

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 862 128**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

C40B 50/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.01.2014** **PCT/IL2014/050041**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014** **WO14111928**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.01.2014** **E 14740619 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2021** **EP 2945741**

54 Título: **Dispositivo microfluídico y método de fabricación**

30 Prioridad:

17.01.2013 US 201361753441 P

23.05.2013 US 201361826734 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.10.2021

73 Titular/es:

**TECHNION RESEARCH & DEVELOPMENT
FOUNDATION LTD. (100.0%)
Senate Building, Technion City
3200004 Haifa, IL**

72 Inventor/es:

**LEVENBERG, SHULAMIT y
SHEMESH, JONATHAN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 862 128 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

Dispositivo microfluídico y método de fabricación.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un dispositivo microfluídico y a métodos de fabricación.

10 **Antecedentes de la invención**

Existe un interés creciente en la investigación de células individuales, en especial durante periodos sustanciales (p. ej., días). Los microfluidos permiten numerosas soluciones creativas. En algunas realizaciones, pequeñas poblaciones o incluso células individuales se organizan en rejillas, u otras geometrías organizadas, donde la microscopía de lapso de tiempo y otros análisis pueden utilizarse para monitorear y analizar dichas células (p. ej., monitorear su número, morfología o variación de fluorescencia con el tiempo). En algunos experimentos microfluídicos, las células se separan física o químicamente.

Los dispositivos microfluídicos separan y/o interactúan con las células, otras biomoléculas, muestras o reactivos tanto espacialmente como mediante reacciones químicas. Los dispositivos microfluídicos pueden ofrecer introspecciones adicionales con respecto a la maquinaria celular, sin la limitación de la diafonía bioquímica.

Los dispositivos microfluídicos se diseñan para controlar y manipular, de forma precisa, fluidos en una plataforma geométricamente restringida. Los canales, en algunos dispositivos, tienen un ancho de micras o son más estrechos. Los líquidos en dichos canales pueden medirse en nanolitros o picolitros, a saber, la escala de algunos experimentos científicos de laboratorio típicos o en impresoras de chorro de tinta.

En algunos dispositivos microfluídicos conocidos, las restricciones geométricas promueven entornos diferentes de aquellos en los dispositivos no microfluídicos. El entorno microfluídico puede diferir del entorno no microfluídico en maneras como flujo laminar, tensión superficial, disipación de energía, difusión y resistencia fluidica. En un entorno microfluídico, la velocidad de flujo de los fluidos puede ser inversamente proporcional al cuadrado del área de la sección transversal del canal. En un entorno microfluídico, los fluidos pueden no mezclarse, incluso cuando se sitúan uno al lado del otro.

Algunos dispositivos microfluídicos conocidos utilizan la acción capilar para controlar o manipular fluidos. Otros dispositivos usan microbombas o microválvulas. Los dispositivos microfluídicos proveen numerosas aplicaciones, incluido su uso en reacciones biológicas y el análisis de biomateriales.

Los dispositivos microfluídicos pueden construirse mediante el uso de una variedad de métodos de fabricación, uno de tales métodos siendo, por ejemplo, la litografía suave. Un proceso de litografía suave se refiere, en general, a la construcción de dispositivos, en donde la construcción puede emplear algunas técnicas similares a la litografía estándar, a saber, el uso de luz para transferir estructura detallada en una máscara a una oblea de silicio. La litografía suave normalmente emplea un elastómero, p. ej., un polímero con viscoelasticidad, más concretamente, polidimetilsiloxano (PDMS). La litografía suave se usa, en general, para construir características de una matriz de oblea que contiene un patrón deseado, p. ej., un patrón que puede ser apropiado en un dispositivo microfluídico, o una estampa para crear dicho patrón.

Los microfluidos pueden permitir dispositivos de análisis portátiles con tiempos de procesamiento de muestra cortos. Los microfluidos pueden proveer una funcionalidad en el punto de cuidado de laboratorio en un chip. Por ejemplo, los análisis médicos pueden llevarse a cabo en o cerca del sitio de cuidado del paciente. Otra funcionalidad puede incluir inmunoensayos, diagnósticos moleculares basados en ácidos nucleicos, incluida la aplicación de la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) o hibridación fluorescente *in situ* (FISH, por sus siglas en inglés).

El documento WO 03/035229 A2 se refiere a un aparato que comprende un sustrato que tiene al menos una estación de ensayo. La al menos una estación de ensayo tiene al menos un primer canal de estación de ensayo y al menos un segundo canal de estación de ensayo y el primer y segundo canales de estación de ensayo están, cada uno, de forma separada, en comunicación con la al menos una estación de ensayo. El aparato tiene una disposición de al menos primer y segundo canales multipropósito en comunicación con el primer y segundo canales de estación de ensayo, respectivamente. El primer canal multipropósito y el primer canal de estación de ensayo tienen características superficiales internas que promueven la conducción de una solución de muestra a través de aquellas. Hay al menos una entrada de fluido de muestra en comunicación con el al menos primer canal multipropósito, y al menos una entrada de medio de aislamiento en comunicación con los al menos primer y segundo canales multipropósito. El al menos un segundo canal multipropósito tiene una porción de superficie interna que no promueve la conducción de dicha solución de muestra.

Compendio de la invención

Por consiguiente, se provee, según la presente invención, un dispositivo microfluídico que incluye una plataforma según la reivindicación 1.

5 Además, según algunas realizaciones de la presente invención, la plataforma se forma de manera tal que una cara de la microestructura se cubre por una cubierta que incluye una abertura para permitir el flujo de fluido hacia o fuera del canal principal o del canal secundario mediante la cubierta.

10 Además, según algunas realizaciones de la presente invención, la plataforma se forma de modo tal que una cara de la microestructura se expone y, de esta manera, permite que una fijación no permanente de un sustrato cubra la cara expuesta de la microestructura.

Además, según algunas realizaciones de la presente invención, el sustrato puede fijarse, de manera reversible, a la microestructura.

15 Además, según algunas realizaciones de la presente invención, el sustrato incluye vidrio, plástico o un elastómero.

Además, según algunas realizaciones de la presente invención, las múltiples cámaras incluyen entre 100 y 1000 cámaras.

20 Además, según algunas realizaciones de la presente invención, un sellador de fluidos introducido en los canales principal y secundario aísla una gota en una cámara de dichas múltiples cámaras de una gota en otra cámara de dichas múltiples cámaras.

25 Además, según algunas realizaciones de la presente invención, cada una de las múltiples cámaras está etiquetada.

Breve descripción de los dibujos

30 Con el fin de comprender mejor la presente invención y apreciar sus aplicaciones prácticas, se proveen las siguientes figuras y de aquí en adelante se hace referencia a ellas. Debe observarse que las figuras se proveen como realizaciones solamente y de ninguna manera limitan el alcance de la invención. Componentes iguales se denotan por numerales de referencia iguales.

35 La Figura 1 es una ilustración esquemática de una porción representativa de un dispositivo microfluídico según una realización de la invención;

la Figura 2A es una ilustración esquemática de estructuras en un dispositivo microfluídico mientras el dispositivo microfluídico se carga con muestras y reactivos, según una realización de la invención;

40 la Figura 2B representa una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

45 la Figura 2C representa una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

la Figura 2D es una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

50 la Figura 2E es una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

la Figura 3A es una ilustración esquemática del uso de una pipeta para cargar un dispositivo microfluídico según una realización de la invención;

55 la Figura 3B es una ilustración esquemática del uso de una pipeta para cizallar una muestra cargada en un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

60 la Figura 3C es una ilustración esquemática del uso de una pipeta para introducir un sellador de fluidos en un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

la Figura 4 es una ilustración esquemática de un método para introducir en y manipular una muestra en un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

65 la Figura 5 es una ilustración esquemática de un método para emplear un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención;

la Figura 6A representa una vista esquemática de una cámara individual, según una realización de la invención;

la Figura 6B es una ilustración esquemática de un recorte de una porción de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención; y

la Figura 6C es una ilustración de una sección transversal esquemática a través de un canal principal de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención.

Se apreciará que, en aras de la simplicidad y claridad de la ilustración, los elementos que se muestran en las figuras no se han dibujado necesariamente a escala. Por ejemplo, las dimensiones de algunos elementos se pueden exagerar en relación con otros elementos en aras de la claridad. Además, cuando se considere apropiado, los numerales de referencia pueden repetirse entre las figuras para indicar elementos correspondientes o análogos.

Descripción detallada de la invención

En la siguiente descripción detallada, se establecen numerosos detalles específicos con el fin de proveer una comprensión exhaustiva de los métodos y del aparato. Sin embargo, las personas con experiencia en la técnica comprenderán que los presentes métodos y aparato pueden practicarse sin dichos detalles específicos. En otras instancias, los métodos, procedimientos y componentes conocidos no se han descrito en detalle con el fin de no oscurecer los presentes métodos y aparato.

Aunque las realizaciones descritas en la presente memoria no se encuentran limitadas en este aspecto, los términos "pluralidad" y "una pluralidad", según su uso en la presente memoria, pueden incluir, por ejemplo, "múltiples" o "dos o más". Los términos "múltiples" o "una pluralidad" pueden usarse a lo largo de la memoria descriptiva para describir dos o más componentes, dispositivos, elementos, unidades, parámetros o similares. Salvo que se establezca de forma explícita, las realizaciones del método descritas en la presente memoria no se encuentran limitadas a un orden o secuencia particular. Además, algunas de las realizaciones del método descritas o sus elementos pueden ocurrir o llevarse a cabo en el mismo punto en el tiempo. A menos que se indique lo contrario, el uso de la conjunción "o" es inclusivo (y debe interpretarse que tiene el significado de "y/o").

A menos que se establezca específicamente lo contrario, como es aparente a partir de las siguientes descripciones, se aprecia que, a lo largo de la memoria descriptiva, las descripciones que utilizan términos como, por ejemplo, "que añade(n)", "que asocia(n)", "que selecciona(n)", "que evalúa(n)", "que procesa(n)", "que computa(n)", "que calcula(n)", "que determina(n)", "que designa(n)", "que asigna(n)", o similares, se refieren a las acciones o procesos de un ordenador, procesador de ordenador o sistema informático, o dispositivo informático electrónico similar, que manipulan, ejecutan o transforman datos representados como cantidades físicas como, por ejemplo, electrónicas, dentro de los registros o memorias del sistema informático en otros datos similarmente representados como cantidades físicas dentro de las memorias, registros u otro almacenamiento de información, transmisión o dispositivos de visualización del sistema informático.

Según las realizaciones de la presente invención, un dispositivo microfluídico se configura para permitir la introducción de un fluido (p. ej., un analito u otro líquido) de una fuente externa a una matriz de cavidades, pozos o cámaras. El dispositivo permite el aislamiento y sellado del fluido en cada una de las cámaras. En la presente memoria, se hace referencia al fluido que se ha aislado en una cámara como una gota del fluido.

Con el fin de simplificar la descripción, puede hacerse referencia en la presente memoria al fluido introducido como un "analito" o como un fluido de muestra. Las referencias a un analito en la presente memoria deben comprenderse, salvo que se indique lo contrario, como intercambiables con referencias a un fluido de muestra. Según su uso en la presente memoria, debe comprenderse que una matriz de cámaras se refiere a cualquier patrón regular, semirregular o irregular de cámaras. Por ejemplo, un fluido de muestra (normalmente, un líquido) puede incluir agua, polisorbato 20 (Tween 20®), o cultivo celular de fibroblasto dérmico humano normal (NHDF, por sus siglas en inglés), u otro fluido. Según su uso en la presente memoria, y salvo que se especifique lo contrario, el término "fluido" puede referirse a un líquido o a un gas. Por ejemplo, en algunas realizaciones descritas en la presente memoria, fluidos de muestra y selladores de fluidos (descritos más abajo) son principalmente líquidos, y fluidos de cizallamiento (descritos más abajo) son principalmente gases. Sin embargo, pueden usarse otros tipos de fluidos o el fluido puede cambiar el estado durante o después del uso.

