aparato de cultivo para células biológicas que presenta un dispositivo para la implementación de un procedimiento de este tipo.

Es conocido el desplazar gotas líquidas en una superficie de sustrato a través de la acción de un campo eléctrico (véase, por ejemplo, J. A. Schwartz et al. en "Lab on a Chip", vol. 4, 2004, pp. 11 – 17). El campo eléctrico se genera con electrodos que están integrados en la superficie del sustrato. Puede generarse un campo de tensión continua ajustado localmente de manera selectiva, con el cual se controla la humectación de la superficie del sustrato (denominado 'procedimiento de electrohumectación', electrocapilaridad) o un campo eléctrico de alta frecuencia, con el cual se desplazan las gotas a través de dielectroforésis negativa o positiva u ondas progresivas.

En el procedimiento de electrohumectación, la humectación se ajusta de manera diferente en lados opuestos de la gota de modo que la gota se desplaza hacia el lado que presenta la humectación más intensa. Al aplicar un campo eléctrico de alta frecuencia, una polarización de la gota provoca una variación de la fuerza de adhesión entre la gota y la superficie del sustrato. Los campos eléctricos de alta frecuencia pueden generarse, por ejemplo, mediante la generación de ondas progresivas en la superficie del sustrato, de manera que la variación de la fuerza de adhesión presenta diferente intensidad en lados opuestos entre sí de la gota. Como resultado, se genera una fuerza resultante bajo cuyo efecto la gota se desplaza a lo largo de la superficie del sustrato.

La aplicación práctica de las técnicas mencionadas está sujeta a intensas restricciones cuando deben desplazarse gotas con muestras biológicas, en particular, células, debido a los siguientes problemas. En primer lugar, se ha constatado que células en gotas desplazadas eléctricamente muestran variaciones no reproducibles tales como, por ejemplo, una vitalidad reducida. Además, en las técnicas convencionales puede presentarse una deformación indeseada de las gotas, por ejemplo, debido a un flujo en la dirección de anchura. Sin embargo, las deformaciones pueden ser desventajosas dado que están ligadas a modificaciones indeseadas de la disposición geométrica de las células en la gota. Otras ventajas se producen debido a la limitada compatibilidad con otras técnicas para la manipulación de muestras biológicas tales como, por ejemplo, un cultivo a largo plazo, una deposición de gotas en compartimentos de placas de microtitulación o un ajuste de determinadas condiciones ambientales para la conservación de la vitalidad de las células.

Otros dispositivos para la manipulación de gotas líquidas son conocidas por las patentes EP-A-1386657, EP-A-1707938, WO2006/026351A, US2007/242105 y WO2008/007511A.

El objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento mejorado para la manipulación de gotas líquidas, mediante el cual se superen las desventajas de la técnica convencional. Además, el objetivo de la invención es facilitar un dispositivo mejorado para la manipulación de gotas.

Este objetivo se alcanza gracias a un procedimiento o un dispositivo con las características de las reivindicaciones independientes. De las reivindicaciones dependientes se desprenden aplicaciones y modos de realización ventajosos de la invención.

Según un primer punto de vista, el objetivo se alcanza, en particular, gracias a la enseñanza técnica de manipular al menos una gota en una superficie de soporte de un soporte de gotas bajo la acción de un campo eléctrico, estando la gota colgando de la superficie de soporte. La gota está unida a la superficie del soporte en la que se genera el campo eléctrico (o en la que presenta una intensidad máxima) exclusivamente mediante una fuerza de adhesión. La gota está en contacto con la superficie del soporte en una parte superior o lateral de la gota.

La gota presenta un área de acumulación predeterminada. Si en la gota se encuentra al menos una partícula en suspensión, en particular, al menos una célula biológica en suspensión, esta se acumula, bajo el efecto de la gravitación, en la zona de acumulación. El campo eléctrico se genera en la superficie del soporte. La máxima intensidad de campo actúa sobre la gota en una zona de contacto en la que la gota está en contacto con la superficie del soporte. Gracias a la orientación de la superficie de contacto de manera que la normal de la superficie no presente ninguna componente vectorial contrapuesta a la dirección de la gravitación, la zona de acumulación y la zona de contacto presentan una separación mutua. La zona de acumulación se constituye en una parte inferior de la gota (lado inferior de la gota). En el lado inferior, el cual se dirige en la dirección de la fuerza de gravitación, la intensidad de campo del campo eléctrico se reduce en comparación con la zona de contacto. Partículas en suspensión se encuentran en la gota en una zona en la que fuerzas que se inducen a través del campo eléctrico están reducidas o una zona está libre de este tipo de fuerzas.

De manera ventajosa, gracias a la disposición de la gota colgando en la superficie del soporte, pueden disponerse células biológicas en suspensión en la zona de acumulación, cuyo punto de gravedad geométrico está

separado de la zona de contacto en la que actúa la fuerza sobre la gota. Los inventores han constatado que, manteniendo una separación de las células en suspensión respecto de la zona de contacto, se reduce la carga de las células por el campo eléctrico. Se evitan modificaciones indeseadas de las células. Se simplifica el ajuste de condiciones de cultivo predeterminadas y una manipulación más cuidadosa con las células.

En relación con el dispositivo, el objetivo se alcanza, en particular, gracias a la enseñanza técnica de proporcionar un aparato de cultivo para células biológicas que comprende un dispositivo para la manipulación de gotas con un soporte para gotas cuya superficie de contacto está constituida para el alojamiento de al menos una gota y crea, con la dirección de la fuerza de atracción terrestre (gravitación), un ángulo inferior o igual a 90°. La gota que cuelga en la superficie del soporte mediante una fuerza de adhesión presenta una forma tal que pueden acumularse células en suspensión en el lado inferior de la gota y, con ello, presentan una separación respecto de la superficie del soporte. La forma de la gota se determina, de manera ventajosa, por la fuerza de gravitación. Se evitan deformaciones no reproducibles. Otra ventaja importante de la invención consiste en que, gracias a la disposición colgante, se facilita el movimiento de la gota. Se evita un flujo a lo ancho del líquido, de manera que la zona de contacto en la que actúa el campo eléctrico es menor que en el caso del desplazamiento convencional de gotas sobre sustratos.

Con el término "gota que cuelga" se indica en este caso, de manera general, una gota líquida que, en una parte superior y/o una parte lateral, está en contacto con la superficie del soporte en la que se constituye el campo eléctrico para la generación de la fuerza y que, en particular, está equipada con un dispositivo de electrodos para la generación del campo eléctrico. Preferiblemente, una parte inferior de la gota que cuelga queda libre, sin embargo, de manera alternativa, puede estar sustentada por una superficie de fondo adicional de un elemento de fondo. Con el término "campo eléctrico" se designa aquí cualquier campo electromagnético o cualquier solapamiento de campos que sea adecuado para ejercer una fuerza con uno de los procedimientos conocidos, en particular, con el procedimiento de electrohumectación, ondas progresivas eléctricas y/o dielectroforésis negativa o positiva. El campo eléctrico es un campo de tensión continua o un campo de tensión alterna que se modifica de manera local para ejercer fuerza a lo largo de la superficie del soporte. Con el término "manipulación" de la gota se designa cualquier influencia encauzada (controles) de la posición, la forma, el tamaño y/o la composición de la gota en la superficie del soporte.

Con el término "soporte de gotas" se designa cualquier estructura que presente una superficie de soporte sólida dirigida hacia abajo y/o hacia un lado, en la cual puedan adherirse gotas. Según la invención, la superficie de soporte está prevista en un aparato de cultivo. La "superficie de soporte" para el alojamiento de la gota representa, en general, una superficie sólida que, preferiblemente, está fabricada de un material biológicamente inerte, por ejemplo, PTFE o vidrio. La forma de la superficie del soporte puede elegirse en función de la aplicación concreta de la invención. La superficie de contacto puede presentar, en particular, una superficie totalmente plana, una superficie compuesta por subáreas planas con diferente inclinación o una superficie curva. La superficie puede estar constituida de manera plana o en forma de tiras. La superficie del soporte puede presentar una superficie lisa o estructurada.

El dispositivo de electrodos para la generación del campo eléctrico comprende unos electrodos fijos que están dispuestos en la superficie del soporte o encastrados en ésta o, de manera alternativa, al menos un electrodo móvil que está dispuesto de manera que puede desplazarse en un lado trasero de la superficie del soporte. Los electrodos están conectados con un dispositivo de control y están constituidos para constituir el campo eléctrico en la superficie del soporte de manera local y temporalmente variable de manera que se ejerza sobre la gota una fuerza dirigida.

Las ventajas de la invención son especialmente manifiestas en la manipulación de gotas que contienen partículas sensibles al campo eléctrico. La aplicación principal se da con partículas que comprenden células biológicas. La composición de la gota manipulada según la invención puede elegirse, de manera ventajosa, en función del objetivo concreto. Según una primera variante, la gota puede contener al menos una célula biológica en suspensión. La gota con la al menos una célula se desplaza en la superficie de contacto y, de manera opcional, se somete a etapas de cultivo, tratamientos y/o mediciones. Según una segunda variante, la gota puede estar libre de células. En este caso, la gota está constituida exclusivamente por un líquido sin células que comprende, por ejemplo, una solución alimenticia o un líquido con componentes biológicamente activos (incluidas macromoléculas biológicas o componentes celulares). En el caso de la segunda variante, la manipulación de la gota (con al menos una célula o sin ella) comprende preferiblemente un desplazamiento hacia otra gota (con al menos una célula o sin ella), la cual está dispuesta en la superficie del soporte, pudiendo estar la otra gota con la al menos una célula colgando, libre de campos eléctricos, en la superficie del soporte, o sometiéndose también a la manipulación según la invención. Con ello, de manera ventajosa, en general, en la superficie del soporte se desplaza al menos una gota con al menos una célula y/o al menos una gota sin células hacia una gota sin células o hacia una gota con al menos una célula.

Según unos modos preferidos de realización de la invención, en la superficie de soporte pueden estar

previstos, de manera individual o combinados, los siguientes movimientos de las gotas. En primer lugar, pueden unirse entre sí dos o más gotas, conteniendo al menos una de las gotas al menos una célula. De manera ventajosa, las gotas unidas pueden influirse mutuamente para ajustar condiciones predeterminadas para la al menos una célula. La unión de al menos dos gotas puede comprender, por ejemplo, una fusión de gotas para alimentar a una primera gota con al menos una célula un líquido, una sustancia activa y/u otra célula. De manera alternativa, la unión de al menos dos gotas puede comprender una adición mutua de gotas sin una mezcla entre sí. En este caso, se consigue, de manera ventajosa, la constitución de superficies límite curvas entre las gotas que facilitan condiciones de cultivo predeterminadas para la al menos una célula. Además, en gotas no mezcladas entre sí pueden generarse, de manera ventajosa, gradientes de sustancias, en particular, para el ajuste de condiciones de cultivo.

En segundo lugar, puede estar previsto un desplazamiento de la gota a lo largo de subáreas de la superficie de soporte con diferente inclinación. De manera ventajosa, en este caso, el desplazamiento de la gota puede influirse de manera encauzada, además de por la fuerza del campo eléctrico, también por la inclinación de la superficie del soporte.

En tercer lugar, el desplazamiento de la gota puede conducir a un dispositivo de goteo de la superficie del soporte en el que está prevista una separación de la gota de la superficie del soporte (goteo).

En cuarto lugar, el desplazamiento puede estar previsto hacia una superficie escalonada de la superficie del soporte (por ejemplo, un resalte o una depresión), en la que está prevista, de manera ventajosa, una fijación de la gota mediante una fuerza de adhesión incrementada.

Finalmente, el movimiento de la gota puede comprender un desplazamiento en una subárea libre de campos de la superficie del soporte, en la cual, de manera ventajosa, puede garantizarse un cultivo no influido por campos eléctricos.

Variantes ventajosas de la invención comprenden una unión de gotas para realizar manipulaciones de gotas predeterminadas y/o ajustar condiciones de cultivo. Por ejemplo, la unión de gotas representa un medio especialmente sencillo para la ampliación de gotas. Puede alimentarse a una gota considerada una o varias gotas hasta que se alcance una dimensión de goteo crítica y la gota compuesta se caiga de la superficie del soporte por su propio peso. De manera ventajosa, este proceso de goteo puede controlarse de manera encauzada según la invención. De manera alternativa, la unión de gotas puede servir para una compensación de una pérdida de líquido por evaporación. Según otra alternativa, la unión de gotas comprende una constitución de puentes entre subáreas verticales enfrentadas entre sí de la superficie del soporte. Las subáreas de la superficie del soporte constituyen un intersticio orientado en vertical en el que al menos dos gotas constituyen, bajo la acción de fuerzas de adhesión, una gota compuesta con un mayor volumen que puede superar la dimensión de goteo crítica.

Una aplicación importante de la unión de gotas consiste en la interacción mutua encauzada de las gotas. Preferiblemente, se hacen interactuar al menos una gota de muestra con al menos una célula y al menos una gota de sustrato con al menos una sustancia activa para someter a la célula a un tratamiento químico o biológico. Este modo de realización de la invención es ventajoso, en particular, para el cultivo de células biológicas. Con la invención puede ampliarse considerablemente la aplicación del cultivo convencional en gotas colgantes.

La superficie de soporte es, en general, una superficie cerrada que, además de los componentes previstos de manera opcional tales como, por ejemplo, el dispositivo de goteo, la subárea libre de campos y/o la estructura escalonada, puede estar dotada además con al menos una abertura de paso. La abertura de paso es una interrupción de la superficie del soporte. La dimensión de la abertura de paso se elige, preferiblemente, de manera que una gota puede colgar sujeta en la abertura de paso bajo la acción de la fuerza de adhesión. La dimensión de la abertura de paso se elige, por ejemplo, en el intervalo de 50 μm a 10 mm, en particular, de 100 μm a 5 mm. De manera alternativa, la abertura de paso puede presentar un diámetro mayor, de manera que las gotas en el borde circundante de la abertura de paso puedan colgar de una manera adherente.

De manera ventajosa, con la abertura de paso se amplía considerablemente la función de la superficie del soporte y, con ello, la aplicación de la invención. En la abertura de paso puede estar prevista una alimentación de gotas a la superficie del soporte, una fijación de al menos una gota, una irrigación de la gota con un dispositivo de perfusión, otra alimentación de gotas y/o una retirada de la gota de la superficie del soporte, pudiendo utilizarse de manera ventajosa utensilios de biología celular conocidos en sí mismos tales como, por ejemplo, un dispositivo de pipeta, un dispositivo de perfusión y/o un dispositivo de alimentación de gotas. La abertura de paso representa una interfaz para la unión de la manipulación de gotas en la superficie del soporte con otros pasos de procedimientos de biología celular.

Si, según otro modo de realización de la invención, está prevista una medición en la gota en la superficie del soporte, de manera ventajosa, puede controlarse el estado de la gota o, en particular, de una célula contenida en la gota. Se prefiere la medición de una gota dispuesta en la abertura de paso dado que, en este caso, puede aplicarse métodos convencionales de la observación óptica tales como, por ejemplo, una observación microscópica.

De manera alternativa, puede estar prevista una medición eléctrica, en particular, utilizando el dispositivo de electrodos en la superficie del soporte.

5 Ventajas importantes de la invención pueden resumirse de la siguiente manera. La gravitación arrastra células en suspensión en gotas a una superficie límite de la gota que está alejada de electrodos para la generación del campo eléctrico para la manipulación de gotas. Con ello, se reduce considerablemente la carga eléctrica en el campo electromagnético respecto a las técnicas convencionales. Se simplifica el cultivo de células en gotas colgantes. Con la disposición de las células en la superficie límite de la gota, se acorta de manera ventajosa, en comparación con la manipulación convencional de gotas, la longitud del recorrido entre las células y la atmósfera. Con ello, se obtiene una alimentación de gas mejorada a las propias células (por ejemplo, con oxígeno) o al entorno de las células en la gota (por ejemplo, con dióxido de carbono para el control del pH). Además, pueden introducirse líquidos de manera especialmente sencilla en una gota con células, por ejemplo, para compensar una evaporación. Por tanto, la invención es especialmente adecuada para un cultivo a largo plazo durante un periodo de tiempo de días o semanas. El goteo de las gotas inducido según la invención desde la superficie de soporte, por ejemplo, mediante el movimiento hacia un dispositivo de goteo o mediante la unión de gotas, permite un depósito sencillo y definido de gotas con o sin células. Finalmente, la invención permite una alimentación sencilla de medios o células u otros componentes en suspensión en gotas líquidas a una suspensión de células.

Otras particularidades y ventajas de la invención se describen a continuación haciendo referencia a los dibujos adjuntos. Muestran:

- | | | |
|----|-------------------------------------|---|
| 20 | las figs. 1A a 1C, | diferentes variantes de la manipulación según la invención de una gota que cuelga; |
| | la fig. 2, | una manipulación convencional de una gota apoyada en un lado inferior (estado de la técnica); |
| 25 | la fig. 3, | una ilustración esquemática de un modo de realización de un dispositivo de electrodos utilizado según la invención; y |
| | las figs. 4 a 11, 13 a 19, 24 y 25, | ilustraciones esquemáticas de diferentes modos de realización y aplicaciones de la invención; |
| | las figs. 12 y 20 a 23, | ilustraciones esquemáticas de diferentes dispositivos para la manipulación de gotas que no están realizados según la invención. |

30 En la descripción de las características y de las aplicaciones preferidas de la manipulación según la invención de gotas que cuelgan se hace referencia a representaciones esquemáticas de unos modos de realización del dispositivo para la manipulación de gotas utilizado según la invención, en particular, con la superficie del soporte y el dispositivo de electrodos. En este caso, se ilustra en particular la orientación de la superficie del soporte para la facilitación de las gotas que cuelgan. No se describen otras particularidades del dispositivo para la manipulación de gotas, en particular, en referencia al tamaño, la forma, la disposición y el control de electrodos dado que estas son conocidas en sí mismas de los procedimientos convencionales para el desplazamiento de gotas en superficies del sustrato.

35 A título de ejemplo, se hace referencia a gotas que contienen al menos una célula biológica en suspensión. No se describen particularidades del tratamiento bioquímico de células, por ejemplo, el cultivo o la diferenciación, en particular, de células madre o células precursoras no diferenciadas dado que el experto las conoce por sí mismas. De manera alternativa, en la gota pueden estar contenidas otras partículas en suspensión, por ejemplo, partículas de plástico que son soportes de sustancias, por ejemplo, de sustancias activas biológicas, o partículas compuestas de partículas de plástico y células biológicas.

40 La disposición según la invención de una gota 1 que cuelga en una superficie del soporte 21, orientada verticalmente hacia abajo u horizontalmente hacia un lado, de un soporte de gotas 20 se muestra, según la figura 1, a diferencia del soporte convencional de una gota 1' en la superficie de un sustrato 20' según la figura 2 (estado de la técnica). El soporte de gotas 20 forma parte de un aparato de cultivo para células biológicas, no mostrado. Presenta, por ejemplo, la forma de una placa plana o curva. En el soporte de gotas 20 está previsto un dispositivo de electrodos 30 que comprende unos electrodos 31 fijados en la superficie del soporte 21. Los electrodos 31 fijados están constituidos, por ejemplo, en forma de tiras, y están dispuestos de manera perpendicular al plano del dibujo.

50 Para representar la orientación de la superficie del soporte 21 utilizada según la invención se hace referencia al vector de la normal de la superficie (vector $\vec{n}$) y la dirección de la gravitación (vector $\vec{g}$). La dirección positiva de la

gravitación (dirección z negativa) se dirige verticalmente hacia abajo respecto al punto central de la Tierra. La superficie del soporte 21 puede ser totalmente plana o presentar una superficie curva o una superficie compuesta por subáreas planas con diferente inclinación. El vector de la normal de la superficie se dispone, en la posición considerada de la gota 1, perpendicular a la superficie del soporte 21. La superficie del soporte 21 utilizada según la invención presenta una orientación diferente de la del sustrato empleado de manera convencional, tal como se muestra haciendo referencia al ángulo α entre los vectores $\vec{n}$ y $\vec{g}$.

En las figuras 1A a 1C se muestran diferentes variantes de la invención en las que el ángulo α se elige en el intervalo entre 0° y 90° . En cualquier caso, las células 13 en suspensión se acumulan, bajo la acción de la gravitación, en un lado inferior de la gota 1. La parte de la gota 1 en la que se acumulan las células 13 se denomina zona de acumulación 11. La zona de la gota 1 en la que actúa el campo eléctrico del dispositivo de electrodos 30 se designa como zona de contacto 12. Según la figura 2, en el caso del sustrato que de manera convencional se dirige verticalmente hacia arriba, los vectores $\vec{n}$ y $\vec{g}$ están orientados enfrentados entre sí. El ángulo entre los dos vectores es de 180° . En este caso, la zona de acumulación 11' y la zona de contacto 12' son fundamentalmente iguales. De manera correspondiente, las células 13' están sometidas, en la zona de acumulación 11', a la acción del campo eléctrico.

A diferencia de la técnica convencional, en la técnica según la invención, según la figura 1, las zonas de acumulación y contacto 11, 12 están separadas la una de la otra. Se evita de manera ventajosa una acción del campo eléctrico sobre las células 13. El solapamiento, mostrado en el caso de la figura 1C, es, en realidad, poco crítico dado que la zona de acumulación 11 se encuentra fundamentalmente en la superficie límite inferior de la gota hacia la atmósfera circundante.

El dispositivo de electrodos 30 está constituido, en general, para generar un campo eléctrico variable localmente, bajo cuyo efecto se ejerce una fuerza sobre la gota 1 que cuelga. Para la generación del campo variable localmente, el dispositivo de electrodos 30 presenta, según una primera variante mostrada, una disposición de electrodos con una pluralidad de electrodos fijos 31 que pueden controlarse de manera individual (véanse las figuras 1 y 3 a 19). Los electrodos fijos 31 están dispuestos los unos junto a los otros en forma de tiras. Una dirección de referencia de manera perpendicular a la orientación de los electrodos 31 en forma de tira designa la dirección del movimiento de la gota 1 que cuelga. Según una segunda variante, el campo eléctrico variable localmente se genera mediante un electrodo móvil 32 (figuras 20 a 25). El electrodo móvil 32 es, por ejemplo, un elemento en forma de barra que está dispuesto en un lado (lado superior) de la superficie del soporte 21 de manera que puede desplazarse al menos una dirección espacial. De manera ventajosa, al utilizar el electrodo móvil 32 no es necesario que la superficie del soporte 21 esté dotada de electrodos integrados. No obstante, también son posibles modos de realización de la invención en los que para la manipulación de gotas estén previstos tanto los electrodos fijos 31 en o dentro de la superficie del soporte 21 como también los electrodos móviles 32.

La figura 3 muestra, a título de ejemplo, una vista en planta superior de un detalle de una superficie de contacto 21 con un dispositivo de electrodos 30 que comprende electrodos fijos 31 en forma de tira. En cada caso están dispuestos dos electrodos fijos 31 por parejas, en los cuales se aplica de manera selectiva, con un dispositivo de alimentación de tensión 36, mostrado de manera esquemática, una corriente alterna (por ejemplo, 1 MHz de frecuencia) con un desfase específico. Se constituye una onda progresiva, bajo cuya acción la gota 1, mostrada de manera esquemática, se desplaza (véase la flecha) de manera perpendicular a la orientación de los electrodos 31 en forma de tira.

La superficie del soporte 21 está fabricada, por ejemplo, de vidrio, sobre el cual están aplicados por desprendimiento de átomos por bombardeo iónico los electrodos fijos 31, por ejemplo, fabricados de oro. Los electrodos 31 presentan en sus extremos una ampliación (denominada 'pad' = almohadilla) en cada caso, en la cual está dispuesta preferiblemente la gota. El tamaño y la disposición de las ampliaciones se eligen, por ejemplo, de manera que una gota cubre al menos dos almohadillas, por ejemplo, cuatro incluso seis almohadillas.

Las figuras 4 a 11, 13 a 19, 24 y 25 ilustran modos de procedimiento preferidos que pueden implementarse con el dispositivo para la manipulación de gotas utilizado según la invención. Las variantes y los modos de realización mostrados pueden estar previstos de manera individual, repetida o en combinación con pasos parciales de un procedimiento de biología celular. Un objetivo de la biología celular es, por ejemplo, facilitar una interacción de diferentes tipos de células con objetivos de cultivo. Por ejemplo, un primer tipo de células comprende células madre o células precursoras no diferenciadas, mientras que el segundo tipo de células comprende células diferenciadas. Para inducir una diferenciación encauzada de las células madre o células precursoras, ambos tipos de células se ponen en contacto entre sí. La invención permite una unión precisa y reproducible de gotas con diferentes tipos de células, tal como se ilustra de una manera esquemática en las figuras 4 y 5.

Según la figura 4A, gotas 1, 4 con células 13 de diferentes tipos se disponen colgando en la superficie del soporte 21 con el dispositivo de electrodos 30. El dispositivo de electrodos 30 comprende, según la primera variante antes citada, una pluralidad de electrodos 31 rectos en forma de alambre que están dispuestos en la superficie de la

superficie del soporte 21. Los electrodos 31 en forma de tiras discurren perpendicularmente al plano del dibujo de la figura 4 y relativamente paralelos entre sí. Al solicitar los electrodos 31 en forma de tiras con campos eléctricos de alta frecuencia se generan ondas progresivas. Las ondas progresivas discurren perpendicularmente a la orientación de los electrodos 31 en forma de tiras.

Los electrodos 31 están conectados con un dispositivo de control (no mostrado), con el cual puede controlarse de manera selectiva cada uno de los electrodos 31. En el ejemplo mostrado, en dos subáreas de la superficie de soporte 21 se generan de manera independiente ondas progresivas con sentidos opuestos, bajo cuya acción las gotas 1, 4 se desplazan la una hacia la otra (figura 4A). Como resultado, se constituye una gota 2 compuesta (figura 4B) que, en la zona de acumulación 11, contiene células 13 de los dos tipos de célula. Para el transporte de la gota 2 compuesta, en el procedimiento adicional se une una gota 5 sin células con la gota 2 de manera que ésta, bajo la acción de su peso, se desprende de la superficie de soporte 21 (figura 4C) y cae en un alojamiento para gotas (no mostrado en la figura 4, véase la figura 11).

De manera ventajosa, durante todo el procedimiento, los tipos de célula se encuentran en las gotas 1, 4 separadas o la gota 2 compuesta, debido a la fuerza de gravitación dirigida hacia abajo, en la superficie límite inferior de la gota hacia la atmósfera circundante (zona de acumulación 11). Como resultado, las células 13 no se ven influidas por el campo eléctrico de los electrodos 31.