El dispositivo microfluídico incluye una plataforma con una microestructura de canales, cámaras y paredes divisorias. Por ejemplo, la microestructura puede formarse junto con la plataforma, p. ej., en un proceso de moldeo, recubrimiento por rotación o estampado, o puede formarse en una plataforma existente, p. ej., mediante el uso de un proceso de grabado, micromecanización, o fotolitografía. Normalmente, la plataforma es una estructura plana con dos caras grandes, sustancialmente paralelas (p. ej., de forma rectangular, o de otra forma) conectadas por bordes (en general, sustancialmente paralelos a las caras) cuya pequeña dimensión es mucho más pequeña que cualquier dimensión de cualquiera de las caras. La microestructura se dispone

sustancialmente paralela a las caras, de modo que cualquier sección transversal a través de la microestructura que sea paralela a las caras es sustancialmente idéntica a cualquier otra. (La plataforma puede tener otra forma, p. ej., forma no plana con una cara curva o doblada, p. ej., en la forma de una concha fina esférica, esferoide, poliédrica u otra forma.)

Normalmente, una cara de la plataforma incluye una cubierta que evita el acceso a la microestructura mediante dicha cara excepto mediante un número limitado de aberturas en la cubierta. En general, la cara opuesta de la microestructura está expuesta. La cara expuesta puede cubrirse con anterioridad al, o durante el, uso del dispositivo microfluídico mediante fijación de un sustrato.

La microestructura incluye un patrón de canales alargados que se provee para conectar las cámaras a una o múltiples aberturas al exterior del dispositivo. Pequeñas cantidades (p. ej., gotas del tamaño de nanolitros) del fluido de muestra pueden almacenarse aisladas entre sí dentro de las cámaras. Las cámaras son rectangulares.

Según su uso en la presente memoria, un dispositivo se describe como microfluídico, o una estructura de un dispositivo se describe como una microestructura, cuando las dimensiones de varios componentes (p. ej., cámaras o canales) del dispositivo satisfacen varias condiciones. Dichas condiciones incluyen, por ejemplo, que un volumen de una cámara no supere 100 nanolitros (nl), que una dimensión más larga de una cámara no supere 1 mm, o que una dimensión pequeña (p. ej., ancho o altura de una estructura alargada) no supere 500 μm .

En la presente memoria, puede hacerse referencia a las cámaras como nano-pozos cuando el volumen de cada cámara es menor que decenas de nanolitros. (Según su uso en la presente memoria, el término "decenas de nanolitros" debe comprenderse como uno que se refiere a menos de 100 nl.) En algunos casos, el volumen de cada cámara puede ser menor que 10 nl. En algunos casos, el volumen de cada cámara puede ser menor que 1 nl (p. ej., 0,3 nl). En la presente memoria, se hace referencia, de manera conjunta, a las cámaras y canales como una microestructura.

La microestructura se dispone, en general, en un patrón sustancialmente plano. Por ejemplo, las cámaras y los canales pueden formarse mediante el uso de una o más técnicas (p. ej., técnicas de micromecanización, moldeo, fotolitografía, u otras técnicas) para retirar material de una plataforma plana para formar las cámaras y canales. Una cubierta que incluye aberturas al exterior puede fijarse, de manera permanente, a la plataforma que incluye la microestructura. En otras realizaciones, la plataforma, microestructura y cubierta pueden formarse en un solo proceso (p. ej., microlitografía). Puede utilizarse una combinación de diferentes procesos de formación. Cuando se coloca horizontalmente para el uso, el dispositivo microfluídico se coloca de modo que la cubierta con las aberturas al exterior mira hacia arriba.

El otro lado (p. ej., opuesto a la cubierta) de la microestructura puede cerrarse o sellarse mediante fijación de un sustrato. Por ejemplo, el sustrato puede estar hecho de, o incluir, vidrio (p. ej., un portaobjetos), plástico o polímero (p. ej., una placa para cultivo de tejido), un elastómero u otro material adecuado para cerrar un lado de la microestructura. El sustrato puede seleccionarse para una aplicación particular. Con tal fin, un sustrato de un material particular puede seleccionarse, o el sustrato puede recubrirse o silanizarse con un material (p. ej., proteínas en un patrón) con el fin de lograr una propiedad deseada. Por ejemplo, el sustrato puede seleccionarse para permitir características particulares de flujo de un fluido particular dentro de la microestructura (p. ej., hidrofobicidad o hidrofiliidad). El sustrato puede seleccionarse o recubrirse para afectar el comportamiento de las células que se incluyen en el fluido de muestra. Por ejemplo, el sustrato puede seleccionarse recubierto para inducir la fijación celular, para afectar el crecimiento celular en una manera particular, o para facilitar el análisis de las células. La fijación del sustrato a la microestructura puede ser tal para permitir la posterior extracción del sustrato, p. ej., para permitir el acceso al, o eliminación del, fluido de muestra en las cámaras o fluido en los canales. Cuando el dispositivo microfluídico está en uso, el lado sellado por el sustrato se encuentra normalmente en la parte inferior del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, de esta manera, un fluido de muestra se mantiene en contacto con el sustrato por la gravedad.

Cada cámara incluye una abertura que conecta la cámara a un canal principal. Un fluido de muestra puede introducirse en cada cámara mediante el canal principal (y mediante una abertura en la cubierta o en otra parte a través de la cual el fluido de muestra puede introducirse en la microestructura desde fuera del dispositivo microfluídico). Por ejemplo, un fluido de muestra puede inyectarse en una abertura en la cubierta que conecta, ya sea directa o indirectamente (p. ej., mediante un canal interviniente) al canal principal.

Con anterioridad a la introducción del fluido de muestra en la cámara, la cámara puede haberse llenado previamente con un gas (p. ej., aire) o con otro fluido que sea significativamente menos viscoso que el fluido de muestra. Por ejemplo, el dispositivo microfluídico, antes del llenado con fluido de muestra, puede haberse mantenido en una atmósfera o entorno controlado del cual se ha excluido el aire. En aras de la simplicidad, en la presente memoria se hace referencia al fluido que previamente ha llenado la cámara como aire. Las referencias en la presente memoria al aire que llena la cámara antes de la introducción del fluido de muestra deben comprenderse, sin embargo, como unas que se refieren a aire o cualquier otro gas (o líquido de viscosidad

extremadamente baja) que llena la cámara antes de la introducción del fluido de muestra. Cada cámara se conecta a un canal secundario, al que en la presente memoria también se hace referencia como un canal de evacuación, mediante una estructura de salida de ventilación. El canal de evacuación se conecta, ya sea directa o indirectamente (p. ej., mediante un canal interviniente), a una abertura en la cubierta (o en otra parte) que se abre al entorno del ambiente.

La estructura de salida de ventilación se ubica normalmente en un lado de la cámara opuesto a la abertura al canal principal, o en cualquier otro lado de la cámara (de modo que la salida de ventilación no se abra al canal principal). La estructura incluye una disposición de múltiples hendiduras estrechas que conectan el interior de la cámara al canal de evacuación. La estructura de cada hendidura es tal que el aire puede fluir fácilmente de la cámara hacia el canal de evacuación a través de la hendidura. La hendidura es suficientemente estrecha, sin embargo, para impedir o evitar que el fluido de muestra abandone la cámara a través de la hendidura sin aplicación de una presión que sea perceptiblemente mayor que la presión que se aplica para introducir el fluido de muestra. En ausencia de dicha presión mayor, varias fuerzas (p. ej., una o más de tensión superficial o presión de Laplace, fuerzas adhesivas y presión ambiente) resisten el movimiento del fluido de muestra hacia fuera a través de la hendidura al canal de evacuación. De aquí en adelante, se hace referencia a cada una de dichas hendiduras como una salida de ventilación. Por consiguiente, la estructura de salida de ventilación incluye una sola salida de ventilación y puede incluir una o múltiples salidas de ventilación adicionales.

Según su uso en la presente memoria, se considera que una salida de ventilación inhibe el flujo de un fluido cuando, a una presión dada con la cual el fluido se introduce en la microestructura, se evita el flujo del fluido a través de la salida de ventilación. La presión puede, en algunos casos, ser cercana a (p. ej., no mayor que 101% de) la presión atmosférica. En otros casos, p. ej., cuando se usa una pipeta para introducir un fluido, la presión puede superar, de manera significativa, la presión atmosférica.

Un dispositivo microfluídico según las realizaciones de la presente invención, cada una de cuyas cámaras incluye una salida de ventilación y un canal de evacuación, puede ser ventajoso con respecto a un dispositivo con una estructura diferente. La salida de ventilación puede permitir que el aire (normalmente a presión atmosférica, u otro gas a una presión que sea cercana a la presión atmosférica) se evacúe fácilmente de la cámara a través de la salida de ventilación como resultado de la introducción del fluido de muestra. En un dispositivo sin dicha salida de ventilación y sin aplicación de alta presión, burbujas de un fluido que previamente ha llenado la cámara (p. ej., aire) pueden evitar el llenado completo de la cámara por el fluido de muestra.

Por consiguiente, un fluido de muestra puede introducirse en cámaras de un dispositivo microfluídico según realizaciones de la presente invención a una presión relativamente baja (p. ej., que no necesita superar la resistencia de burbujas de aire para forzar el fluido hacia las cámaras). Dicha fijación del sustrato al resto del dispositivo no necesita resistir la alta presión, un mecanismo reversible puede utilizarse para fijar, de manera no permanente, el sustrato al resto del dispositivo. Por ejemplo, un sustrato elastomérico con una superficie pegajosa puede autoadherirse a la microestructura. De manera alternativa o adicional, el sustrato puede mantenerse en el lugar por la gravedad en combinación con la presión atmosférica del ambiente, o puede usarse un adhesivo débil. Dado que se implica la baja presión, no se requiere una unión fuerte o permanente para evitar la fuga fuera del dispositivo microfluídico. Como resultado, el sustrato puede ser extraíble y, de esta manera, permitir el acceso a los contenidos de las cámaras. La extracción del sustrato puede también acelerar la extracción de algunos o todos los contenidos de las cámaras más adelante. La extracción de los contenidos puede permitir un mayor análisis de los contenidos fuera del dispositivo microfluídico, o la limpieza y reutilización del dispositivo microfluídico.

Después de la introducción del fluido de muestra en las cámaras mediante el canal principal, el fluido de muestra en el canal principal puede retirarse. En la presente memoria, se hace referencia a la operación de extraer un fluido del canal principal mientras se retiene fluido en las cámaras como cizallamiento. Por ejemplo, aire u otro fluido de cizallamiento (normalmente, un gas) puede introducirse en el canal principal mediante una abertura en la cubierta que está funcionando como una entrada. El fluido de cizallamiento puede forzar el fluido de muestra fuera del canal principal mediante otra abertura que está funcionando como una salida. El fluido de muestra extraído o recortado puede absorberse por un material absorbente tras la salida mediante la salida. Las cámaras se configuran (p. ej., al caracterizarse por varias características de diseño, p. ej., relacionadas con la forma o propiedades de superficie) para retener el fluido de muestra dentro de las cámaras durante el cizallamiento.

Después de la introducción del fluido de muestra en las cámaras, las cámaras pueden sellarse por la introducción de un sellador de fluidos. El sellado de las cámaras puede permitir la retención del fluido introducido al evitar la evaporación o fuga. El sellado de las cámaras puede también servir para aislar el fluido de muestra en cada cámara del fluido de muestra en las otras cámaras. El sellado puede llevarse a cabo después del cizallamiento (o puede llevarse a cabo de manera concurrente con el cizallamiento, p. ej., si un sellador de fluidos se usa como el fluido de cizallamiento).

Por ejemplo, un sellador de fluidos que no reacciona químicamente con el fluido de muestra puede introducirse mediante aberturas (p. ej., en la cubierta) en los varios canales del dispositivo microfluídico. Un sellador de

fluidos adecuado puede incluir, por ejemplo, un aceite de fluorocarbono. La introducción del sellador de fluidos en un canal principal aísla las cámaras llenas entre sí y del entorno del ambiente. La introducción del sellador de fluidos en un canal de evacuación extrae aire del canal de evacuación, además de aislar el fluido de muestra en la cámara llena del contacto con el entorno del ambiente mediante las salidas de ventilación. Después de la introducción del sellador de fluidos, muestras aisladas del fluido de muestra pueden mantenerse en aislamiento unas de otras y del entorno del ambiente hasta la extracción del sustrato del resto del dispositivo. Después del sellado, o en cualquier otro momento, la abertura (p. ej., en la cubierta) puede sellarse para evitar la evaporación o de otra manera aislar los contenidos del dispositivo microfluídico del entorno.

Cada cámara puede marcarse (p. ej., en una sección adyacente de la cubierta) en una manera que provea una identificación única de cada cámara. El marcado puede ser identificable mediante visualización a través de un microscopio u de otra forma.