De manera opcional, está previsto el goteo a través de una ampliación de diámetro según las figuras 4B y 4C. De manera alternativa, un goteo a través de una modificación de las propiedades superficiales de la superficie del soporte 21 puede inducirse, por ejemplo, mediante un control modificado de los electrodos 31 (mediante electrohumectación) o un desplazamiento de la gota 2 compuesta a una subárea con adhesión reducida. Según otra alternativa, puede estar previsto un goteo desde un canto de goteo 23 tal como se ilustra de manera esquemática en la figura 5.

En el modo de realización de la invención mostrada en la figura 5, la superficie del soporte 21 comprende una primera subárea 21.1 plana cuya normal a la superficie se dirige perpendicularmente hacia abajo ($\alpha = 0^\circ$), y una segunda subárea 21.2 plana con una inclinación modificada relativamente a la dirección de gravitación. Las gotas 1, 4 con células 13 de diferentes tipos se desplazan, bajo la acción de ondas progresivas eléctricas, desde la primera subárea 21 a la subárea 21.2 inclinada (figura 5A). En la segunda subárea 21.2, las gotas discurren, bajo la acción de la gravitación o transportadas de manera activa mediante ondas progresivas, hasta el extremo de la subárea 21.2 que constituye el canto de goteo 23 (figura 5B). La fusión de las dos gotas 1, 4 puede tener lugar en el canto de goteo 23 o, de manera alternativa, tras el goteo en una reserva de captación (figura 5C).

El goteo en el canto de goteo 23 puede favorecerse mediante un revestimiento hidrófobo y/o una estructuración (por ejemplo, punta, gorrón) del canto de goteo 23. De una manera alternativa o adicional, puede desencadenarse un goteo mediante una ampliación de la gota compuesta con una gota adicional 5 más allá de una dimensión de goteo crítica.

Las figuras 6A a 6D muestran otras variantes de la manipulación de gotas según la invención. Según la figura 6A, una primera gota 1 con células 13 se desplaza hacia una segunda gota 4 en reposo sin células. La gota 4 contiene, por ejemplo, una sustancia activa tal como una solución de sustancia alimenticia para la alimentación a las células 13, o un factor de diferenciación para la activación de una diferenciación de las células 13. Las gotas de cultivo 7 constituidas a partir de las gotas 1 a 4 (figura 6B) pueden mantenerse en el estado colgante, por ejemplo, para la diferenciación de células, durante un tiempo de cultivo predeterminado, por ejemplo, horas, días o semanas. Durante el cultivo, puede desactivarse el campo eléctrico. Durante el cultivo, las células 13 pueden, por ejemplo, crecer, multiplicarse, diferenciarse, crear agregados y/o generar formaciones de tejido en la gota 2, tal como es conocido del cultivo convencional en gotas colgantes.

Durante el cultivo puede producirse la pérdida de líquido por evaporación (véase la flecha de la figura 6B). La evaporación representa un problema fundamental, en el caso del cultivo convencional, en particular, en pequeñas gotas (por ejemplo, diámetro inferior a 0,5 mm), dado que hasta el momento era difícil de realizar una compensación precisa de la pérdida de líquido. Con el procedimiento según la invención puede compensarse fácilmente la pérdida de líquido (figura 6C) y, en particular, puede prolongarse un cultivo alimentando a la gota de cultivo 7 una gota 2 adicional con agua y/o solución de sustancia alimenticia y/u otra gota 3 con una sustancia activa y/o células.

Como resultado, la gota de cultivo 7 puede mantenerse en el estado colgante durante el tiempo de cultivo deseado (figura 6D), por ejemplo, hasta que todas las células 13 estén diferenciadas. A continuación, puede estar previsto, por ejemplo, el goteo antes indicado en una reserva de captación (no mostrada).

La figura 7 muestra otro modo de realización de la manipulación de gotas según la invención en el que una unión de varias gotas comprende una adición mutua sin una mezcla. Por ejemplo, según la figura 7A, una gota 1 colgante con células 13 en suspensión se dispone en la superficie del soporte 21. Las células 13 comprenden, por ejemplo, células madre y células diferenciadas. Con el procedimiento según la invención, se desplaza al menos una gota

4, 5 adicional hacia la gota 1 y se dispone en contacto con esta. Se impide una mezcla de las gotas al estar constituidas las gotas, por ejemplo, de líquidos no miscibles (agua / aceite) o recubriendo la superficie de la gota 1 con una película que impide la mezcla. La película está fabricada, por ejemplo, de lípidos.

En la figura 7B se muestra, a título de ejemplo, la adición de las dos gotas 4, 5 adicionales a distintos lados de la gota 1 con las células 13. Las gotas 4, 5 contienen una sustancia activa con diferentes concentraciones o diferentes sustancias activas. Mediante la difusión de la(s) sustancia(s) activa(s), puede crearse un gradiente de sustancia activa en la gota 1 tal como se desea para cultivos in vitro o las técnicas de ingeniería de tejidos. Además, entre las gotas parciales adicionadas que no se mezclan se constituyen superficies límite curvas que pueden favorecer el cultivo de las células y, en particular, la generación de formaciones de tejido.

La superficie de soporte 21 del dispositivo para la manipulación de gotas utilizado según la invención puede estar dotada de una estructura escalonada 24 que se ilustra de una manera esquemática en la figura 8. La estructura escalonada 24 comprende, por ejemplo, un saliente cónico o un elemento de unión con una sección transversal en forma de trapecio. La estructura escalonada 24 sirve, por ejemplo, para el soporte de una gota de cultivo 7 con gotas de sustancia 5, 6 adicionadas.

La formación de la composición a partir de las gotas 5, 6 y 7 comprende un primer paso parcial (figura 8A) en el que, desde dos lados diferentes, dos gotas de muestra 1, 2 que contienen células 13, por ejemplo, células madre o células diferenciadas, se desplazan hacia la estructura escalonada 24. Adicionalmente, desde los dos lados se añaden las gotas con sustancia activa 5, 6 a las gotas de muestra 1, 2. Antes del comienzo de la diferenciación (figura 8B), las gotas de muestra 1, 2 con los distintos tipos de células están separadas la una de la otra de manera que la diferenciación todavía no puede tener lugar y tampoco puede constituirse un gradiente entre las gotas con sustancia activa 5, 6. En otro paso parcial (figura 8C) se deslizan juntas las gotas parciales para crear la gota de cultivo 7 compuesta, en cuyos lados enfrentados se añaden las gotas con sustancia activa 5, 6. Las gotas con sustancia activa 5, 6 están separadas la una de la otra por la estructura escalonada 24 y no pueden mezclarse con la gota de cultivo 7 (véase más arriba).

El cultivo en la estructura escalonada 7 presenta la ventaja de que la superficie de la superficie del soporte 21, en la que la gota de cultivo 7 se mantiene colgando por fuerzas de adhesión, se amplía por la estructura escalonada 24. Como resultado, la gota de cultivo 7 puede constituirse hasta convertirse en una gota de mayor diámetro y mantenerse en la superficie del soporte 21 como en el caso de una superficie plana sin estructura escalonada. Con la estructura escalonada 24 puede ampliarse la dimensión de goteo crítica, por encima de la cual se produce un goteo. En la gota de cultivo 7 ampliada pueden cultivarse mayores formaciones de tejido.

La estructura escalonada 24 cónica se muestra, a título de ejemplo, en la figura 8. En el marco de la invención pueden estar previstas numerosas estructuras escalonadas con esta forma o una forma diferente, las cuales sobresalen del plano de la superficie de soporte 21 o constituyen una escotadura en esta. Con la estructura escalonada se amplía la superficie de adhesión de la gota de cultivo 7. Además, se fijan condiciones geométricas para la adición de gotas con sustancia activa si ello es de interés, en particular, en el caso del cultivo de células madre o la clonación de células.

El tamaño y la forma de la estructura escalonada 24 puede elegirlos el experto en función de los requisitos concretos en la aplicación de la invención. La profundidad o altura perpendicular de la estructura escalonada 24 en relación con el plano de la superficie del soporte 21 puede elegirse, por ejemplo, en el intervalo de 50 µm a 10 mm, en particular, de 100 µm a 5 mm.

Según otra variante de la invención, la superficie del soporte 21 puede estar dotada de al menos una subárea 25 libre de campos que se muestra de una manera esquemática en la figura 9. La subárea 25 libre de campos representa una zona plana, por ejemplo, en forma de capa, de la superficie del soporte 21 en la que, preferiblemente, no está dispuesto ningún electrodo. La subárea 25 sin campos constituye un elemento de separación, a ambos lados del cual pueden deslizarse las gotas 1, 2 (figura 9A). La anchura lateral de la subárea 25 sin campos se elige preferiblemente de manera que, en el estado desplazado, las gotas 1, 2 pueden fusionarse para constituir una gota de cultivo 7 compuesta (figura 9B). A continuación, tiene lugar la alimentación de otra sustancia activa y/o células con las gotas 5, 6, las cuales también se aproximan desde los lados enfrentados a la subárea 25 sin campo hasta que se fusionan con la gota de cultivo 7 (figura 9C). Finalmente, tras un tiempo de cultivo predeterminado, la gota de cultivo 7 puede ampliarse mediante alimentación de líquido con sub-gotas, de manera que supera la dimensión de goteo crítica y cae a una reserva de captación (no mostrada) (figura 9D).

La subárea 25 sin campos presenta la ventaja especial de que, con un revestimiento de la superficie, puede proporcionarse un flujo a lo ancho de la gota de cultivo 7. Está previsto, por ejemplo, un revestimiento hidrófilo que provoca una distribución de la gota de cultivo 7 en toda la superficie de la subárea sin campo. Con la carga de la subárea 25 sin campo desde uno o varios lados, pueden unirse de manera controlada y/o cultivarse poblaciones de células previamente cultivadas. Las aplicaciones preferidas de la técnica ilustrada en la figura 9 consisten en el modelado de agregados de células tales como, por ejemplo, de cuerpos embrioides u organoides durante la diferenciación de células madre embrionarias o adultas.

Para el control de al menos una gota que, según la invención, se mantiene en estado colgante en la superficie del soporte 21 y se manipula, según otra variante de la invención, puede estar prevista una medición tal como, por ejemplo, una medición óptica y/o eléctrica. Por ejemplo, en la gota de cultivo 7 puede estar prevista una medición de fluorescencia con un microscopio dispuesto por debajo de la superficie del soporte 21 o una medición de impedancia eléctrica, para la cual se utilizan preferiblemente los electrodos 31 del dispositivo de electrodos en la superficie del soporte 21.

La medición en la gota puede simplificarse si en la superficie del soporte 21 está prevista una abertura de paso 27 (véase la figura 10). La abertura de paso 27 es, por ejemplo, un orificio redondo o una hendidura en el cuerpo que constituye la superficie del soporte 21. El diámetro interior de la abertura de paso 27 se elige en función de la aplicación concreta y de los materiales empleados de manera que la gota 3 compuesta pueda mantenerse de manera segura en la abertura de paso 27.

La abertura de paso 27 está prevista, por ejemplo, para la fijación de una gota 3 compuesta constituida por dos sub-gotas 1, 2 y para la observación microscópica y/o la medición de la gota 3 compuesta. En un primer paso parcial del procedimiento según la invención (figura 10A), se desplazan las sub-gotas 1, 2 desde dos lados hacia la abertura de paso 27. Según la figura 10B, en el lado superior de la superficie del soporte 21 se dispone un dispositivo de medición 80, por ejemplo, un microscopio óptico, con el cual puede observarse la gota 3 compuesta en la abertura de paso 27. Otra función de la abertura de paso 27 puede consistir en facilitar la alimentación o la retirada de células desde la gota 3 compuesta con un instrumento adicional 40 tal como, por ejemplo, un capilar (véanse también las figuras 15 y siguientes).

La figura 11 ilustra otras particularidades del cultivo de células 13 en una gota de cultivo 7 que cuelga en una subárea 25 sin campos de la superficie del soporte 21 (véase también la figura 9). El dispositivo para la manipulación de gotas utilizado según la invención puede estar dotado de un dispositivo de cultivo 70, mostrado de manera esquemática, con el cual pueden ajustarse las condiciones de cultivo para el cultivo de las células 13. El dispositivo de cultivo 70 comprende, por ejemplo, un dispositivo de atemperación para el ajuste de una temperatura de cultivo predeterminada, un dispositivo de humectación para proporcionar una humedad ambiental predeterminada y/o un dispositivo de alimentación de gas para constituir una atmósfera de gas, por ejemplo, una atmósfera de CO₂, alrededor de la gota de cultivo 7. Dependiendo de la función concreta del dispositivo de cultivo 70, este puede estar unido con la superficie del soporte 21 o estar dispuesto por debajo de la superficie del soporte 21.

La figura 11 muestra además una reserva de captación 50 que está constituida para el alojamiento de gotas de líquido por la superficie del soporte 21. La reserva de captación 50 comprende, por ejemplo, un sustrato con una pluralidad de compartimentos 51 (por ejemplo, una placa de microtitulación o una placa de nanotitulación), estando previsto cada uno de los compartimentos para el alojamiento de una o varias gotas de cultivo.

Para depositar gotas por goteo desde la superficie del soporte 21, la reserva de captación 50 se dispone, con un dispositivo de posicionamiento (no mostrado), debajo de la superficie del soporte 21, en particular, en una posición de goteo, de manera que la gota de cultivo 7 cae en un compartimento 51 predeterminado.

De manera ventajosa, mediante un desplazamiento de la reserva de captación 50 con el compartimento 51, pueden depositarse de manera rápida y automatizada gotas que contienen en cada caso una célula individual o un grupo de células 13 tal como es deseable para objetivos en la clonación o la inducción de crecimiento de tejido.

La figura 12 muestra una manipulación de gotas en la que el dispositivo para la manipulación de gotas está dotado de un elemento de fondo 60 que presenta una superficie de fondo 61. La superficie de fondo 61 es un componente con una superficie sólida que está prevista para soportar la gota 1 que cuelga de la superficie del soporte 21 y/o para el alojamiento de otra gota 6. En la superficie de fondo 61 pueden estar previstos electrodos 62, cuya función puede elegirse en función de la aplicación concreta del dispositivo. En primer lugar, pueden estar previstos al menos dos unos electrodos de la superficie de fondo 61 para una medición eléctrica, por ejemplo, una medición de impedancia de las células 13 en la gota 1. Además, pueden estar instalados electrodos 62 en la posición de la gota 1 para una manipulación cuidadosa de las células mediante dielectroforesis negativa.

Finalmente, los electrodos 62 también pueden utilizarse para apoyar el transporte de gotas tal como se ha descrito anteriormente en relación con la manipulación de gotas según la invención en la superficie del soporte 21. Por ejemplo, la gota 6 puede desplazarse en la superficie de fondo 61, bajo la acción de ondas progresivas, hacia la gota 1. Por tanto, también puede estar previsto que la gota 1 con al menos una célula 13 se desplace mediante campos eléctricos que se generan tanto en los electrodos 31 de la superficie del soporte 21 como también en los electrodos 62 de la superficie de fondo 61. Para el transporte de gotas son necesarias intensidades de campo menores que en comparación con el transporte convencional de gotas con campos eléctricos de alta frecuencia, de manera que puede evitarse una influencia negativa de la al menos una célula 13 por campos en la proximidad de la superficie de fondo 61.

La separación de las superficies del soporte y del fondo 21, 61 puede elegirse en función del procedimiento de manipulación de gotas que se lleva a cabo en concreto. Preferiblemente, la separación se elige (por ejemplo, en el

intervalo de 50 μm a 5 mm) de manera que sólo la gota 1 ampliada mediante alimentación de líquido se apoya por medio de la superficie del fondo 61, mientras que las gotas 2, 5 y 6 están separadas las unas de las otras para la alimentación de células y/o sustancia activa. De manera alternativa, la separación puede elegirse menor, de manera que todas las gotas estén en contacto simultáneamente con las superficies del soporte y del fondo 21, 61.

5 La combinación de las superficies del soporte y del fondo 21, 61 ofrece la ventaja de una carga sencilla de la superficie del soporte 21 para el alojamiento de gotas colgantes con un aparato convencional para el desplazamiento de gotas con campos eléctricos de alta frecuencia. Por ejemplo, la superficie del fondo 61 puede estar dispuesta relativamente desplazada respecto a la superficie del soporte 21 (no mostrado) para depositar gotas con una pipeta en una primera subárea de la superficie del fondo 61 y, bajo la acción de campos eléctricos de alta frecuencia, desplazarlas hacia la superficie del soporte 21, donde las gotas pasan al estado colgante y se someten a la manipulación adicional. Otra ventaja consiste en que, con la combinación de las superficies del soporte y del fondo 21, 61, puede constituirse un sistema cerrado y, con ello, puede garantizarse más fácilmente la esterilidad del dispositivo para la manipulación de gotas.

10 La figura 13 ilustra otro modo de realización de la invención en el que la superficie del soporte 21 presenta al menos una subárea 26 vertical. Puede estar prevista, por ejemplo, una superficie del soporte 21 acodada (véase también la figura 1C), en la que, en la subárea 26 vertical, la normal de la superficie constituye un ángulo $\alpha = 90^\circ$ con la dirección de gravitación. Una subárea 26 vertical individual puede ser ventajosa, por ejemplo, para una medición en la gota que cuelga.

15 Sin embargo, la combinación de dos subáreas 26 verticales (figura 13A) que constituyen un intersticio ofrece ventajas especiales. La separación perpendicular de las subáreas 26 se elige de manera que al menos una gota 9 puede crear un puente de líquido entre las subáreas 26 verticales (figura 13B).

20 Para la manipulación de gotas según la invención pueden desplazarse, por ejemplo, gotas con células 13 de diferentes tipos de célula desde lados opuestos hacia el intersticio entre las subáreas 26 verticales. En este estado, los distintos tipos de células están separados entre sí. Gracias al desplazamiento de las gotas en el intersticio entre las subáreas 26 verticales, tiene lugar una adición mutua con una mezcla, seguida de una interacción entre los distintos tipos de células.

25 La separación de las subáreas 26 verticales se elige, por ejemplo, en el intervalo de 50 μm a 5 mm. De manera ventajosa, con el modo de realización de la invención mostrado en la figura 13, pueden manipularse gotas que son mayores que las gotas que cuelgan libremente. Se obtienen ventajas, en particular, para el cultivo de células, por ejemplo, de células animales o vegetales mayores.

30 La materialización de la invención no se limita a la utilización de superficies del soporte 21 que son totalmente planas o son planas en subáreas. De manera alternativa, puede estar prevista una superficie del soporte 21 curva (figura 14). El ejemplo ilustrado se caracteriza por presentar un radio de curvatura de la superficie del soporte 21 que se reduce desde el centro hacia el borde de la superficie del soporte 21. Dado que la dimensión de goteo crítica depende, en particular, del radio de curvatura de la superficie del soporte 21, de manera ventajosa, con una superficie del soporte 21 con diferentes radios de curvatura pueden fijarse posiciones de goteo predeterminadas para gotas 1 de diferente tamaño.

35 Otra variante de la carga de la superficie del soporte 21 de un dispositivo para la manipulación de gotas utilizado según la invención se ilustra en la figura 15. En este modo de realización, la carga tiene lugar en una abertura de paso 27 en la superficie del soporte 21. Según la figura 15A, pueden depositarse gotas con puntas de pipeta 41 en el borde de la abertura de paso 27. Debido a las fuerzas capilares, las gotas se arrastran al lado inferior de la superficie del soporte 21 y allí se manipulan adicionalmente en el estado colgante (figura 15B).

40 Una abertura de paso 27 en la superficie del soporte 21 puede utilizarse, de manera adicional o alternativa, al alojamiento de gotas de la superficie del soporte 21, tal como se ilustra en las figuras 15 y 16. Según la figura 16, un dispositivo de pipeta 41 (mostrado parcialmente) está fijado en la abertura de paso 27. Un capilar o una manguera del dispositivo de pipeta 41 finaliza en o dentro de la abertura de paso 27. Para el alojamiento de una gota 1 por la superficie del soporte 21 ésta se desplaza hacia la abertura de paso 27 (figura 16A). Entre los bordes de la abertura de paso 27 y el extremo del dispositivo de pipeta 41 se crea un puente de líquido (figura 16B). Mediante la aplicación de vacío al dispositivo de pipeta 41, puede succionarse la gota (figura 16C).

45 Para la alimentación de una gota a la superficie del soporte 21 pueden realizarse a la inversa los pasos parciales mostrados. Una gota se cuelga, con el dispositivo de pipeta 41, en la abertura de paso 27 y, mediante el control de los electrodos de la superficie del soporte 21 sobre esta, se transfiere al estado colgante.

50 Ventajas para una mayor flexibilidad en la alimentación o el alojamiento de gotas a o por la superficie del soporte 21 se obtienen si se utiliza un dispositivo de pipeta 41 móvil (figura 17). En este caso, el dispositivo de pipeta 41 no está fijado en la superficie del soporte 21 sino que puede desplazarse libremente en al menos una dirección espacial. En una superficie del soporte 21 pueden estar previstas varias aberturas de paso 27. Para el alojamiento de gotas se

desplaza una gota 1 a una abertura de paso 27 libre (figura 17A). El dispositivo de pipeta 41 también se desplaza hacia esta abertura de paso 27 (figura 17B). A continuación, se succiona la gota 1 con el dispositivo de pipeta 41 (figura 17C) y, por ejemplo, se transfiere a una reserva de captación. Para la alimentación de la gota a la superficie del soporte 21 pueden realizarse estas etapas parciales de manera correspondiente en sentido inverso.

5 La presión para el transporte de la gota en el dispositivo de pipeta 41 puede generarse mediante un medio gaseoso (figuras 16, 17) o mediante un medio líquido. En el primer caso, la gota permanece en el dispositivo de pipeta 41, de manera ventajosa, aislada de otras gotas. En el segundo caso, el medio líquido puede utilizarse para la separación de gotas contiguas o para el tratamiento de las células contenidas en la gota. El tratamiento puede comprender, en particular, una irrigación o perfusión de las células. La perfusión puede estar prevista durante la
10 alimentación o el alojamiento de la gota por la superficie del soporte 21 o en un estado en el cual la gota se mantiene colgando en la abertura de paso 27.

La figura 18 muestra, a título de ejemplo, un dispositivo de perfusión 42 que se utiliza para la perfusión de células 13 en la gota 1. El dispositivo de perfusión 42 comprende dos capilares 42.1, 42.2 dispuestos de manera coaxial que están fijados en la abertura de paso 27.

15 Para la perfusión, en un primer paso parcial (figura 18A), se desplaza la gota 1 hacia la abertura de paso 27 y se sujeta colgando en ésta. A continuación, la gota 1 se succiona en el capilar 42.1 interior (figura 18B). En otra etapa parcial (figura 18C), se alimenta un líquido de perfusión a través del capilar 42.2 exterior y se succiona en el capilar 42.1 interior. En este caso, la gota 1 se mezcla con el líquido de perfusión de manera que las células 13 se irrigan con el líquido de perfusión.

20 De manera alternativa, en caso de utilizar un líquido de transporte que no puede mezclarse con la gota 1, el dispositivo de perfusión 42 puede utilizarse para el alojamiento de una serie de gotas que están separadas entre sí por el líquido de transporte.

Según un modo de realización diferente de la invención, puede estar previsto un dispositivo de perfusión 41 que puede desplazarse relativamente respecto a la superficie de soporte 21. En la figura 19 se muestran las etapas parciales
25 de una perfusión o un alojamiento de gotas con un dispositivo de perfusión 41 móvil de manera análoga a la figura 18.

La figura 20 ilustra un dispositivo para la manipulación de las gotas en el cual el dispositivo de electrodos 30 se constituye, según las dos variantes antes citadas, mediante un electrodo móvil 32 en forma de varilla o punta. En el ejemplo ilustrado, el soporte de gotas 20 comprende un cuerpo sólido fabricado de un material inerte, por ejemplo, plástico, cuya superficie del soporte 21 dirigida hacia abajo está prevista para el alojamiento de la gota 1 que cuelga. El
30 soporte de gotas 20 presenta un grosor que permite una penetración del campo eléctrico desde el electrodo móvil 32 a la gota 1. El grosor se elige preferiblemente en el intervalo inferior a 1 mm. De manera ventajosa, pueden estar colgadas gotas 1 individuales o varias gotas incluso en una lámina que constituye el soporte de las gotas 20.

El electrodo móvil 32 está conectado con un dispositivo de alimentación de tensión (no mostrado) y un dispositivo de ajuste (simbolizado por el sistema de coordenadas) y puede desplazarse en el lado superior del soporte de las gotas 20. La movilidad se proporciona, al menos en una dirección en el plano X-Y, de manera correspondiente a la orientación de la superficie del soporte 21, preferiblemente, en dos direcciones en el plano X-Y, y, de manera especialmente preferida, en las tres direcciones espaciales. Para la manipulación de la gota 1 se solicita el electrodo móvil 32 con una tensión que se elige en el intervalo de 20 V a 500 V. Durante el movimiento del electrodo móvil 32 el plano X-Y, la gota 1 colgante se mueve conjuntamente en el lado inferior de la superficie del soporte 21.
35

40 La figura 20 ilustra además que la gota 1 se apoya en su lado inferior por una superficie de fondo 61 (véase la figura 12). En la superficie de fondo 61 está previsto un electrodo de superficie 62 con el cual puede influirse en la forma del campo eléctrico que actúa sobre la gota 1. De manera alternativa, puede estar prevista una pluralidad de electrodos (tal como se muestra en la figura 12).

45 La facilitación de la superficie de fondo 61 con o sin electrodo 62 no es forzosamente necesaria en caso de utilizar el electrodo móvil 32 para la manipulación de gotas. Más bien, la gota 1 puede colgar libremente en la superficie del soporte 21 (véase la figura 25).

Para la manipulación de varias gotas, por ejemplo, para la fusión de gotas de manera correspondiente al procedimiento antes explicado, el dispositivo de electrodos 30 puede presentar dos o más electrodos móviles 32 que pueden desplazarse de manera individual y controlarse eléctricamente de modo independiente. Un ejemplo con dos electrodos móviles 32 se muestra de manera esquemática en la figura 21. Con los electrodos móviles 32 se desplazan, por ejemplo, la gota 1 con células 13 y las gotas con sustancia activa 6 con una solución de sustancia alimenticia la una hacia la otra para constituir una gota compuesta.
50

El dispositivo para la manipulación de gotas con un electrodo móvil puede utilizarse, de manera ventajosa, para realizar las etapas de manipulación con pipeta y/o perfusión antes explicados, tal como se muestra de una manera

esquemática en las figuras 22 y 23. Según la figura 22, el electrodo móvil comprende un electrodo hueco 33 con la forma de un elemento de alojamiento (aguja de inyección, cánula, manguera o capilar) de un dispositivo de pipeta. El electrodo hueco está fabricado de un material eléctricamente conductor, por ejemplo, de un plástico eléctricamente conductor, un metal o un metal revestido de plástico. El electrodo hueco 33 puede utilizarse, en primeros pasos parciales (figura 22A, B), para desplazar la gota 1 en la superficie del soporte 21 hacia una abertura de paso 27. En la abertura de paso 27, la gota 1 constituye un puente de líquido entre los bordes de la abertura de paso 27 y el extremo inferior del electrodo hueco 33 (figura 22C). Al solicitar el electrodo hueco 33 con un vacío, puede succionarse la gota 1 (figura 22D). La alimentación de una gota a la superficie de soporte 21 puede estar prevista con estas etapas parciales en orden inverso.