La fijación extraíble de un sustrato al dispositivo microfluídico puede ser ventajosa. El sustrato puede retirarse y reemplazarse en diferentes momentos para permitir el contacto con varias muestras mantenidas en varias cámaras del dispositivo microfluídico. Puede seleccionarse un sustrato que sea adecuado para una aplicación particular. Por ejemplo, diferentes sustratos pueden tener diferentes afinidades con diferentes fluidos de muestra o componentes de fluidos de muestra. Diferentes sustratos pueden permitir diferente movilidad de un fluido de muestra o componente de fluido de muestra dentro del dispositivo microfluídico. Por consiguiente, la selección de un sustrato particular puede ser ventajosa al llevar a cabo un análisis de células individuales a largo plazo con respecto a células adherentes. Un dispositivo microfluídico con fijación extraíble de un sustrato puede ser ventajoso al llevar a cabo la proliferación y seguimiento de metabolismo en células o tejido de mamíferos, bacterias, u otras células. La secreción celular puede monitorearse en los pozos químicamente aislados. Sustratos recubiertos (p. ej., con anticuerpos u otras moléculas utilizadas en la detección) pueden usarse en la detección o análisis de patrones que promueven o no promueven la adherencia.

Según algunas realizaciones de la invención, gotas de un fluido de muestra (p. ej., en la manera descrita de aquí en adelante) pueden diseñarse para contener una concentración desconocida, conocida o variable del fluido de muestra. Los fluidos de muestra contenidos en una gota pueden incluir, por ejemplo, células, proteínas, pequeñas moléculas, metabolitos, ácidos nucleicos, moléculas, biomoléculas, u otras sustancias que pueden someterse a ensayo. Una gota puede permanecer estable y estacionaria, en algunas realizaciones de la invención, debido a limitaciones geométricas u otras. Por ejemplo, las limitaciones geométricas pueden incluir una forma rectangular de una cámara del dispositivo microfluídico. Otras limitaciones pueden resultar de un material con el cual se construye una superficie del dispositivo. En algunas realizaciones, puede no haber evaporación detectable de una gota durante un período prolongado.

El flujo de un fluido de muestra a través de un dispositivo microfluídico puede caracterizarse por el número de Reynolds del dispositivo. El número de Reynolds es una cantidad adimensional que es equivalente a la relación de fuerzas de inercia con respecto a fuerzas viscosas dentro de una disposición de un fluido que está fluyendo alrededor de o entre superficies. El número de Reynolds es indicativo del tipo de flujo de fluido (p. ej., laminar o turbulento) en la disposición.

El número de Reynolds (Re) puede expresarse como:

$$Re = \frac{\rho v L}{\mu}$$

donde v es la velocidad media del objeto con respecto al fluido (p. ej., en metros/segundo); L es una dimensión lineal característica, p. ej., longitud (p. ej., en metros); μ es la viscosidad dinámica del fluido (p. ej., en kilogramos/(m·s)); y ρ es la densidad del fluido (p. ej., en kg/m³).

En algunas realizaciones de la presente invención, el número de Reynolds para el flujo del fluido de muestra dentro del dispositivo microfluídico puede ser menor que 100, y en algunos dispositivos microfluídicos, el número de Reynolds puede aproximarse a o ser menor que 1. Cuando el número de Reynolds es 100 o menos, el flujo a través del dispositivo microfluídico es completamente o casi completamente laminar, y no ocurre turbulencia alguna en el flujo. Cuando el flujo es laminar, las moléculas pueden transportarse a través de canales en el dispositivo microfluídico en una manera relativamente predecible.

En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico puede aplicarse para permitir la visualización, medición o análisis con respecto a varios escenarios bioquímicos o moleculares. Algunos escenarios pueden incluir, por ejemplo, señalización e interacciones de célula a célula, medición de tiempo vs. exposición de una respuesta celular de una célula individual a la estimulación química, relaciones dosis-respuesta, cribado de resistencia al esfuerzo bacteriano a fármacos antibióticos, investigación de células individuales procariotas en entornos altamente aislados, y captación y excreción celular.

Un dispositivo microfluídico puede también usarse para permitir o acelerar la conducción, visualización, medición o análisis de ensayos rápidos de susceptibilidad antibiótica contra diferentes especies de patógenos, ensayos de secreción de células individuales monitoreados durante largos periodos de incubación, diluciones de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) molecular individual (p. ej., de modo que cada gota contiene una sola molécula de ácido desoxirribonucleico (ADN)), RT-PCR llevada a cabo en una sola célula, inmunoensayos, o aplicación de otras metodologías biológicas o no biológicas.

En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico puede ser reciclable o puede permitir la fijación reversible de un sustrato al dispositivo microfluídico. El uso de un dispositivo microfluídico puede ser ventajoso al proveer simplicidad de uso, recuperación celular o modelado con patrones de superficie. El dispositivo microfluídico puede usarse para aislar, almacenar o usar pequeñas cantidades de fluido de muestra, p. ej., en una escala de microlitro, nanolitro o picolitro. El fluido de muestra puede incluir, por ejemplo, analitos, fluidos corporales, fluidos hidrofóbicos u otros reactivos. El dispositivo microfluídico puede configurarse para la carga de un aceite de fluorocarbono u otro sellador de fluidos.

El dispositivo microfluídico puede no requerir el uso de un surfactante basado en fluorocarbono en el proceso de carga. El dispositivo microfluídico puede permitir la fabricación por litografía suave, sin una etapa de sellado de oxígeno de plasma. El dispositivo microfluídico puede permitir la fácil configuración y carga.

La Figura 1 es una ilustración esquemática de una porción representativa del dispositivo microfluídico 10, según una realización de la invención.

En algunas realizaciones, un dispositivo microfluídico puede configurarse para incluir monómeros que se repiten de la porción representativa de un patrón microestructural descrito, por ejemplo, en la presente memoria. En algunas realizaciones, un dispositivo microfluídico puede configurarse para incluir la porción representativa que se muestra en la presente memoria o una combinación de porciones similares y diferentes como componentes de un dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, un dispositivo microfluídico puede compartimentarse para incluir la porción representativa que se muestra en la presente memoria y otras porciones no relacionadas con, o distintas de, la porción representativa. En algunas realizaciones, un dispositivo microfluídico puede configurarse de modo que algunas porciones del dispositivo se diseñan para contener diferentes volúmenes en sus respectivas cámaras, p. ej., las cámaras según se describe más abajo. En algunas realizaciones, un dispositivo microfluídico puede configurarse de modo que las porciones del dispositivo microfluídico que contienen diferentes volúmenes en sus respectivas cámaras pueden usarse para comparar el comportamiento de analitos, moléculas, células u otras muestras en diferentes volúmenes.

En la Figura 1, el dispositivo microfluídico 10 se muestra sin cubierta 22 (visible en la Figura 6B), con el fin de permitir la visualización de la estructura interna. Normalmente, la cubierta 22 se une, de forma permanente, a, o es integral a (p. ej., formada por un material continuo con) la plataforma 20. En algunas realizaciones, la cubierta 22 es transparente para permitir la visualización del interior del dispositivo microfluídico 10. La cubierta 22 puede contener uno o más puertos o aberturas para permitir que los fluidos (p. ej., aire, fluido de muestra o sellador de fluidos) se introduzcan en o se retiren del interior del dispositivo microfluídico 10.

El dispositivo microfluídico 10 incluye una plataforma 20. La plataforma 20 puede estar hecha de varios materiales. Por ejemplo, la plataforma 20 puede estar hecha de un polímero como, por ejemplo, polidimetilsiloxano (PDMS o dimeticona), u otro polímero o material adecuado. La plataforma 20 puede incluir una o múltiples microestructuras 30. Las microestructuras 30 pueden incluir varias indentaciones o patrones microestructurales huecos que comprenden un canal principal 90, uno o múltiples canales secundarios 80, cámaras 60 que se bifurcan del canal principal 90 y salidas de ventilación 100 (se muestran en la Figura 2) separadas por paredes divisorias. Las microestructuras 30 pueden apoyarse directa o indirectamente en la plataforma 20. La plataforma 20 puede construirse con o incluir el mismo material o un material similar al de las microestructuras 30. La plataforma 20 puede construirse con un material distinto de las microestructuras 30, por ejemplo, las microestructuras 30 se prefabrican y fijan a una plataforma 20 separada. En algunas realizaciones, las microestructuras 30 pueden fabricarse mediante el uso de un proceso que se asocia a la litografía suave. El proceso puede incluir la construcción de un maestro, p. ej., en la forma de una placa o molde maestro, mediante el uso, por ejemplo, de fotolitografía, haz de electrones, micromecanización, u otra técnica. Un elastómero como, por ejemplo, PDMS, puede verse, cubrirse por rotación, o de otra manera aplicarse a una placa maestra o en un molde y curarse (p. ej., mediante aplicación de calor o luz ultravioleta) o endurecerse. Una vez curado o endurecido, el elastómero puede desprenderse o de otra manera retirarse del maestro o molde, lo cual resulta en un conjunto de patrones microestructurales que son el inverso de aquellos en el maestro. El molde PDMS desprendido puede utilizarse como un dispositivo microfluídico, o puede usarse como una estampa para transferir los patrones y las estructuras del maestro a otra superficie o plataforma.

En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede fabricarse mediante el uso de una técnica de grabado profundo con iones reactivos (DRIE, por sus siglas en inglés). DRIE es un proceso de grabado anisotrópico que puede usarse para crear penetración profunda, agujeros o trinchas de lados empinados en los sustratos. DRIE puede ser criogénico (a saber, en donde el sustrato se enfría previamente

antes del grabado químico), o puede utilizar un proceso de Bosch (grabado pulsado o multiplexado en el tiempo). DRIE puede permitir el logro de resoluciones más altas que con otros procesos, lo cual puede permitir que el dispositivo microfluídico 10 funcione en un amplio rango de presiones.

Las microestructuras 30 pueden fabricarse mediante el uso de otros procesos o procesos adicionales. Las microestructuras 30 pueden tener una sola capa o ser multicapa. Los patrones microestructurales pueden configurarse para proveer funcionalidad al dispositivo microfluídico 10. Diferentes patrones microestructurales pueden emplearse con uno o múltiples dispositivos microfluídicos 10, dependiendo de la naturaleza de la muestra, reactivo u otros fluidos (p. ej., fluido de muestra o sellador de fluidos) previstos para su uso con el dispositivo microfluídico 10. Diferentes patrones microestructurales pueden usarse con el dispositivo microfluídico 10, p. ej., dependiendo del entorno externo del dispositivo microfluídico 10 u otros criterios.

Las microestructuras 30 pueden incluir canales, bombas, válvulas, cámaras, salidas de ventilación u otros componentes en un dispositivo microfluídico.

El dispositivo microfluídico 10 tiene múltiples entradas secundarias 40 y una o múltiples entradas principales 50. En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico puede incluir puertos de acceso o entradas adicionales, incluidas una o múltiples entradas laterales o secundarias 40 y una o múltiples entradas principales 50. Por ejemplo, cada canal principal 90 puede estar provisto de dos entradas principales 50. Durante el uso, una de las entradas principales 50 puede funcionar como una entrada durante la introducción de un fluido de muestra en el dispositivo microfluídico 10, y la otra, como una salida para el fluido de muestra durante la introducción de un sellador de fluidos. De manera similar, cada canal secundario 80 puede estar provisto de dos entradas secundarias 40. En general, las entradas principales 50 y las entradas secundarias 40 se ubican cerca de los extremos de su canal principal 90 y canal secundario 80 correspondientes, respectivamente.

Cada entrada principal 50 o entrada secundaria 40 es accesible desde fuera del dispositivo microfluídico 10 mediante un puerto o abertura en la cubierta 22. Por ejemplo, cada abertura se coloca sobre su entrada principal 50 o entrada secundaria 40 correspondiente. En algunas realizaciones, las entradas pueden tener formas que se parecen a círculos. En otras realizaciones, las entradas pueden tener otras geometrías. En algunas realizaciones, las entradas pueden configurarse para permitir la introducción o escape de fluidos de muestra, analitos, selladores de fluidos, reactivos, propelentes u otros fluidos. Los propelentes pueden configurarse para mover muestras, reactivos, u otros fluidos a través del dispositivo microfluídico 10. Los propelentes pueden incluir aire. Las entradas o sus aberturas correspondientes pueden ser un componente del maestro, como se describe, por ejemplo, en la presente memoria, o pueden añadirse después de que el molde se haya copiado del maestro.