Las figuras 23A a 23C muestran las etapas parciales del movimiento de la gota 1 hacia la abertura de paso 27, la succión de la gota 1 en el electrodo hueco 33 y la perfusión de la gota (véase anteriormente la figura 18). En este caso, el electrodo hueco 33 comprende una estructura coaxial, de la cual al menos uno de entre el capilar interior y el capilar exterior está fabricado de un material eléctricamente conductor.

Las figuras 24 y 25 muestran otro modo de realización del dispositivo para la manipulación de gotas utilizado según la invención en el cual el dispositivo de electrodos comprende un electrodo móvil 32 por la superficie del soporte 21 y un electrodo contrapuesto 34 por debajo de la superficie del soporte 21 y por debajo de la gota 1 que cuelga. Con el electrodo contrapuesto 34 puede influirse de manera ventajosa en la forma del campo del electrodo móvil 32, con ello, en la eficacia del movimiento de la gota 1 en la superficie del soporte 21. En ambos casos, el electrodo móvil 32 y el electrodo contrapuesto 34 pueden moverse conjuntamente. El movimiento puede realizarse mediante el dispositivo de ajuste del electrodo móvil 32. Para ello, el electrodo contrapuesto 34 está unido mecánicamente con el electrodo móvil 32 gracias a una unión por cable 35 que rodea a la superficie del soporte 21.

La figura 25 muestra la combinación de un electrodo hueco 33 móvil con un electrodo contrapuesto 34, estando previsto adicionalmente, como parte de un dispositivo de medición, un conductor de luz 71 en forma de tubo para la iluminación de la superficie del soporte 21. Con la iluminación pueden conectarse superficies funcionales 72 ópticamente sensibles a la superficie del soporte 21 y/o facilitarse una medición óptica en la gota 1. Además, la combinación del electrodo hueco 33 y el conductor de luz 71 tubular puede utilizarse para las funciones antes indicadas de la alimentación de la gota, el alojamiento de la gota o la perfusión de la gota.

La superficie funcional 72 ópticamente sensible está constituida preferiblemente en forma de capa y círculo. Está fabricada, por ejemplo, a partir de una unión química que puede conmutarse, mediante la irradiación o el sombreado, entre un estado hidrófilo y un estado hidrófobo, por ejemplo, ditiéniletileno o naranja de metilo.

Para la manipulación de una pluralidad de gotas, el soporte de gotas 20 puede presentar una pluralidad de aberturas de paso 27 que se muestran en la vista en planta superior esquemática de la figura 26A. A través de las aberturas de paso 27, la superficie del soporte 21 puede alojar gotas o alimentarse a esta tal como se muestra, a título de ejemplo, en las figuras 26B a 26D.

De manera alternativa a la alimentación o el alojamiento de gotas con un dispositivo de pipeta 41 (figura 26B), la alimentación de gotas puede realizarse mediante un dispositivo de alimentación de gotas 90 (figuras 26C, 26D). Para ello, en la abertura de paso 27 se sujeta una gota 1 mediante el procedimiento antes descrito. El dispositivo de alimentación de gotas 90 comprende, por ejemplo, un dispensador de gotas móvil con el que se alimentan sustancias activas y/o células a la gota 1 que cuelga. La figura 26C ilustra la utilización del dispositivo de alimentación de gotas 50 para el aumento de la gota por encima de la dimensión de goteo de manera que pueda depositarse en un compartimento 51 de la reserva de captación 50.

5

- 10

15

- 20

- 25

- 30

- 35

- 40

- 13

8. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, en el cual está previsto, en una abertura de paso (27) a través de la superficie del soporte (21), al menos una de las siguientes etapas:
 - alimentación de la al menos una gota (1, 2) a la superficie del soporte (21),
 - fijación de la al menos una gota (1, 2),
 - 5 - alojamiento de la al menos una gota (1) por la superficie del soporte (21),
 - perfusión de la al menos una gota (1), y
 - carga de la al menos una gota (1).
9. Procedimiento según la reivindicación 8, el cual comprende la siguiente etapa:
 - goteo de la al menos una gota (1) desde la superficie del soporte (21).
10. Procedimiento según al menos una de las reivindicaciones anteriores, el cual comprende la siguiente etapa:
 - medición de al menos una propiedad física y/o química de la al menos una gota (1, 2, 3, ...).
11. Aparato de cultivo para células biológicas que comprende:
 - 15 - un dispositivo para la manipulación de las gotas (100) que comprende un soporte de gotas (20) con una superficie del soporte (21) sólida que está constituida para la disposición adhesiva de al menos una gota (1, 2, 3, ...), y un dispositivo de electrodos (30) para la generación de un campo eléctrico en la superficie del soporte (21) de tal manera que pueda ejercerse una fuerza sobre la al menos una gota para el desplazamiento de la al menos una gota a lo largo de la superficie del soporte, y
 - 20 - un dispositivo de cultivo (70) previsto para el ajuste de determinadas condiciones de cultivo en la superficie del soporte (21),

caracterizado porque
 - la superficie del soporte (21) está prevista para el alojamiento de al menos una gota que cuelga, y
 - la superficie del soporte (21) está orientada en el aparato de cultivo de tal manera que una normal de la superficie del soporte (21) constituye con la dirección de gravitación vertical un ángulo α inferior o igual a 90°.
12. Aparato de cultivo según la reivindicación 11, en el cual el dispositivo de electrodos (30) del dispositivo para la manipulación de las gotas (100) comprende:
 - 30 - una pluralidad de electrodos fijos (31) que están dispuestos en la superficie del soporte (21) o integrados en ésta, y/o
 - al menos un electrodo móvil (32, 33) que está dispuesto de manera móvil en el lado trasero (28) de la superficie del soporte (21).
13. Aparato de cultivo según la reivindicación 11 ó 12, en el cual la superficie de soporte (21) del dispositivo para la manipulación de las gotas (100) comprende:
 - 35 - una pluralidad de subáreas (21.1, 21.2) que están inclinadas con diferente intensidad en relación con la dirección de gravitación vertical,
 - al menos una subárea (25) libre de campos sin electrodos (31),
 - al menos dos subáreas (26) verticales, entre las cuales la al menos una gota (1, 2, 3, ...) puede crear un puente (9),
 - 40 - al menos un dispositivo de goteo (23, 25) previsto para el goteo de la al menos una gota (1, 2, 3, ...),
 - al menos una estructura escalonada (24) prevista para la fijación de la al menos una gota (1, 2, 3, ...), y/o
 - al menos una abertura de paso (27) a través de la superficie del soporte (21) que está prevista

para la alimentación, el alojamiento, la fijación, la perfusión y/o la carga de la al menos una gota (1).

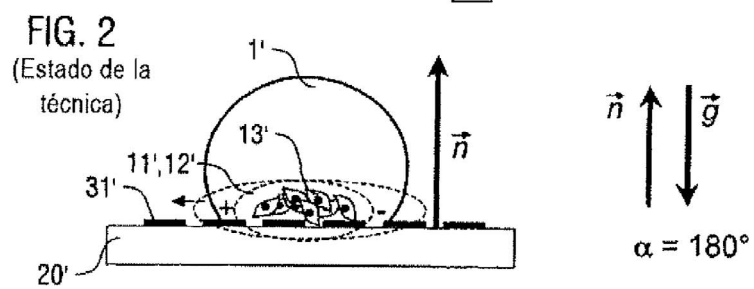
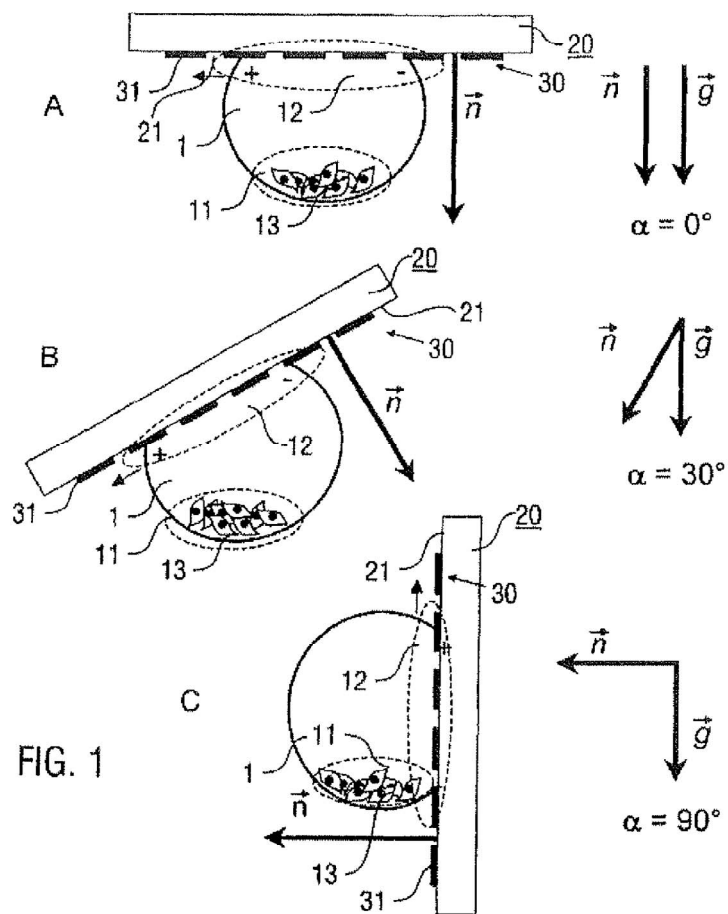
14. Aparato de cultivo según al menos una de las reivindicaciones 11 a 13, en el cual el dispositivo para la manipulación de gotas comprende :

5

- un dispositivo de pipeta (41),
- un dispositivo de perfusión (42),
- un dispositivo de alimentación de las gotas (43), y/o
- un dispositivo de medición (80).

10

15. Utilización de un procedimiento o un aparato de cultivo según al menos una de las reivindicaciones anteriores para el cultivo y/o la diferenciación de células biológicas, en particular, de células madre o de células precursoras.



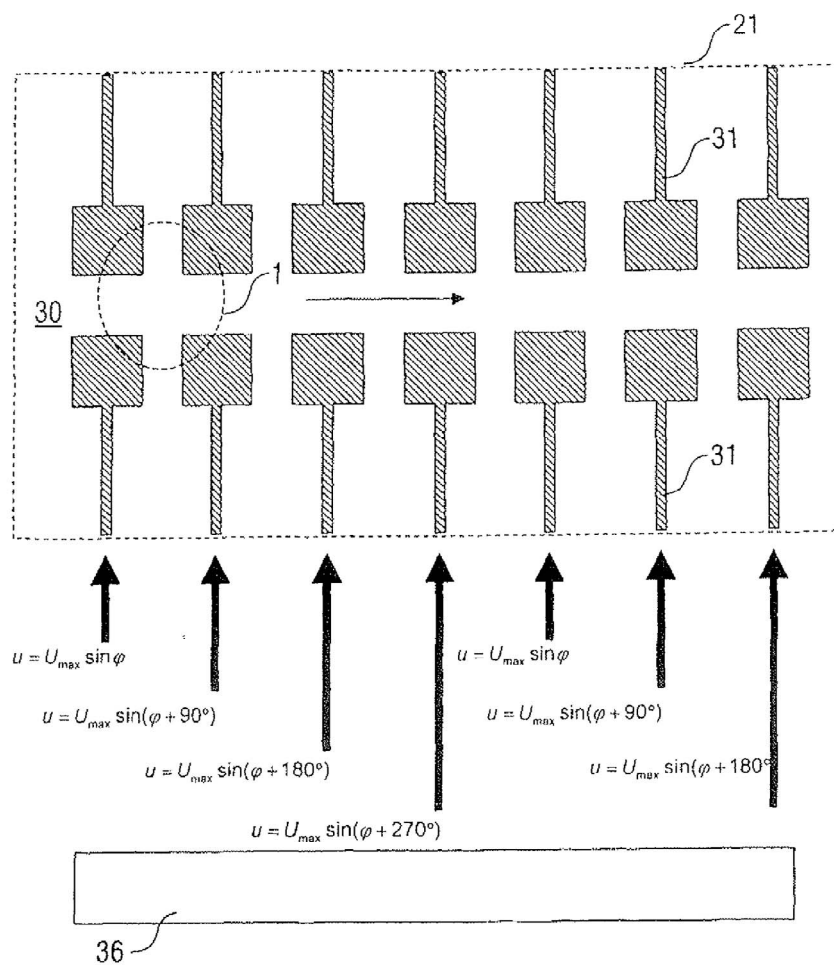
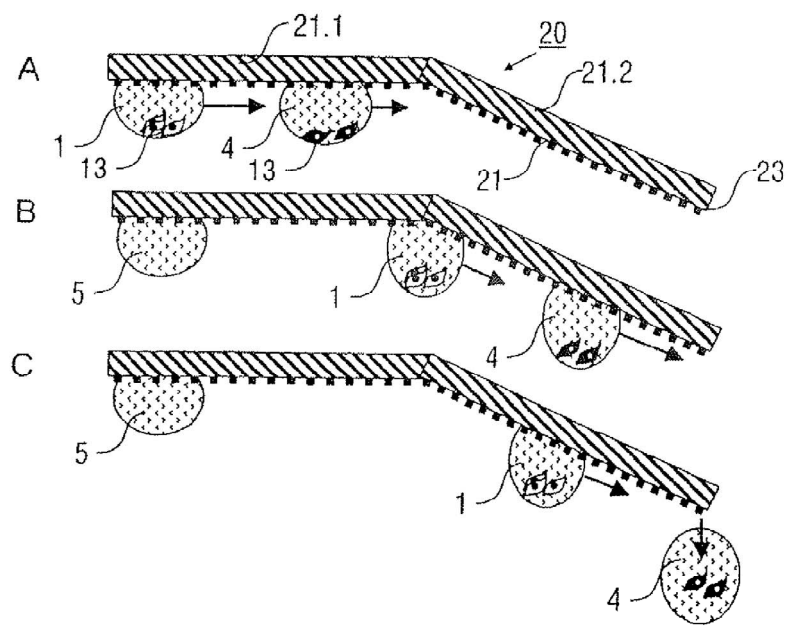
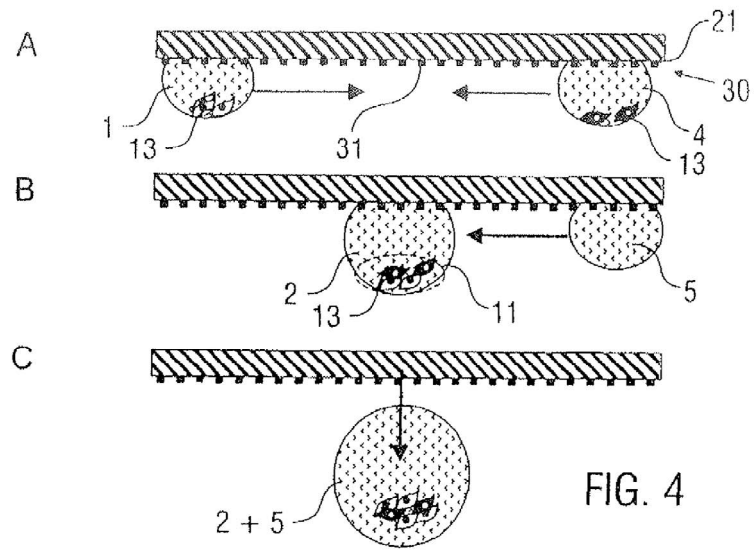