El dispositivo microfluídico 10 incluye compartimentos, huecos, cámaras, pozos, nano-pozos, o cavidades, representadas por las cámaras 60. Las cámaras 60 se incluyen en microestructuras 30 en el dispositivo microfluídico 10. Las cámaras 60 pueden configurarse para aceptar o contener fluidos de muestra o analitos inertes, biológicos, orgánicos, inorgánicos o de otro tipo. Las cámaras 60 pueden configurarse para aceptar o contener reactivos u otros fluidos. Una forma geométrica de cada cámara 60 puede ser en la forma de, o similar a, un cuadrado, rectángulo, círculo, u otra forma. Las cámaras 60 pueden caracterizarse por un área y un volumen definidos. Algunas de o todas las cámaras 60 pueden ser abiertas a un entorno externo o exterior, o pueden sellarse con respecto a un entorno externo o ambiente.

En algunas realizaciones de la invención, un lado abierto del dispositivo microfluídico 10 (p. ej., un lado que no tiene cubierta 22) puede sellarse por la fijación de un sustrato 15. Por ejemplo, el sustrato 15 puede fijarse con anterioridad al uso. El sustrato 15 puede fijarse de manera reversible o irreversible (permanente). La fijación puede incluir aplicación de tratamiento con plasma de oxígeno, que puede servir para eliminar la contaminación superficial orgánica mediante una reacción química con los contaminantes de superficie.

El dispositivo microfluídico, o porciones de este, o las cámaras 60 pueden sellarse con respecto al entorno externo mediante un sustrato 15. El sustrato 15 puede incluir vidrio, polilisina, vidrio tratado con poli-L-lisina, una placa de cultivo tisular, una placa de cultivo no tisular (poliestireno), PDMS, una placa de Petri, un portaobjetos para microscopio, u otro componente adecuado.

El dispositivo microfluídico 10 incluye un canal lateral 80 y un canal principal 90. El dispositivo microfluídico 10 puede tener uno o múltiples canales adicionales. En algunas realizaciones, los canales adicionales pueden incluir uno o múltiples canales laterales 80, canales principales 90 u otros canales. Los canales pueden tener diámetros en el rango de 10 μm -500 μm . En algunas realizaciones de la invención, los canales pueden tener diámetros más anchos. En algunas realizaciones de la invención, los canales pueden tener diámetros más estrechos. Los volúmenes de los canales pueden estar en el rango de nanolitros (p. ej., de menos de 1 nl, p. ej., 0,3 nl o menos, a decenas de nanolitros, p. ej., 8 nl o más). Los canales pueden configurarse para permitir que los fluidos de muestra, reactivos, propelentes, analitos, muestras procesadas, reactivos procesados, propelentes de procesos u otros fluidos entren en las cámaras 60. El procesamiento de analitos, fluidos de muestra, reactivos, propelentes u otros fluidos puede incluir cizallamiento.

El dispositivo microfluídico 10 puede tener uno o múltiples puertos de salida. Los puertos de salida, por ejemplo, según se describe más abajo, pueden configurarse para permitir a un usuario extraer fluidos de muestra, reactivos, propelentes u otros fluidos del dispositivo microfluídico 10, incluidas muestras, impurezas o propelentes evacuados del canal principal 90.

5 El dispositivo microfluídico 10 puede tener puertos de acceso o entradas adicionales para permitir la introducción de muestras, reactivos, propelentes, otros fluidos o aceites basados en fluorocarbono en el dispositivo microfluídico 10.

10 Una cámara 60 puede estar separada de otra estructura por una o más paredes 70. Algunas de o todas las paredes 70 pueden incluir salidas de ventilación, según se describe, por ejemplo, en la presente memoria con referencia a las Figuras 2A-2E. En algunas realizaciones de la invención, una cámara 60 puede configurarse para tener paredes 70 que definen un área, un volumen o que definen un área o volumen parcialmente. En algunas realizaciones, puede haber una o múltiples paredes 70 que definen el área o volumen de una cámara 60. En algunas realizaciones, las paredes 70 pueden ser continuas. Las paredes 70 de las cámaras 60 pueden ser discretas o no contiguas. Las paredes 70 discretas o no contiguas pueden tener paredes vecinas. Las paredes 70 pueden o pueden no tener espacios entre paredes vecinas. Según algunas realizaciones de la presente invención, las cámaras 60 pueden tener volúmenes que pueden medirse en picolitros o nanolitros. Las estructuras individuales de las microestructuras 30 pueden tener dimensiones que pueden medirse en micrómetros hasta milímetros.

20 Según algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo microfluídico 10, o un subconjunto de microestructuras 30 en el dispositivo microfluídico 10, puede caracterizarse por un área de 60 milímetros (mm) × 24 mm. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer un área y volumen para 600 gotas de una muestra cizallada por dispositivo. En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para una cantidad mayor o menor de gotas de una muestra.

30 Según algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que cada gota de una muestra cizallada puede tener un volumen definido por las dimensiones 400 μm × 200 μm × 100 μm. Cada gota puede tener un volumen definido por dimensiones que son, en algunas realizaciones, mayores, o, en algunas realizaciones, menores que dichas dimensiones. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo tal que cada gota de muestra tiene un volumen de 8 nanolitros. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo tal que cada gota de muestra tiene un volumen mayor o menor que 8 nanolitros.

35 Según algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que el volumen total de fluido de muestra utilizado es de 15 μl y el volumen total de sellador de fluidos utilizado es de 40 μl. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que el volumen total de fluido de muestra es mayor o menor que 15 μl, y el volumen total de sellador de fluidos utilizado es mayor o menor que 40 μl.

40 El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que no se utilicen surfactantes en la carga, descarga o en el análisis de un fluido de muestra. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que los surfactantes puedan usarse en la carga, descarga o en el análisis de un fluido de muestra. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que el tiempo de carga pueda ser aproximadamente de 5 minutos. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que el tiempo de carga pueda ser superior o inferior a 5 minutos.

50 El dispositivo microfluídico 10 puede cargarse de forma manual, semiautomática o automática. El dispositivo microfluídico 10 puede cargarse mediante el uso de una pipeta, un bulbo de pipeta, aspiración por vacío, u otro dispositivo o técnica.

55 En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico 10, o un subconjunto de microestructuras 30 en el dispositivo microfluídico, puede tener un área de 60 milímetros (mm) × 24 mm. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para 200 gotas de muestra cizalladas por dispositivo. En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para una cantidad mayor o menor de gotas de muestra.

60 El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que cada gota de muestra puede tener un volumen definido por las dimensiones 80 μm × 80 μm × 50 μm. Cada gota de muestra puede tener un volumen definido por dimensiones que son, en algunas realizaciones, mayores, o, en algunas realizaciones, menores que dichas dimensiones. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo tal que cada gota de muestra tiene un volumen de 0,3 nanolitros.

65 Según algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo tal que cada gota de muestra tiene un volumen mayor o menor que 0,3 nanolitros. El dispositivo

microfluídico 10 puede configurarse de modo que el volumen total de fluido de muestra utilizado es de 15 μ l y el volumen total de sellador de fluidos utilizado es de 40 μ l. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse de modo que el volumen total de fluido de muestra utilizado es mayor o menor que 15 μ l, y el volumen total de sellador de fluidos utilizado es mayor o menor que 40 μ l.

El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para diferentes números de gotas de muestra cizalladas por dispositivo. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para menos de 200 gotas de muestra cizalladas por dispositivo, p. ej., 100. El dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para más de 600 gotas de muestra cizalladas por dispositivo, p. ej., menos de 1000 cámaras.

En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 100 y 200 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 100 a 200 cámaras 60. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 200 y 300 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 200 a 300 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 300 y 400 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 300 a 400 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 400 y 500 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 400 a 500 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 500 y 600 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 500 a 600 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 600 y 700 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 600 a 700 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 700 y 800 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 700 a 800 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 800 y 900 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 800 a 900 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para entre 900 y 1000 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de 900 a 1000 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para más de 1000 gotas por dispositivo, p. ej., dentro de más de 1000 cámaras. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico 10 puede configurarse para proveer área y volumen para menos de 100 gotas por dispositivo.

Según algunas realizaciones de la presente invención, las cámaras 60 pueden disponerse opuestas entre sí a ambos lados de un canal principal 90 lineal, como se muestra en la Figura 1. Según algunas realizaciones de la presente invención, todas o parte de las cámaras 60 pueden tener otra configuración. Por ejemplo, las cámaras 60 pueden disponerse de modo que todas estén en un lado del canal principal 90. Las cámaras 60 pueden disponerse de modo que las cámaras 60 en un lado del canal principal 90 son cámaras 60 escalonadas (p. ej., no directamente opuestas) en el otro lado. El canal principal 90 puede tener una forma curva, doblada, espiral, u otra forma, las cámaras 60 disponiéndose alrededor del canal principal 90 de manera acorde. Pueden usarse otras disposiciones.

La Figura 2A es una ilustración esquemática de estructuras en un dispositivo microfluídico mientras el dispositivo microfluídico se carga con muestras y reactivos, según una realización de la invención.

La Figura 2A ilustra una muestra representativa de una porción o subconjunto de restricciones o microestructuras 30 dentro del dispositivo microfluídico 10. Las cámaras 60 están encerradas por paredes 70. Las paredes 70 incluyen salidas de ventilación 100. En algunas realizaciones, las cámaras 60 pueden definirse, encerrarse, o encerrarse parcialmente por paredes 70. Las paredes 70 pueden construirse utilizando métodos de litografía suave y pueden estar hechas de PDMS. Las paredes 70 pueden construirse utilizando otros métodos o con otros materiales. Algunas de las paredes 70 pueden ser contiguas. Algunas de las paredes 70 incluyen salidas de ventilación 100. En algunas realizaciones de la invención, cada cámara 60 puede incluir dos salidas de ventilación 100. En algunas realizaciones de la invención, cada cámara 60 puede incluir más de dos salidas de ventilación 100.

Las salidas de ventilación 100 pueden configurarse para permitir la comunicación de fluidos entre las cámaras 60 y uno o múltiples canales secundarios 80. La comunicación de fluidos puede permitir la evacuación de aire u otro fluido, una impureza u otro reactivo de las cámaras 60. Las salidas de ventilación 100 pueden configurarse para ser sellables o limitar la evacuación o escape de un fluido de muestra de la cámara 60. Las salidas de ventilación 100 pueden configurarse de modo que el aire pueda fluir a través de la salida de ventilación 100, pero se impide que un fluido de muestra pase a través de la salida de ventilación 100. En algunas realizaciones de la invención, un tamaño de salida de ventilación más pequeño provee un rango de presión más amplio, por ejemplo, en una etapa de cizallamiento según se describe, por ejemplo, más abajo.

Las cámaras 60 se bifurcan del canal principal 90. Las cámaras 60 se configuran de modo que miran a otras cámaras 60 a lo largo del canal principal 90. En algunas realizaciones de la invención, las cámaras 60 pueden configurarse de modo que se encuentran escalonadas a lo largo del canal principal 90. Las cámaras 60 pueden

configurarse de modo que no haya otras cámaras 60 a lo largo del canal principal 90. Las cámaras 60 se pueden configurar de modo que haya un número igual, mayor o menor de cámaras 60 a lo largo del canal principal 90.

5 El canal principal 90 puede disponerse en bucle, serpentear o de otra manera curvarse dentro del dispositivo microfluídico 10. En algunas realizaciones de la invención, el canal principal 90 puede desplazarse en un solo trayecto recto, línea o dirección.

Según la invención, las cámaras 60 se fabrican de modo que el área de la cámara se parece a un rectángulo.

10 En algunas realizaciones de la invención, las cámaras 60 pueden fabricarse de modo que los canales laterales 80 se encuentran en un lado opuesto al lado de las cámaras 60 que mira al canal principal 90. Las cámaras 60 pueden indexarse o etiquetarse. En algunas realizaciones de la invención, las cámaras 60 pueden no estar indexadas. Más de una cámara 60 puede compartir un número de identificación de indexación o designación.

15 En algunas realizaciones de la invención, los canales laterales 80 pueden configurarse para permitir que el aire abandone o se evacúe de una o múltiples cámaras 60 hacia los canales laterales 80 mediante las salidas de ventilación 100. El canal lateral 80 puede conectarse a las cámaras 60 mediante una o múltiples salidas de ventilación 100 en las paredes 70. Las salidas de ventilación 100 pueden permitir que aire o materia extraña indeseable, u otro contaminante, abandone las cámaras 60 cuando un fluido de muestra en la forma de fluido de muestra 110 se introduce en las cámaras 60. Por consiguiente, las salidas de ventilación 100 pueden facilitar la entrada de fluido de muestra en las cámaras 60. De esta manera, el canal lateral 80 funciona como un canal de evacuación, según se describe más arriba.

20 La Figura 2B representa una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención.

La Figura 2B representa una etapa en la carga del dispositivo microfluídico 10. El fluido de muestra 110, por ejemplo, un analito (u otro fluido), se introduce en el dispositivo microfluídico 10 y en el canal principal 90. En algunas realizaciones de la invención, el fluido de muestra 110 puede cargarse o de otra manera introducirse en el canal principal 90. El fluido de muestra 110 puede introducirse en el canal principal 90 mediante entradas. El fluido de muestra 110 puede introducirse en otros canales o mediante otras entradas o puertos, p. ej., un puerto o abertura en una cubierta.

30 Se provoca que el fluido de muestra 110 fluya a través del canal principal 90 y hacia las cámaras 60 como se representa por las flechas 115. En algunas realizaciones de la invención, el fluido de muestra 110 puede fluir en direcciones adicionales. La muestra 110, mientras fluye o de otra manera pasa a través del canal principal 90, puede también entrar en múltiples cámaras 60 u otras microestructuras 30, o un subconjunto de microestructuras 30 dentro del dispositivo microfluídico 10. El canal principal 90, los canales secundarios 80, las salidas de ventilación 100 o las cámaras 60 pueden llenarse de aire (u otro fluido) antes de la introducción de la muestra 110. El fluido de muestra 110 puede desplazar el aire presente en el dispositivo microfluídico 10, en las cámaras 60, u otros componentes del dispositivo microfluídico 10. El aire desplazado puede abandonar las cámaras 60, u otras microestructuras 30 de conexión, mediante las salidas de ventilación 100.

35 En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico 10 puede usarse para generar una matriz de gotas de muestra con concentraciones químicas variables. Dicha concentración química variable a lo largo del dispositivo microfluídico puede lograrse cuando una etapa de carga de fluido adicional se lleva a cabo antes de una etapa de cizallamiento, la etapa de cizallamiento descrita, por ejemplo, más abajo.

40 En algunas realizaciones de la invención, los canales secundarios 80 pueden configurarse para permitir que el aire escape del dispositivo microfluídico. Cuando se añaden múltiples fluidos al dispositivo, los canales secundarios pueden permitir el escape de aire u otros gases.

45 En algunas realizaciones de la invención, una entrada del dispositivo microfluídico puede tener una altura de profundidad de, p. ej., 1 mm - 6 mm, en algunos ejemplos, 4 mm. (Por ejemplo, la profundidad de la entrada puede ser aproximadamente igual a un grosor del dispositivo microfluídico.) La presión del fluido en dicha entrada puede provocar un flujo de líquido de un lado del dispositivo microfluídico a otro lado, en una manera controlada, la manera controlada estando determinada por la profundidad de la entrada y un retardo debido a la mezcla de los fluidos.

50 En algunas realizaciones de la invención, un segundo fluido o fluido subsiguiente puede introducirse en una entrada, por ejemplo, como se describe más arriba. El segundo fluido o fluido subsiguiente puede introducirse en una entrada mediante una pipeta u otro dispositivo. El segundo fluido o fluido subsiguiente puede empujarse hacia el dispositivo microfluídico 10 mediante el uso de presión de aire, o se puede tirar de aquel hacia el dispositivo mediante aplicación de un vacío a una salida. La presión de aire o vacío puede crearse por un bulbo de pipeta u otros dispositivos o fuentes.

En algunas realizaciones de la invención, las cámaras 60 que son más cercanas en proximidad a la entrada pueden tener una concentración más alta del segundo fluido y/o fluido de muestra 110 en comparación con las cámaras más alejadas de la entrada, lo cual resulta en una matriz de gotas en un gradiente químico a través de las cámaras del dispositivo microfluídico 10.

El gradiente químico puede reflejarse en concentraciones de componentes del fluido que se captura en cada una de las cámaras 60 después del cizallamiento, como se describe, por ejemplo, más abajo.

En algunas realizaciones de la invención, un gradiente puede generarse mediante la inyección de dos fluidos diferentes. Un primer fluido puede inyectarse desde una primera entrada y un segundo fluido puede inyectarse hacia el dispositivo microfluídico mediante una salida (o segunda entrada). El primer fluido y el segundo fluido pueden encontrarse en una interfaz en un punto a lo largo del canal principal 90, p. ej., cerca de un punto medio, donde los dos fluidos se encuentran. La concentración del primer y segundo fluidos puede estar relacionada con el límite superior y límite inferior de las concentraciones de los fluidos mezclados.

Fuerzas de convección pueden mezclar el primer y segundo fluidos en la interfaz entre el primer y segundo fluidos. Una longitud de un período durante el cual las fuerzas de convección mezclan el primer y segundo fluidos puede determinar la diferencia de concentración entre gotas adyacentes que resultan de un cizallamiento de los fluidos.

La Figura 2C representa una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico según una realización de la invención.

La Figura 2C representa una etapa de cizallamiento en la carga del dispositivo microfluídico 10. El fluido de muestra 110 se cizalla por la introducción de un flujo de cizallamiento, en algunas realizaciones de la invención, mediante un fluido de cizallamiento 120. La dirección del fluido de cizallamiento 120 se representa por las flechas 130. En algunas realizaciones de la invención, el fluido de cizallamiento puede ser un fluido combinado con fuerzas de cizallamiento, p. ej., aire empujado a través del dispositivo microfluídico 10. En algunas realizaciones, el aire puede introducirse o empujarse a través del dispositivo microfluídico mediante un bulbo, pipeta u otro dispositivo. La fuerza de cizallamiento del fluido de cizallamiento 120 puede expulsar el fluido de muestra 110 fuera de los canales, incluido el canal principal 90. Por consiguiente, la fuerza de cizallamiento del fluido de cizallamiento 120 puede separar el fluido de muestra 110 en gotas individuales del fluido de muestra 110 en cámaras 60 separadas. La dirección de flujo del fluido de cizallamiento 120 se representa por las flechas 130. El fluido de cizallamiento 120 puede fluir en direcciones adicionales.

La Figura 2D representa una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico según una realización de la invención.

La Figura 2D representa la carga de sellador de fluidos 140, p. ej., un fluido hidrofóbico como, por ejemplo, un aceite, en el dispositivo microfluídico 10. Las flechas 150 representan el flujo del sellador de fluidos 140 a través de canales en el dispositivo microfluídico 10. En algunas realizaciones, pueden añadirse reactivos adicionales al dispositivo microfluídico 10 con anterioridad a la presente etapa de carga de sellador de fluidos 140.

En algunas realizaciones de la invención, el sellador de fluidos 140 puede incluir aceite de fluorocarbono (p. ej., el fluido electrónico 3M™ Fluorinert™ FC-40). El sellador de fluidos 140 puede incluir otros reactivos. En algunas realizaciones de la invención, el sellador de fluidos 140 se configura para sellar y/o llenar espacios vacíos en las microestructuras 30 del dispositivo microfluídico 10. El sellador de fluidos 140 puede configurarse para tener una funcionalidad adicional. Por ejemplo, el sellador de fluidos 140 (p. ej., que incluye Fluorinert™ FC-40) puede configurarse para permitir la entrega de oxígeno a células vivas que se incluyen dentro del fluido de muestra 110 que está atrapado dentro de las cámaras 60. (Por ejemplo, una electronegatividad alta de flúor en FC-40 puede permitir una alta solubilidad de oxígeno en el sellador de fluidos 140). Las flechas 150 representan el flujo del sellador de fluidos 140 a través de canales en el dispositivo microfluídico 10. El sellador de fluidos 140 puede fluir en direcciones adicionales.

Un aceite de fluorocarbono, por ejemplo, FC-40 o HFE-7500, puede contener perfluorocarbonos (PFC). El número de átomos de carbono en una molécula de fluorocarbono puede ayudar a determinar la mayoría de las propiedades físicas de dicho fluorocarbono. El aceite de fluorocarbono puede elegirse según las propiedades físicas deseadas.

Los fluorocarbonos u otros compuestos de organofluorados que contienen solo carbono y flúor pueden emplearse como sellador de fluidos 140. En algunas realizaciones, el sellador de fluidos 140 puede incluir carbono y flúor unidos en fuertes enlaces carbono-flúor; los enlaces pueden ser enlaces simples, dobles o triples, el número de enlaces relacionándose con la estabilidad y reactividad del fluorocarbono.

Los aceites de fluorocarbono pueden contener moléculas que técnicamente no son fluorocarbonos, pero a las que se puede hacer referencia comúnmente como fluorocarbonos. Los fluorocarbonos pueden tener densidades

altas, en algunas realizaciones hasta más del doble de la del agua. Dicha densidad alta puede deberse a su alto peso molecular.

Los aceites de fluorocarbono pueden tener fuerzas intermoleculares bajas. Las fuerzas intermoleculares bajas pueden proveer viscosidades relativamente bajas cuando se comparan con líquidos de similar punto de ebullición. Los aceites de fluorocarbono pueden tener tensión superficial relativamente baja, entalpías de vaporización relativamente bajas e índices de refracción relativamente bajos. Los aceites de fluorocarbono pueden no ser miscibles con la mayoría de disolventes orgánicos, pero son miscibles con algunos hidrocarburos. Los aceites de fluorocarbono pueden tener muy baja solubilidad en agua, y el agua puede tener una muy baja solubilidad en ellos.

La Figura 2E representa una ilustración esquemática de una etapa en la carga de un dispositivo microfluídico según una realización de la invención.

La Figura 2E representa una etapa en la carga del dispositivo microfluídico 10. Después de la carga del sellador de fluidos 140, el sellador de fluidos 140 se convierte en disperso a lo largo de los canales, microestructuras 30 y cámaras 60. En algunas realizaciones de la invención, el sellador de fluidos 140 se convierte en disperso a lo largo de un subconjunto de estructuras, como se describe, por ejemplo, más arriba, del dispositivo microfluídico 10. En algunas realizaciones de la invención, las salidas de ventilación 100 se llenan de sellador de fluidos 140.

En algunas realizaciones de la invención, el sellador de fluidos 140 puede configurarse para sellar la salida de las cámaras 60 de modo que el fluido de muestra 110 u otros fluidos previstos para retenerse en las cámaras 60 se retienen y aíslan. El fluido de muestra 110 aislado puede tener una oportunidad limitada de mezclarse con o interactuar con reactivos, u otros fluidos, en el entorno fuera de las cámaras 60 dentro del dispositivo microfluídico 10, dentro del entorno externo (ambiente). El fluido de muestra 110 aislado puede aislarse en las cámaras 60 en donde las cámaras 60 y salidas de ventilación 100 se sellan, o de otra manera se tapan total o parcialmente, por el sellador de fluidos 140.

Una vez que el canal principal 90, canal secundario 80, microestructuras 30 o un subconjunto de microestructuras 30, o salidas de ventilación 100 se hayan llenado de sellador de fluidos 140, el fluido de muestra 110 puede restringirse o mayormente limitarse a las cámaras 60. Poco a nada de aire puede permanecer dentro del dispositivo microfluídico 10.

La Figura 3A es una ilustración esquemática del uso de una pipeta para cargar el dispositivo microfluídico según una realización de la invención.

El dispositivo microfluídico 10 se carga con fluido de muestra 110 mediante el uso de una pipeta 160. El dispositivo microfluídico 10 se puede cargar con fluido de muestra 110 mediante el uso de otros dispositivos.

El fluido de muestra 110 se carga en el dispositivo microfluídico 10 en una entrada 180. Por ejemplo, la entrada 180 puede representar un puerto o abertura en la cubierta 22 (Figura 6B) que permite el acceso a la entrada principal 50.

Una diferencia de presión (p. ej., entre una entrada y una salida) que se aplica al fluido de muestra 110 puede seleccionarse según la tensión superficial del fluido de muestra 110, y según las propiedades de las superficies que el fluido de muestra 110 contacta dentro del dispositivo microfluídico 10. En algunas realizaciones, la presión del fluido de muestra 110 a medida que se introduce en el dispositivo microfluídico es de entre 1,8 kilopascales (kPa) y 2,2 kPa, p. ej., 2 kPa. En algunas realizaciones, la presión del fluido de muestra 110 a medida que se introduce en el dispositivo microfluídico puede ser superior a 2,2 kPa. En algunas realizaciones, la presión del fluido de muestra 110 a medida que se introduce en el dispositivo microfluídico puede ser inferior a 1,8 kPa. Para algunas condiciones de tensión superficial y propiedades de superficie, la diferencia de presión entre entrada y salida puede encontrarse en el rango de alrededor de 2 kPa a alrededor de 4 kPa.