FIG. 3



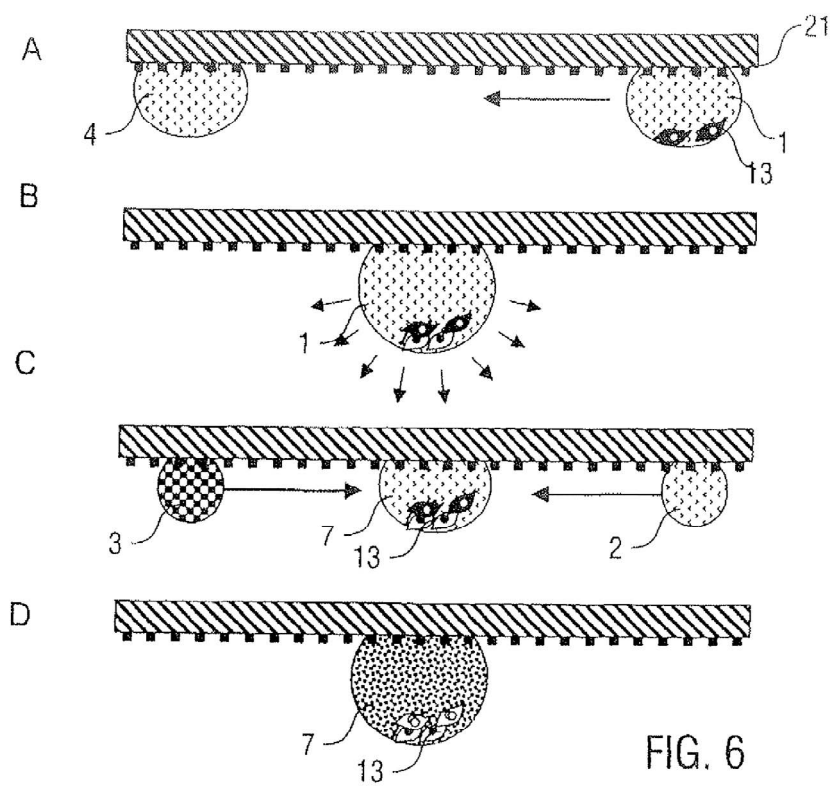


FIG. 6

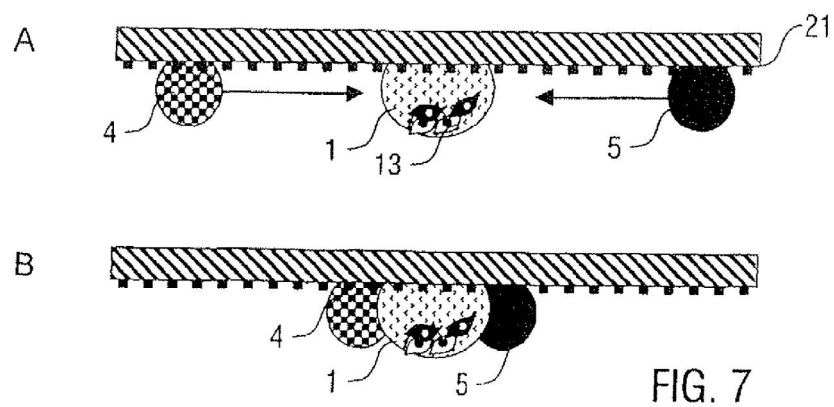
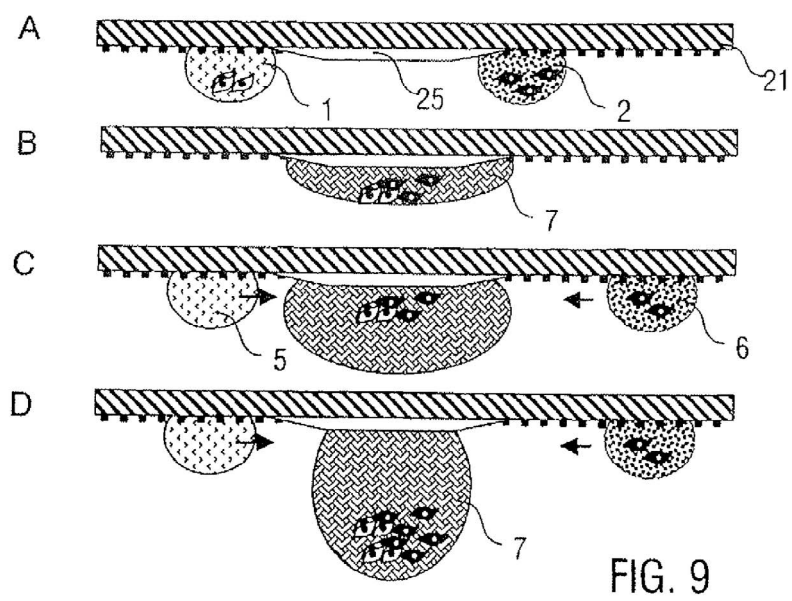
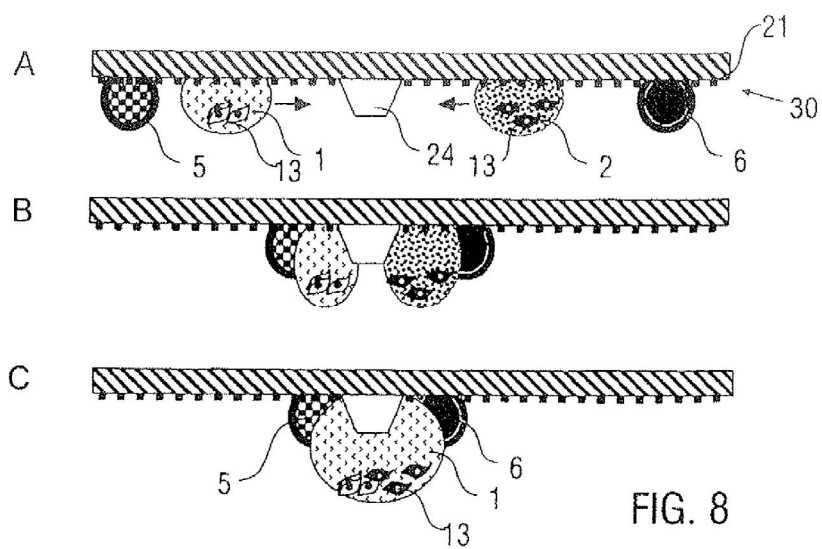