La Figura 3B es una ilustración esquemática del uso de una pipeta para cizallar una muestra cargada en un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención.

El fluido de muestra 110 en el dispositivo microfluídico 10 puede cizallarse por la fuerza de aire introducido en el dispositivo microfluídico. El aire puede introducirse en la entrada 180 mediante el uso de la pipeta 160. En algunas realizaciones de la invención, los fluidos de cizallamiento, incluidos, aire u otros propelentes, pueden utilizarse para cizallar la muestra 110. En algunas realizaciones, la fuerza del aire introducido a medida que se introduce en el dispositivo microfluídico es de entre 1,8 kPa y 2,2 kPa, p. ej., 2 kPa. En algunas realizaciones, la presión del aire que se introduce en el dispositivo microfluídico puede ser superior a 2,2 kPa. En algunas realizaciones, la presión del aire a medida que se introduce en el dispositivo microfluídico puede ser inferior a 1,8 kPa. Para algunas condiciones de tensión superficial y propiedades de superficie, la diferencia de presión entre entrada y salida puede encontrarse en el rango de alrededor de 2 kPa a alrededor de 4 kPa.

Mientras el aire se usa para cizallar la muestra 110, un dispositivo con esponja 170, p. ej., papel de filtro u otro material u objeto absorbente, puede utilizarse para extraer o absorber fluido expulsado o adicional del dispositivo microfluídico 10. El dispositivo con esponja se posiciona en un puerto de salida 190. El puerto de salida 190 puede representar un puerto o abertura en la cubierta 22 (Figura 6B). El puerto de salida 190 puede tener una forma circular u otra forma. La forma del puerto de salida 190 puede configurarse para facilitar la limpieza con esponja de líquido residual en el puerto de salida 190.

El dispositivo con esponja 170 puede incluir papel Whatman, u otro papel absorbente que pueda ser de superficie granuda, fuerte o rígido. El papel Whatman, u otros materiales absorbentes, puede cortarse en pequeñas cintas para coincidir con el diámetro del puerto de salida 190.

La Figura 3C es una ilustración esquemática del uso de una pipeta para introducir un sellador de fluidos en un dispositivo microfluídico según una realización de la invención.

La pipeta 160 se utiliza para introducir sellador de fluidos en el dispositivo microfluídico 10. El sellador de fluidos puede introducirse en varios canales en el dispositivo microfluídico 10 mediante uno o múltiples puertos. Los puertos pueden incluir la entrada 180. Los puertos pueden también incluir una o múltiples entradas laterales 195. Por ejemplo, la entrada 180 puede representar un puerto o abertura en una cubierta para permitir el acceso a la entrada principal 50, puede representar la entrada principal 50, o puede ser distinta de la entrada principal 50. Entradas laterales 195 pueden representar puertos o aberturas en una cubierta para permitir el acceso a entradas secundarias 40, pueden representar entradas secundarias 40, o pueden ser distintas de las entradas secundarias 40. En algunas realizaciones de la invención, otros dispositivos o técnicas pueden utilizarse para introducir sellador de fluidos en el dispositivo microfluídico 10.

La Figura 3C además representa una vista ampliada de una sección del dispositivo microfluídico 10. Un sellador de fluidos 140, como se describe más arriba, se configura para llenar el canal principal 90 y mantener o aislar muestras 110 o muestras cizalladas 110 en las cámaras 60. Las cámaras 60 tienen paredes 70. Las salidas de ventilación 100 se ubican entre, se sitúan dentro, o en otra relación con respecto a las paredes 70. Las cámaras 60 se indexan, incluido, en algunas realizaciones, un índice alfanumérico o simbólico 185.

En algunas realizaciones de la invención, las paredes 70 pueden ser discretas y no conectarse a paredes vecinas. En dicho caso, espacios entre las paredes 70 pueden funcionar como salidas de ventilación 100. Las cámaras pueden no indexarse. Las cámaras pueden indexarse mediante el uso de una variedad de métodos de indexación.

La Figura 4 es una ilustración esquemática de un método para introducir en y manipular una muestra en un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención.

Un dispositivo microfluídico puede prepararse para su uso. Los usos pueden incluir, pero sin limitación, visualización o análisis de señalización e interacciones de célula a célula; visualización o análisis de respuestas de tiempo celular de una célula individual a estimulaciones químicas y respuestas de dosis; visualización o análisis de resistencia al esfuerzo de las bacterias, cribado contra múltiples fármacos antibióticos en patrones; visualización o análisis de investigaciones de células individuales procariotas en entornos altamente aislados; visualización o análisis de captación y excreción celular; conducción, visualización o análisis de pruebas rápidas de susceptibilidad antibiótica contra diferentes especies de patógenos; visualización o análisis de ensayos de secreción de células individuales monitoreados durante largos períodos de incubación; conducción, visualización o análisis de PCR de una sola molécula (por dilución, de modo que cada gota contiene una sola molécula de ADN); conducción, visualización o análisis de RT-PCR llevada a cabo en una sola célula, inmunoensayos; u otros usos.

Según se representa como bloque 200, un dispositivo microfluídico se sella por la fijación de un sustrato a un lado del dispositivo opuesto a la cubierta. En algunas realizaciones de la invención, el sustrato puede fijarse de manera reversible o irreversible. Un sustrato puede incluir vidrio, polilisina, vidrio tratado con poli-L-lisina, una placa para cultivo tisular, una placa para cultivo no tisular (poliestireno), PDMS, una placa de Petri, un portaobjetos para microscopio, u otro sustrato. Un sustrato puede recubrirse con un material para promover o inhibir la adhesión de un analito o componente de analito, o para promover o inhibir el crecimiento celular.

En algunas realizaciones de la invención, en la fijación del sustrato, el dispositivo microfluídico puede colocarse sobre la superficie de modo que no queden burbujas de aire atrapadas entre el dispositivo microfluídico y el sustrato. En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico, p. ej., una superficie del dispositivo microfluídico en donde las estructuras del dispositivo microfluídico se exponen al aire, puede limpiarse. En algunas realizaciones, la superficie puede limpiarse con una cinta u otras sustancias.

Según se representa por el bloque 210, un dispositivo microfluídico puede cargarse con un fluido, por ejemplo, con un analito o fluido de muestra, uno o múltiples reactivos, un propelente, u otro fluido.

En algunas realizaciones de la invención, una entrada principal o entrada secundaria adicional puede usarse como un puerto de acceso para cargar fluidos. Por ejemplo, el puerto puede incluir una abertura en una cubierta del dispositivo microfluídico. Una pipeta puede utilizarse para introducir los fluidos en el puerto de acceso. En algunas realizaciones, una vez que el fluido se haya cargado al puerto de acceso, un dispositivo, p. ej., un bulbo de una pipeta, puede usarse para empujar el fluido a través de las estructuras del dispositivo microfluídico apretando suavemente el bulbo hasta que el fluido se haya cargado. En algunas realizaciones, el fluido puede cargarse totalmente una vez que alcanza un puerto de salida. El fluido en exceso puede limpiarse mediante el uso de, por ejemplo, papel de filtro como, por ejemplo, el papel de filtro Whatman. La presente etapa puede repetirse con otros fluidos.

La caja 220 representa una etapa de cizallamiento del fluido introducido en la etapa representada por el bloque 210. En algunas realizaciones, un bulbo de una pipeta u otro dispositivo puede usarse para inyectar aire en un canal a través de un puerto de acceso en el dispositivo microfluídico. La inyección del aire (u otro fluido) puede resultar en la extracción del fluido introducido en el dispositivo microfluídico de los canales del dispositivo y, por consiguiente, en la separación del analito o fluido de muestra en gotas separadas. Un papel de filtro u otro dispositivo absorbente puede utilizarse para absorber cualquier fluido que salga en un puerto de salida. El uso del papel de filtro para limpiar o absorber el fluido que sale puede evitar o inhibir la retracción hacia atrás de líquidos hacia o dentro del dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, todo fluido en exceso o que sale puede absorberse en preparación para una siguiente etapa.

La caja 230 representa una etapa de carga de un sellador de fluidos, p. ej., un fluido hidrofóbico como, por ejemplo, un aceite. En algunas realizaciones de la invención, un aceite de fluorocarbono puede cargarse en el dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones, el aceite puede cargarse en una entrada que lleva a un canal principal en el dispositivo microfluídico. El aceite puede cargarse en entradas adicionales, por ejemplo, en los lados del dispositivo microfluídico para introducir el aceite en uno o múltiples canales laterales. Las aberturas o entradas pueden sellarse después de que el sellador de fluidos se haya cargado, o en cualquier otro momento durante un proceso de carga.

En algunas realizaciones, las fuerzas capilares pueden llevar el aceite insertado hacia los canales principal y lateral, además de otros espacios dentro de las estructuras del dispositivo microfluídico.

La caja 240 representa una etapa en donde puede analizarse el fluido o componentes del fluido dentro del dispositivo microfluídico. Por ejemplo, puede llevarse a cabo un análisis a través de un sustrato (p. ej., examen microscópico) o después de la extracción del sustrato.

La Figura 5 es una ilustración esquemática de un método para emplear un dispositivo microfluídico según una realización de la invención.

Un sustrato puede fijarse al dispositivo microfluídico con anterioridad a su uso. En algunas realizaciones, el sustrato puede fijarse en preparación para la introducción de fluidos, incluidos, por ejemplo, muestras o aceites, en el dispositivo microfluídico. La fijación del sustrato puede ser reversible. La fijación reversible puede permitir el acceso a o la extracción de una muestra de una cámara del dispositivo microfluídico.

La caja 310 representa la carga de al menos un fluido en el dispositivo microfluídico. El fluido cargado puede ser un fluido de muestra o un fluido de muestra que contiene analitos. En algunas realizaciones, el fluido se introduce a través de un puerto en un canal principal del dispositivo microfluídico. En algunas realizaciones de la invención, los fluidos pueden introducirse en el dispositivo microfluídico mediante uno o múltiples canales.

La caja 320 representa el uso de un flujo de cizallamiento. En algunas realizaciones de la invención, el flujo de cizallamiento puede evacuar el canal principal en el dispositivo microfluídico. El cizallamiento puede lograrse introduciendo un fluido de cizallamiento (normalmente, un gas) que aplica una fuerza de cizallamiento sobre el fluido que se ha cargado previamente en el dispositivo microfluídico. El cizallamiento puede resultar en que el fluido de muestra se divide o se distribuye en gotas del fluido de muestra.

En algunas realizaciones, la introducción de fluidos antes del cizallamiento puede resultar en un gradiente de concentración de las gotas resultantes después del cizallamiento. En algunas realizaciones, el dispositivo microfluídico y la muestra u otros fluidos pueden configurarse para proveer una concentración particular de muestra en cada una de las múltiples cámaras en el dispositivo microfluídico. Una gota de fluido de muestra puede retenerse o estabilizarse en una cámara por una o múltiples características de diseño. Características o factores de diseño estabilizantes incluyen la geometría de la cámara (p. ej., la forma rectangular de la cámara), una composición, textura, u otra característica de una superficie de la cámara, u otros factores. Los factores pueden llevar a la minimización de energía superficial de las gotas o de la composición material (p. ej., de PDMS) del dispositivo o de una porción de él, p. ej., de las cámaras. La tensión superficial de líquido o tensión interfacial líquido-dispositivo puede llevar a la estabilización de las gotas dentro de las cámaras.

En algunas realizaciones de la invención, las propiedades de una entrada mediante la cual un fluido de muestra puede introducirse en el dispositivo microfluídico pueden facilitar la creación de un gradiente de concentración a lo largo del dispositivo. Las propiedades de la entrada pueden incluir una geometría de la entrada, una profundidad de la entrada, un diámetro de la entrada, una circunferencia de la entrada, u otros factores relacionados con la entrada.

En algunas realizaciones de la invención, la tensión interfacial de la cámara y, en algunos ejemplos, PDMS y/u otros materiales en la composición de la cámara, puede proveer o puede facilitar la estabilización o retención de una muestra dentro de la cámara. En algunos ejemplos, dicha estabilización puede ocurrir antes del cizallamiento de la muestra.

La caja 330 representa la introducción de un fluido hidrofóbico que funciona como un sellador de fluidos. En algunas realizaciones de la invención, el fluido hidrofóbico puede ser un aceite. En algunas realizaciones de la invención, la creación de una fase inmiscible entre el fluido hidrofóbico y el fluido de muestra se configura para crear volúmenes discretos aislados del fluido de muestra dentro del dispositivo microfluídico. Los volúmenes aislados pueden permitir la aplicación de microfluidos discretos o digitales, o la creación de microrreactores discretos que contienen la muestra. El fluido hidrofóbico puede configurarse para empujar la muestra hacia las cámaras y para sellar cualquier espacio vacío o hueco entre las cámaras.

La Figura 6A representa una vista esquemática de una cámara individual, según una realización de la invención. En algunas realizaciones, la estructura y geometría de una cámara 60 dentro de un dispositivo microfluídico 10, como se representa en la presente memoria en la ampliación, pueden facilitar la generación de gotas de un fluido de muestra directamente dentro de una o múltiples cámaras 60.

Un proceso de formación de una gota dentro de la cámara 60 puede ejecutarse en dos etapas. En algunas realizaciones, el proceso de generación de una gota dentro de la cámara 60 puede ejecutarse en una etapa. En algunas realizaciones de la invención, el proceso de generación de una gota dentro de la cámara 60 puede ejecutarse en más de dos etapas.

Inicialmente, un fluido, p. ej., un fluido de muestra como se describe más arriba, puede inyectarse por presión en un canal principal y cámaras 60 a través de una entrada. El método de inyección, y el canal y las cámaras, pueden ser, por ejemplo, como se describe más arriba.

Las salidas de ventilación 100 dentro de la cámara 60 pueden permitir que el aire salga de las cámaras 60 y, en algunos ejemplos, del dispositivo microfluídico 10, a través de otro canal, p. ej., el canal secundario o canal de evacuación según se describe más arriba.

Las salidas de ventilación 100 pueden también actuar como una barrera de tensión superficial que puede evitar que un fluido fluya más hacia el canal secundario.

Una segunda etapa durante la generación de la gota puede implicar el cizallamiento del fluido continuo en gotas separadas, por ejemplo, como se describe más arriba.

En algunas realizaciones de la invención, gotas estacionarias estabilizadas pueden rodearse de aire y paredes de la cámara 60, las paredes 70 por ejemplo, como se describe más arriba. Después del cizallamiento, las gotas del fluido de muestra pueden revestirse con aceite, p. ej., el aceite de fluorocarbono descrito más arriba, o con otro sellador de fluidos. El revestimiento de las gotas con aceite de fluorocarbono puede limitar la rápida evaporación de las gotas cizalladas dentro de las cámaras.

El sellador de fluidos puede inyectarse en el dispositivo microfluídico 10 desde una entrada. En algunas realizaciones de la invención, el sellador de fluidos puede inyectarse o de otra manera proveerse al dispositivo microfluídico 10 desde más de una entrada. En algunos ejemplos, el sellador de fluidos puede inyectarse en el dispositivo microfluídico 10 mediante tres entradas. Las tres entradas pueden incluir una entrada al canal principal y una entrada a cada uno de al menos dos canales secundarios.

El sellador de fluidos puede fluir mediante fuerza capilar y rodear las gotas en las cámaras 60 sin formar burbujas de aire atrapadas. Los materiales que comprenden el dispositivo microfluídico 10, p. ej., PDMS, pueden facilitar el flujo mediante fuerza capilar del sellador de fluidos a través del dispositivo microfluídico.

En algunas realizaciones de la invención, la etapa de cizallamiento puede depender de consideraciones de minimización de energía superficial. Por ejemplo, la energía superficial puede describirse por:

$$E = \gamma_{LG} \cdot S_{LG} + \gamma_{SL} \cdot S_{SL},$$

donde E representa la energía de un sistema; γ_{LG} representa la tensión superficial líquido-aire; γ_{SL} representa la tensión interfacial de líquido superficial; S_{LG} es un valor que representa el área en donde el fluido está en

contacto con el aire; y S_{SL} representa el área en donde el fluido está en contacto con un material del cual está hecho el dispositivo microfluídico, p. ej., PDMS.

La energía requerida para separar una gota sésil de electrohúmedación sobre dieléctricos (EWOD, por sus siglas en inglés) puede reducirse cuando una gota se aprieta entre dos superficies paralelas. En estas instancias, el cambio de energía interfacial del sistema puede representarse por

$$\frac{\Delta E}{E} = \frac{\sqrt{2}-1}{1 + \frac{\gamma_{SL} \alpha}{\gamma_{LG} \delta}},$$

donde α es el radio en el plano de la gota; y δ es la separación de placa paralela.

Para casos donde $\gamma_{LG} \delta \ll \gamma_{SL} \alpha$ la presente expresión se reduce a:

$$\frac{\Delta E}{E} \sim \frac{\gamma_{LG} \delta}{\gamma_{SL} \alpha}.$$

La minimización de una interfaz fluido-aire puede reducir una barrera de energía para el cizallamiento de gota y la eventual separación del fluido cizallado en gotas.

Como se representa en la figura, una cámara 60 dentro del dispositivo microfluídico 10 puede estabilizar una gota de fluido rodeando la gota con cuatro superficies. Las cámaras 60 dentro del dispositivo microfluídico 10 pueden configurarse para proveer una relación fluido-superficie más grande.

Dicha relación fluido-superficie más grande puede favorecer la separación de la gota mediante cizallamiento con respecto al drenaje de la gota como resultado del cizallamiento.

En algunas realizaciones de la invención, para un volumen de gota específico, la geometría de la cámara puede incluir una geometría alargada y plana, por ejemplo, cuando $W \ll L$ y $H \ll L$.

Una cámara alargada y plana puede, en algunos ejemplos, limitar el llenado completo de la cámara con fluido de muestra o gotas. En algunas realizaciones de la invención, una cámara plana puede requerir la aplicación de mayores presiones dentro del proceso de cizallamiento. Dichas presiones más grandes pueden llevar al fallo de las salidas de ventilación en la prevención del escape del fluido o gotas de las cámaras.

En algunas realizaciones de la invención, las dimensiones de la cámara pueden ser como se indica por W, L y H, en donde W puede ser de entre 50 μm y 350 μm , p. ej., 200 μm ; L puede ser de entre 100 μm y 700 μm , p. ej., 400 μm ; y H puede ser de entre 50 μm y 300 μm , p. ej., 120 μm .

En algunas realizaciones de la invención, D, p. ej., el ancho de una salida de ventilación 100, puede ser de 4 μm a 8 μm , p. ej., 6 μm . El ancho en dicho rango puede resultar en la reducción de sensibilidad de la salida de ventilación 100 a la presión de fluido de las etapas de inyección o cizallamiento. Dicha sensibilidad reducida a la presión puede resultar de las características de tensión superficial estática, antes que de las propiedades cinéticas o propiedades de flujo de líquido a granel de los fluidos.

En algunas realizaciones de la invención, D puede configurarse para que sea de entre 4 μm y 8 μm , p. ej., 6 μm , para permitir la carga manual del dispositivo microfluídico 10, por ejemplo, mediante aplicación de presión con un bulbo o una pipeta.

En algunas realizaciones de la invención, la carga del fluido de muestra y el cizallamiento del fluido de muestra pueden llevarse a cabo en una sola etapa. Por ejemplo, mediante el ajuste del volumen de un fluido de muestra que se introduce en el dispositivo microfluídico 10 para coincidir con el volumen de una sola gota multiplicado por el número total de gotas deseadas dentro del dispositivo, el fluido puede segmentarse en el número deseado de cámaras 60.

La Figura 6B es una ilustración esquemática de un recorte de una porción de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención. La Figura 6C es una ilustración de una sección transversal esquemática a través de un canal principal de un dispositivo microfluídico, según una realización de la invención.

La Figura 6B representa una sección recortada del dispositivo microfluídico 10. El dispositivo microfluídico 10 incluye un canal principal 90, múltiples cámaras 60, las cámaras 60 ubicadas entre un canal secundario 80 y un canal principal 90.

La Figura 6C representa secciones de extremo del canal principal 90, y la estructura que puede ser visible del canal principal 90.

- 5 Las Figuras 6B y 6C no se han dibujado necesariamente a escala, y los tamaños, posiciones y geometrías relativas de los componentes y artículos en las Figuras 6B y 6C no son necesariamente precisas o coherentes entre sí o con respecto a otras de las figuras.

10 Las cámaras 60 están parcialmente limitadas por paredes 70. Las paredes 70 incluyen múltiples salidas de ventilación 100. Las salidas de ventilación 100 se configuran para permitir el flujo de algunos fluidos por debajo de una viscosidad umbral a través de la salida de ventilación y hacia el canal secundario 80. Las salidas de ventilación 100 pueden configurarse para aislar, contener o de otra manera mantener un fluido de muestra, analito u otro fluido dentro de la cámara 60. El fluido contenido dentro de la cámara 60 puede tener una viscosidad mayor que un umbral de viscosidad predeterminado.

15 La cubierta 22 incluye una entrada 180 en la forma de una abertura en la cubierta 22 que conecta la entrada principal 50 al exterior del dispositivo microfluídico 10. De manera similar, el puerto de salida 190 es en la forma de una abertura que conecta un extremo del canal principal 90 al exterior. El sustrato 15 cubre microestructuras 30 de modo que un contenido de fluido del canal principal 90 o de una cámara 60 puede contactar el sustrato 15 (p. ej., cuando el dispositivo microfluídico se orienta como se muestra, con el sustrato 15 en la parte inferior, de modo que la gravedad ayuda a mantener el contacto entre el fluido y el sustrato 15).

20 Los fluidos dentro del dispositivo microfluídico 10 pueden actuar como fluidos newtonianos en donde cada fluido tiene una viscosidad constante, o su valor recíproco, fluidez, a una temperatura dada. Un fluido (p. ej., aire) con una viscosidad baja puede rápidamente pasar a través de las salidas de ventilación 100 y, por consiguiente, permitir que un fluido de muestra entre libremente en una cámara 60. (La viscosidad del aire es de alrededor de 20 $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$ o menos en temperaturas y presiones ambiente (p. ej., del ambiente) típicas.) Por otro lado, puede evitarse que un fluido (p. ej., un líquido) con tensión superficial relativamente grande pase a través de las salidas de ventilación 100 por la estrechez de las salidas de ventilación 100.

30 En algunas realizaciones de la invención, el fluido de muestra y, en algunos ejemplos, un fluido de muestra que contiene un analito, puede tener una tensión superficial que es mayor que un umbral predeterminado y, por consiguiente, se inhibe o evita su paso a través de las salidas de ventilación 100.

35 En algunas realizaciones de la invención, el dispositivo microfluídico puede configurarse (p. ej., mediante selección de propiedades de superficie de un sustrato 15) de modo que el umbral de tensión superficial para el paso a través de salidas de ventilación 100 sea menor que una tensión superficial del fluido de muestra.

40 Las cámaras 60, canal principal 90, canal secundario 80 y otras microestructuras 30, o componentes adicionales del dispositivo microfluídico 10, pueden sellarse con respecto a un entorno exterior por un sello, por ejemplo, el sustrato 15, como se describe más arriba.

45 En algunas realizaciones de la invención, un dispositivo microfluídico sellado, de manera reversible, con respecto a un entorno exterior puede reciclarse, reutilizarse o de otra manera redestinarse. En algunas realizaciones de la invención, un dispositivo microfluídico que se sella, de manera reversible, con respecto a un entorno exterior puede sellarse de manera reversible de modo que el sello sea hermético al agua. En algunas realizaciones de la invención, un dispositivo microfluídico se sella, de manera reversible, con respecto un entorno exterior de modo que el sello pueda retirarse de manera relativamente fácil del dispositivo microfluídico, y el dispositivo, limpiarse o analizarse. En algunas realizaciones de la invención, un dispositivo microfluídico se sella, de manera reversible, con respecto a un entorno exterior de modo que el sello no pueda retirarse fácilmente del dispositivo microfluídico.