FIG. 7



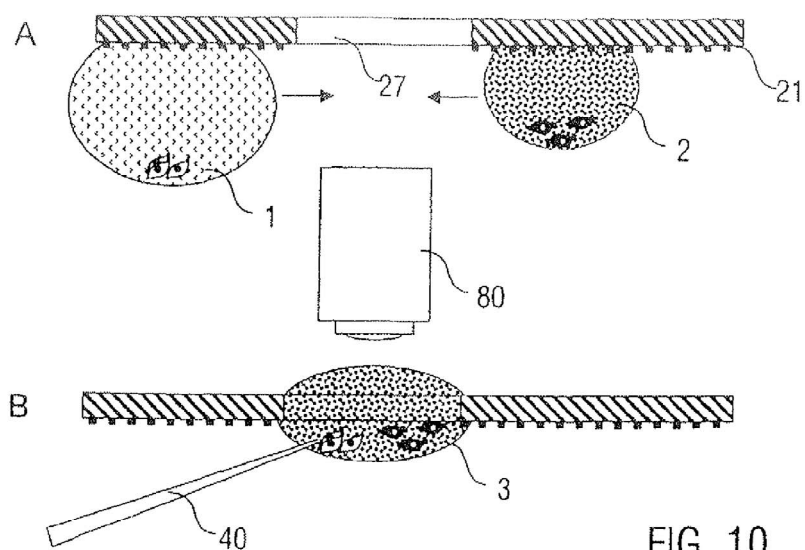


FIG. 10

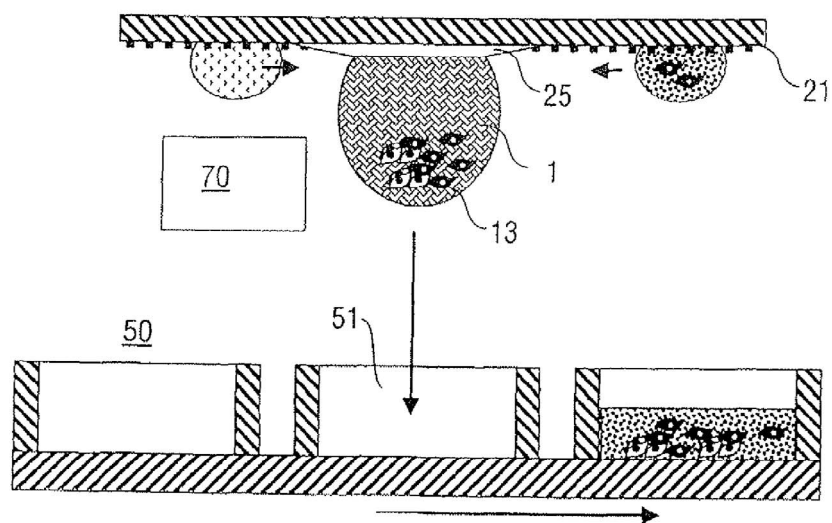


FIG. 11

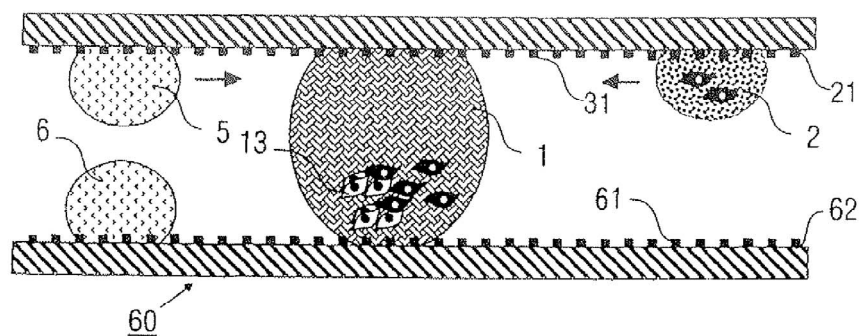


FIG. 12

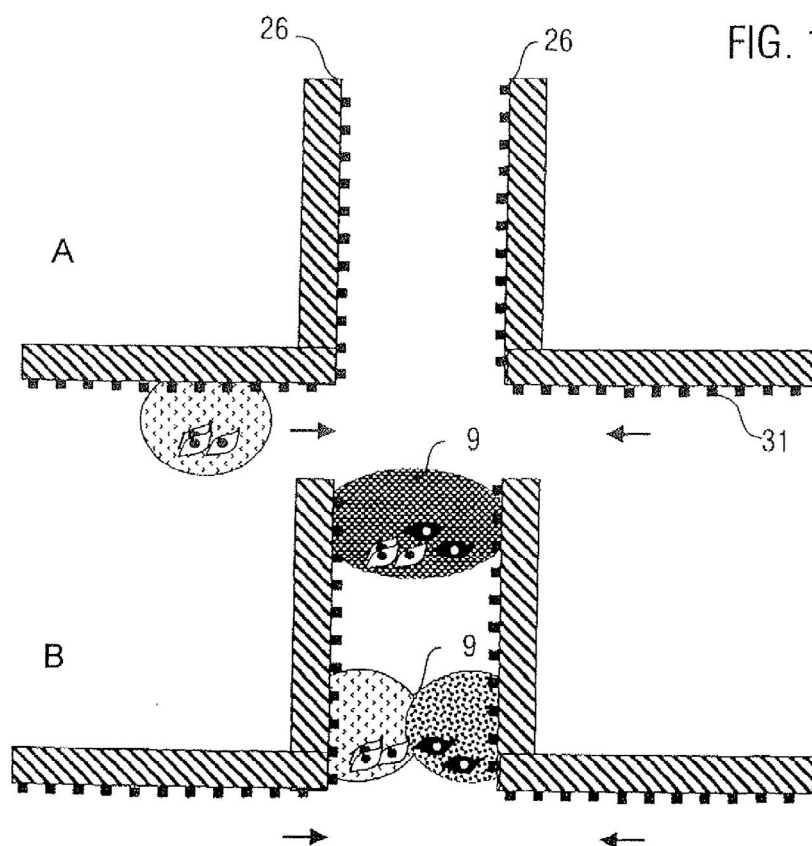


FIG. 13

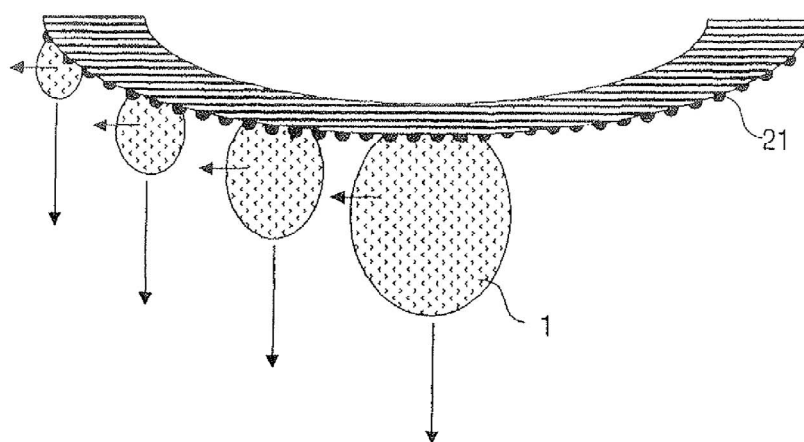


FIG. 14

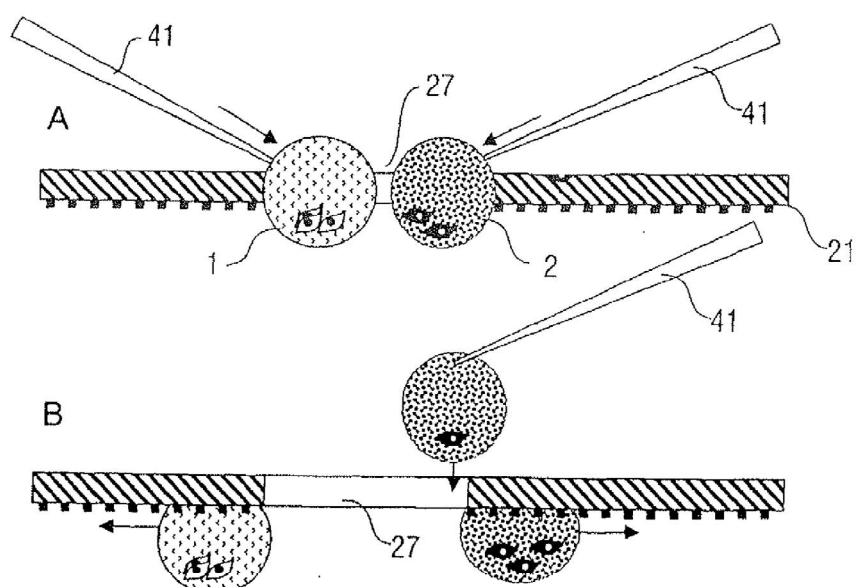


FIG. 15

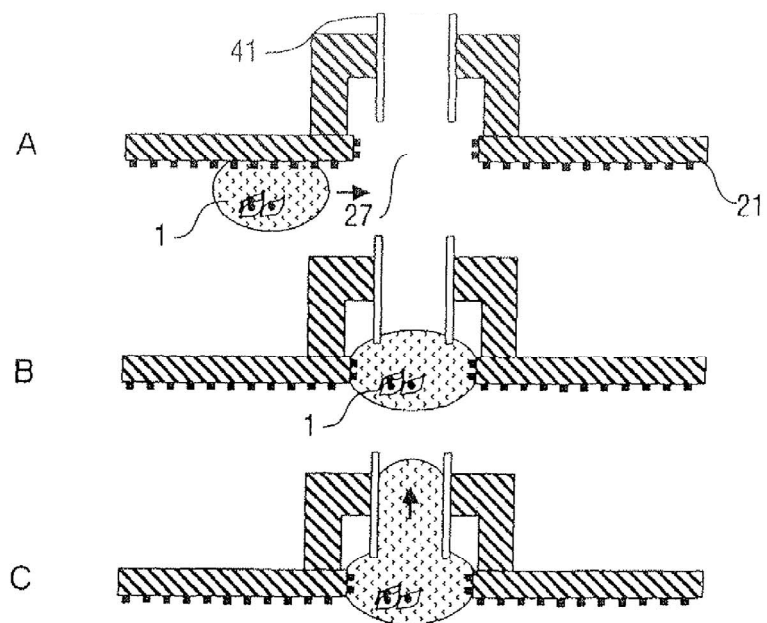


FIG. 16

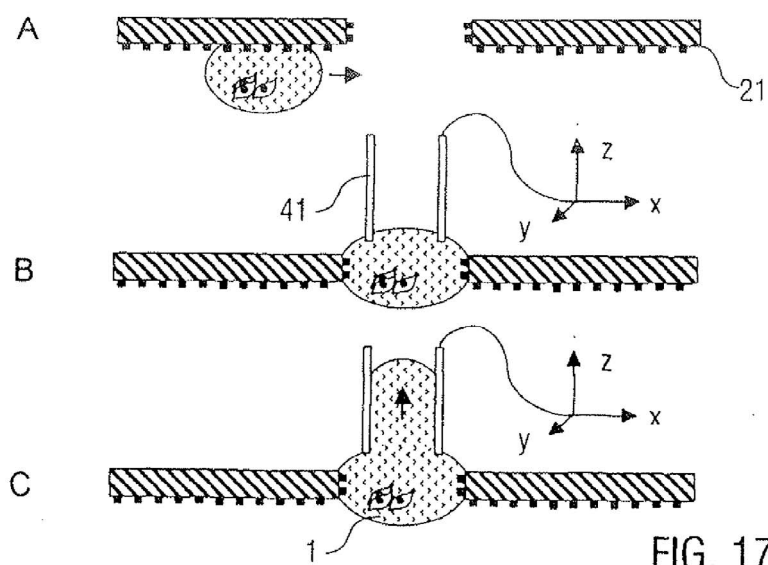


FIG. 17

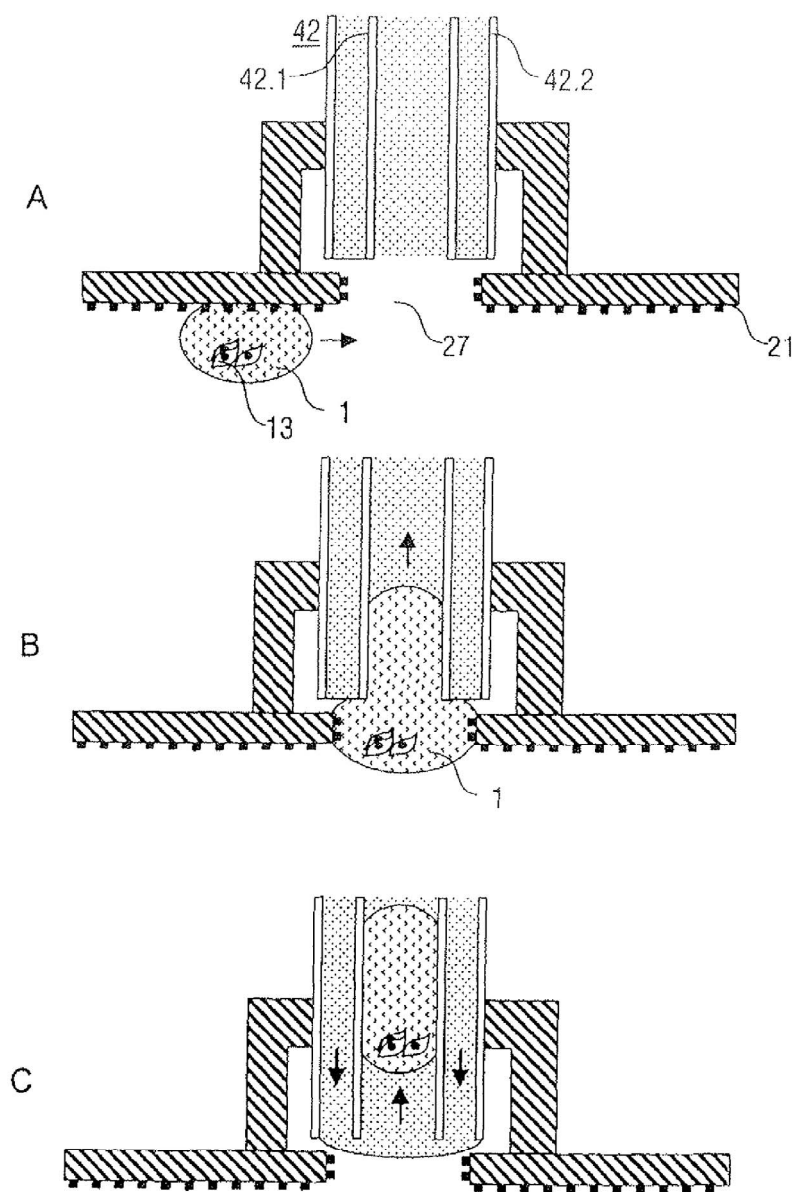


FIG. 18

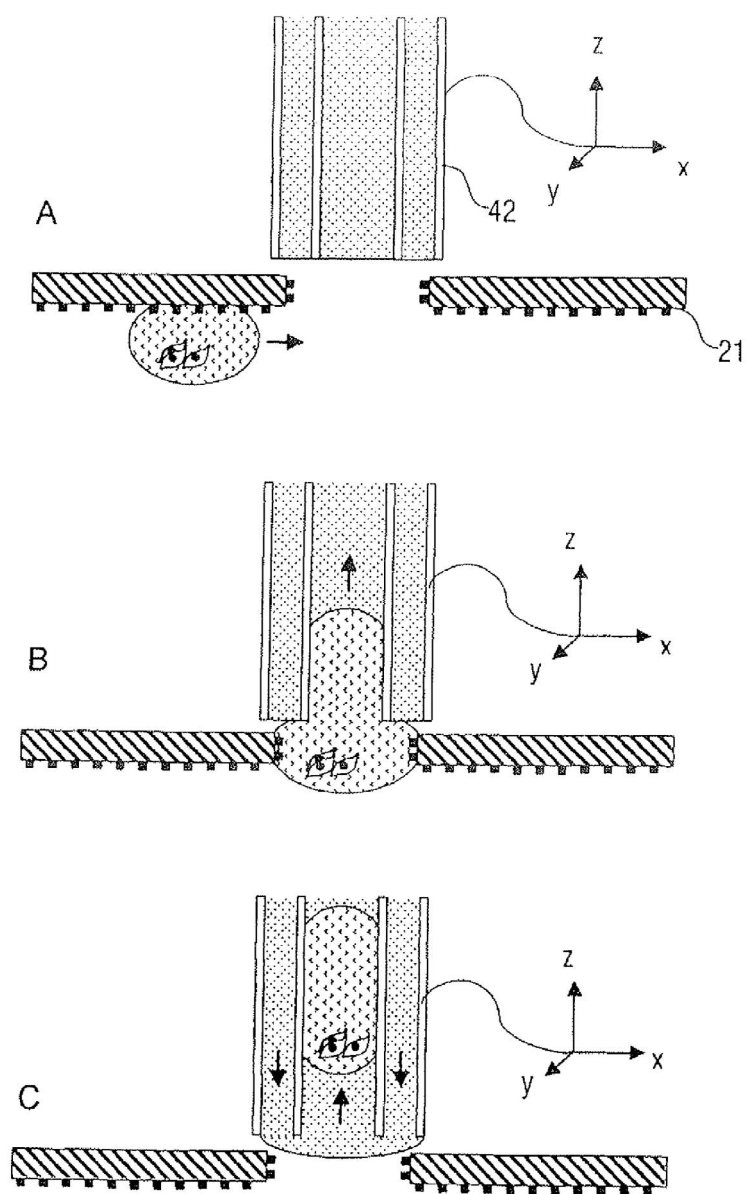
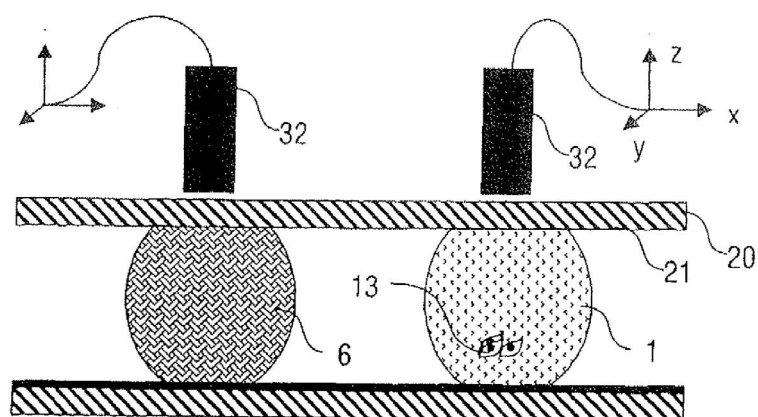
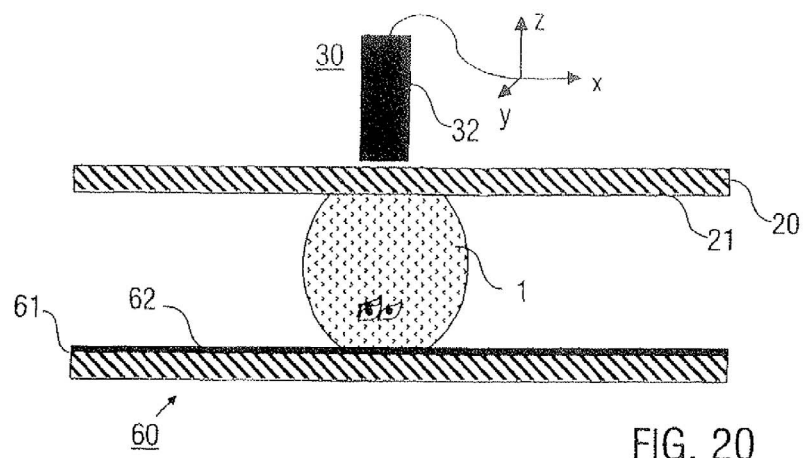


FIG. 19



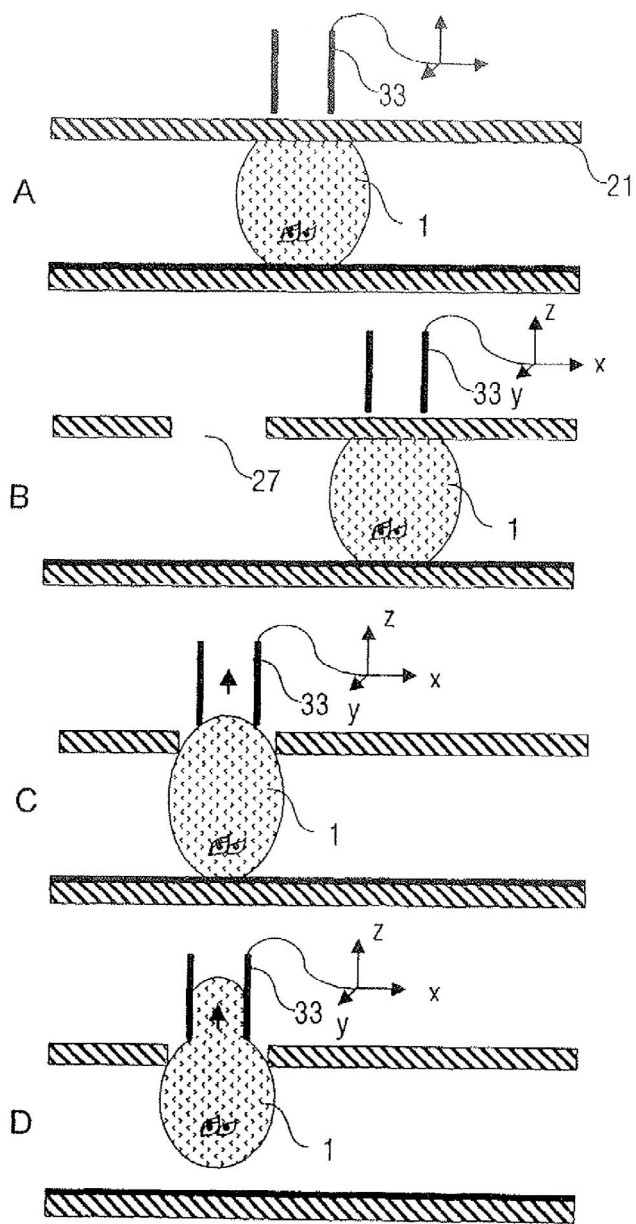


FIG. 22

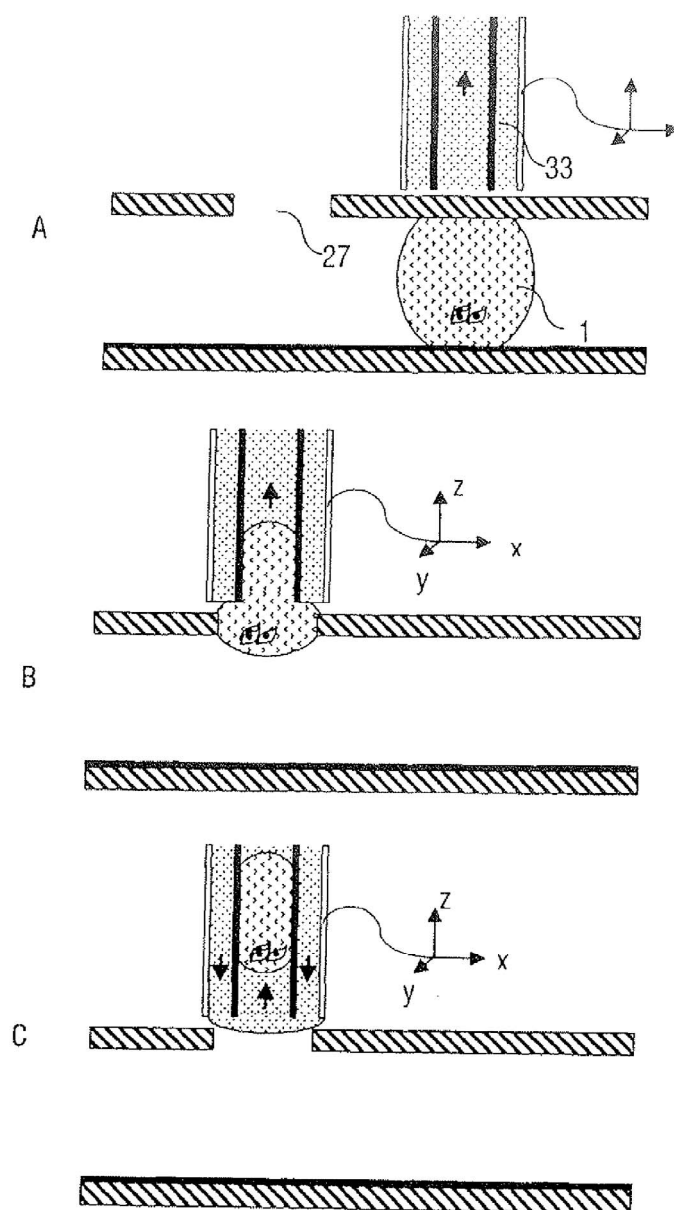


FIG. 23

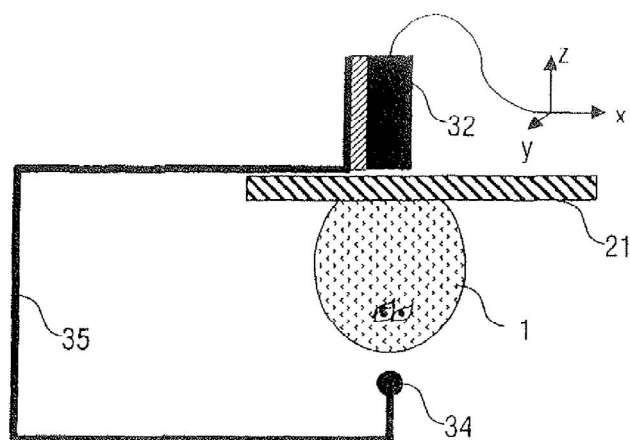


FIG. 24

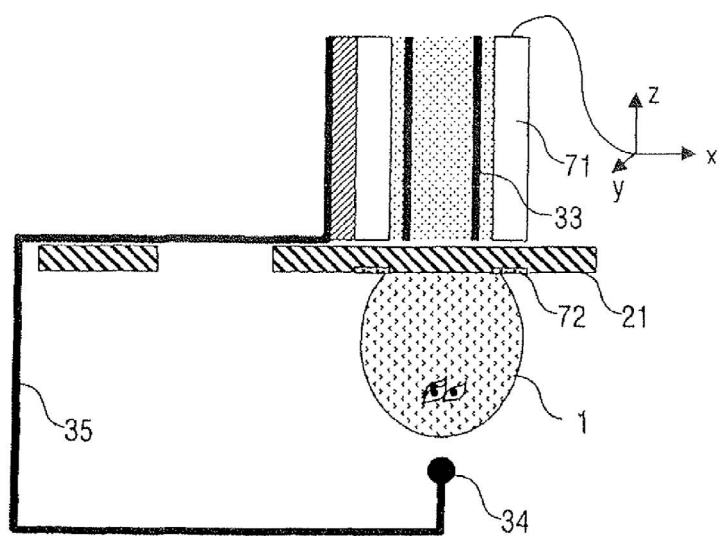
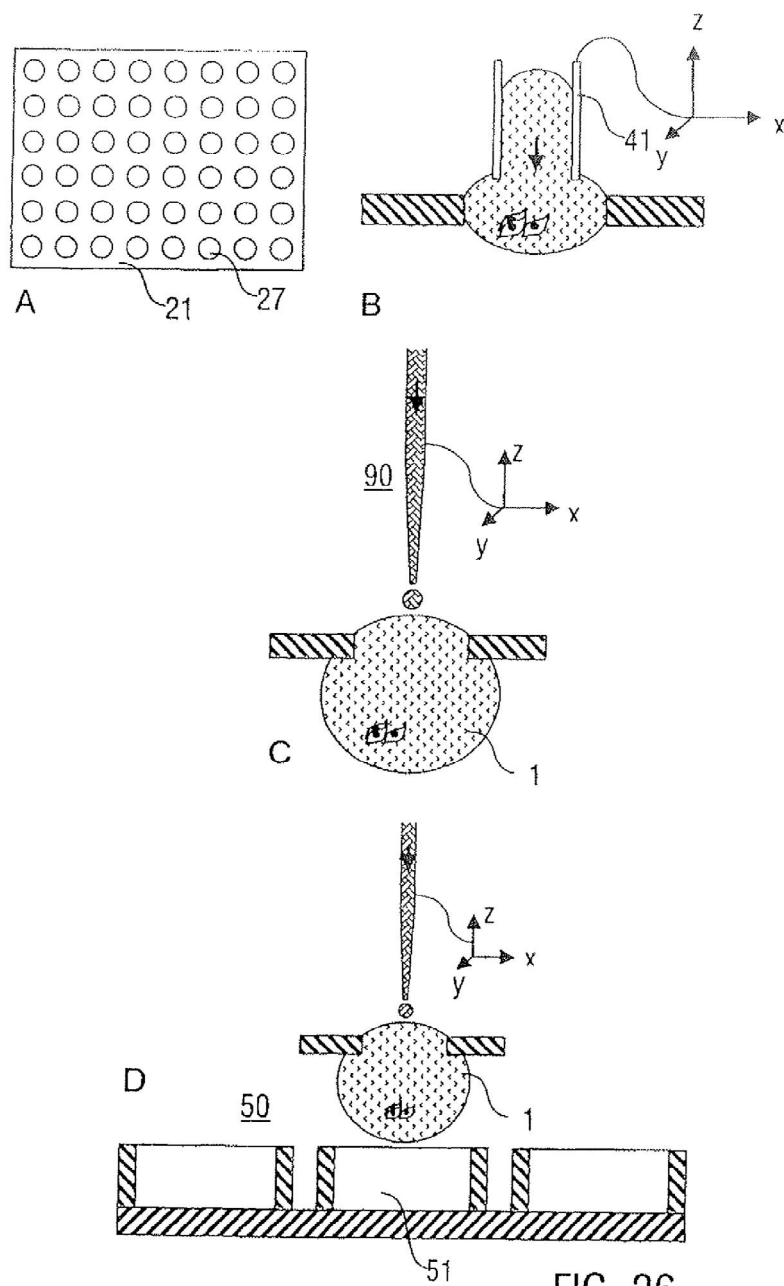


FIG. 25



DOCUMENTOS INDICADOS EN LA DESCRIPCIÓN

5 En la lista de documentos indicados por el solicitante se ha recogido exclusivamente para información del lector, y no es parte constituyente del documento de patente europeo. Ha sido recopilada con el mayor cuidado; sin embargo, la EPA no asume ninguna responsabilidad por posibles errores u omisiones.

Documentos de patente indicados en la descripción

- | | | |
|----|--|---|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> • EP 1386657 A [0005] • EP 1707938 A [0005] • WO 2006026351 A [0005] | <ul style="list-style-type: none"> • US 2007242105 A1 [0005] • WO 2008007511 A [0005] |
|----|--|---|

Literatura no especificada en la descripción de la patente

- 15 • J.A. SCHWARTZ et al. *Lab on a Chip*, 2004, vol. 4, 11-17 [0002]