50 Las realizaciones de la presente invención pueden incluir aparatos para llevar a cabo las operaciones descritas en la presente memoria. Dichos aparatos pueden construirse especialmente para los propósitos deseados, o pueden comprender ordenadores o procesadores selectivamente activados o reconfigurados por un programa de ordenador almacenado en los ordenadores. Dichos programas de ordenador pueden almacenarse en un medio de almacenamiento no transitorio legible por procesador o legible por ordenador, cualquier tipo de disco, incluidos discos flexibles, discos ópticos, CD-ROM, discos magneto-ópticos, memorias de solo lectura (ROM, por sus siglas en inglés), memorias de acceso aleatorio (RAM, por sus siglas en inglés), memorias de solo lectura programables eléctricamente (EPROM, por sus siglas en inglés), memorias de solo lectura eléctricamente borrrables y programables (EEPROM, por sus siglas en inglés), tarjetas magnéticas u ópticas, o cualquier otro tipo de medio adecuado para almacenar instrucciones electrónicas. Se apreciará que una variedad de lenguajes de programación puede usarse para implementar las enseñanzas de la invención según se describe en la presente memoria. Las realizaciones de la invención pueden incluir un artículo como, por ejemplo, un medio de almacenamiento no transitorio legible por procesador u ordenador no transitorio como, por ejemplo, una memoria, un disco duro, o una memoria flash USB que codifica, incluye o almacena instrucciones, p. ej.,

instrucciones ejecutables por ordenador, las cuales, cuando se ejecutan por un procesador o controlador, hacen que el procesador o controlador lleve a cabo los métodos descritos en la presente memoria. Las instrucciones pueden hacer que el procesador o controlador ejecute procesos que llevan a cabo los métodos descritos en la presente memoria.

5

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo microfluídico (10), que comprende:

5 una plataforma (20) con una microestructura (30) que incluye un canal principal (90); y

10 múltiples cámaras (60) rectangulares que se abren directamente hacia el canal principal (90) para permitir que un fluido de muestra (110) que se carga en el dispositivo (10) mediante el canal principal (90) fluya hacia dichas múltiples cámaras (60) rectangulares, cada cámara de dichas múltiples cámaras rectangulares teniendo un volumen que es inferior a 100 nanolitros y conectándose por una salida de ventilación (100) a un canal secundario (80) de la microestructura (30), y cada cámara teniendo un ancho constante a lo largo de su longitud desde su abertura al canal principal hasta su salida de ventilación, dicho ancho siendo igual al ancho de dicha abertura, en donde la salida de ventilación (100) comprende múltiples hendiduras, cada hendidura siendo más estrecha que una abertura de la cámara al canal principal entre la cámara (60) y el canal principal (90) y permitiendo que un gas salga de la cámara (60) al canal secundario (80) mientras inhibe el flujo del fluido de muestra (110) de la cámara (60) a través de la salida de ventilación (100) hacia fuera a través de las múltiples hendiduras (100) hacia el canal secundario (80) sin aplicación de una presión que es perceptiblemente mayor que la presión que se aplica para introducir el fluido de muestra en la cámara (60).

20 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la plataforma (20) se forma de manera tal que una cara de la microestructura se cubre por una cubierta que incluye una abertura para permitir el flujo de fluido hacia o fuera del canal principal o del canal secundario mediante la cubierta.

25 3. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde la plataforma (20) se forma de modo tal que una cara de la microestructura se expone y, de esta manera, permite que una fijación no permanente de un sustrato (15) cubra la cara expuesta de la microestructura (30).

30 4. El dispositivo de la reivindicación 3, que además comprende un sustrato (15) que puede fijarse, de manera reversible, a la microestructura.

5. El dispositivo de la reivindicación 3, en donde el sustrato comprende vidrio, plástico o un elastómero.

35 6. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde dichas múltiples cámaras rectangulares comprenden entre 100 y 1000 cámaras.

7. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde un sellador de fluidos (140) introducido en los canales principal (90) y secundario (80) aísla una gota en una cámara de dichas múltiples cámaras rectangulares de una gota en otra cámara de dichas múltiples cámaras.

40 8. El dispositivo de la reivindicación 1, en donde cada una de dichas múltiples cámaras rectangulares incluye una etiqueta.

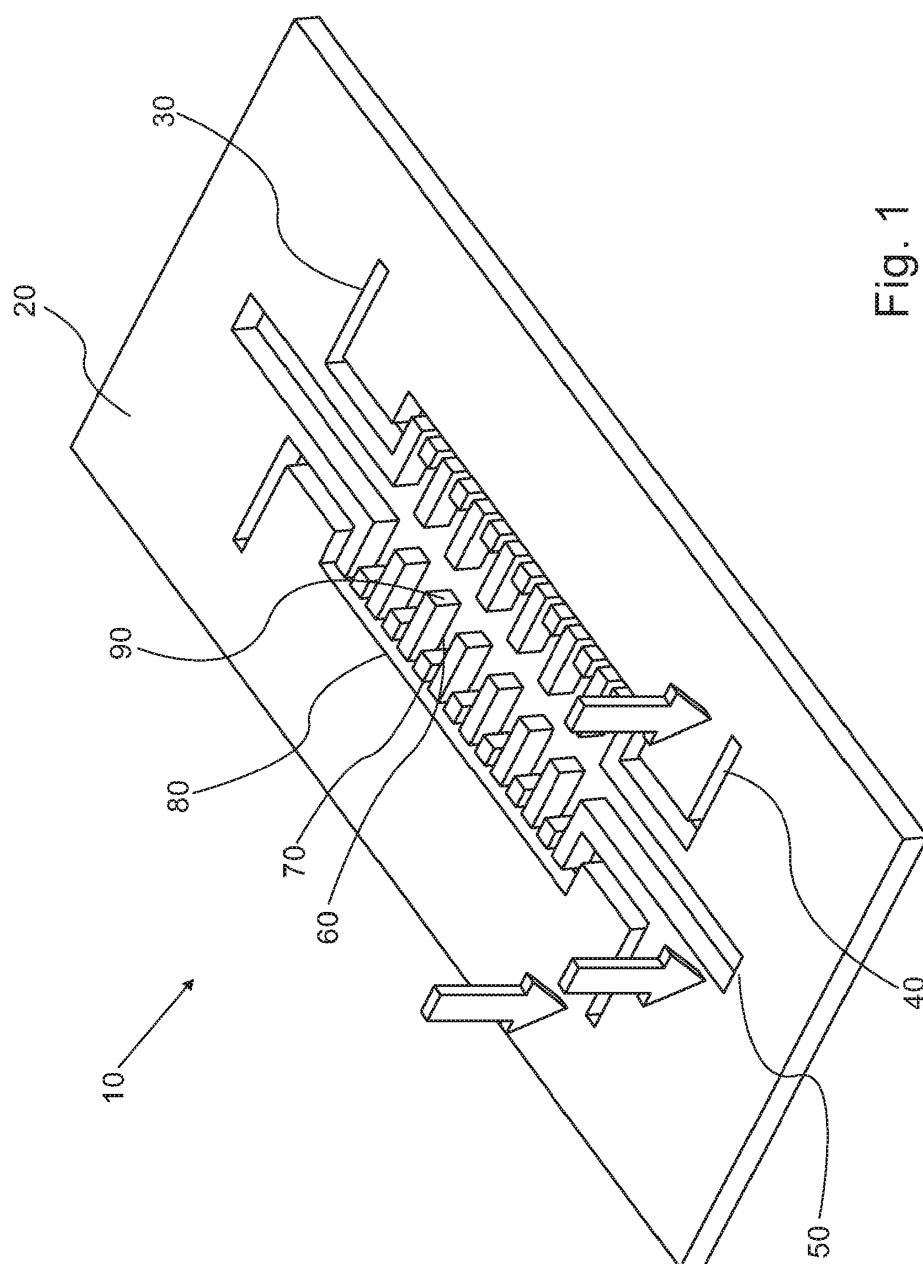


Fig. 1

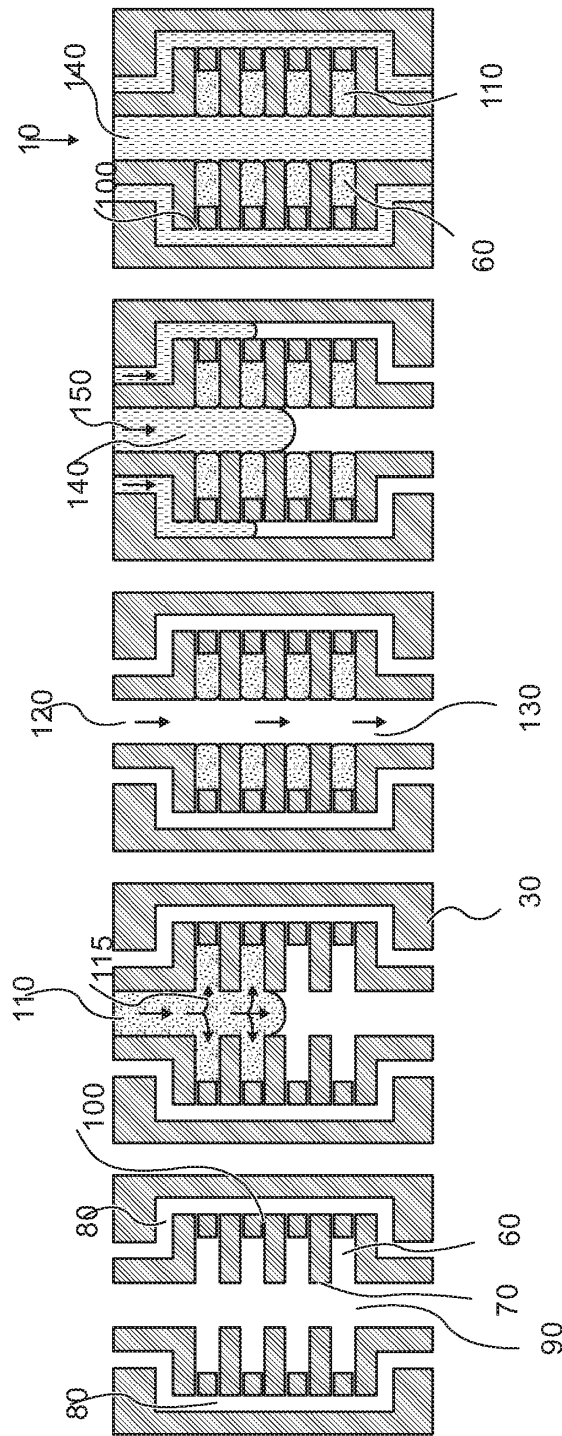


Fig. 2A

Fig. 2B

Fig. 2C

Fig. 2D

Fig. 2E

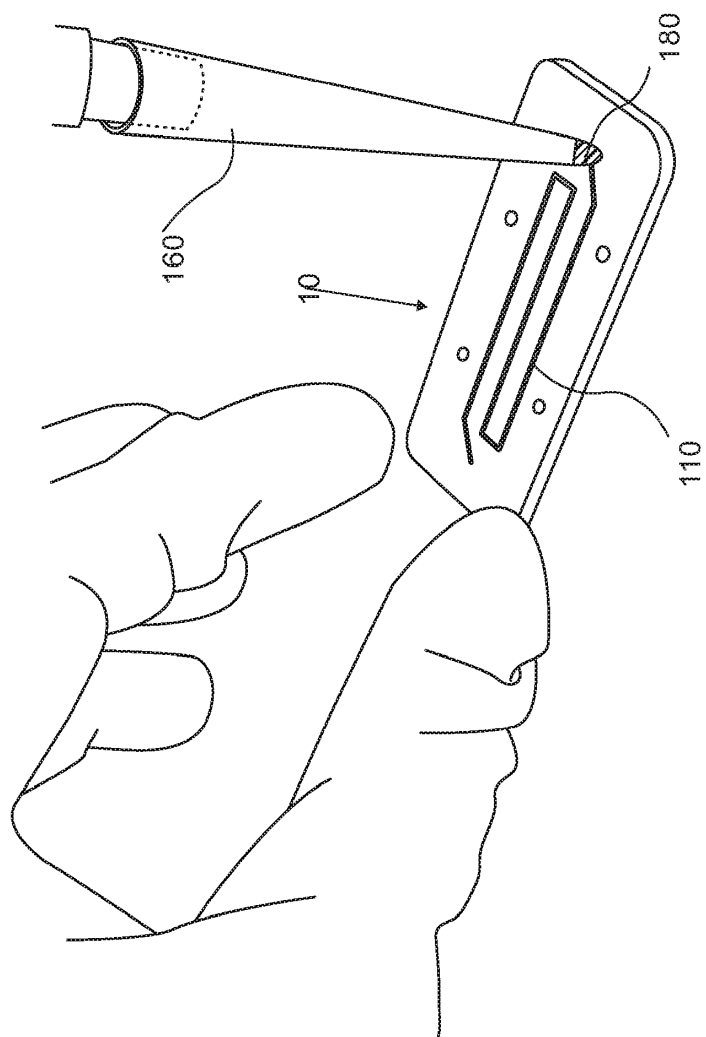


Fig. 3A

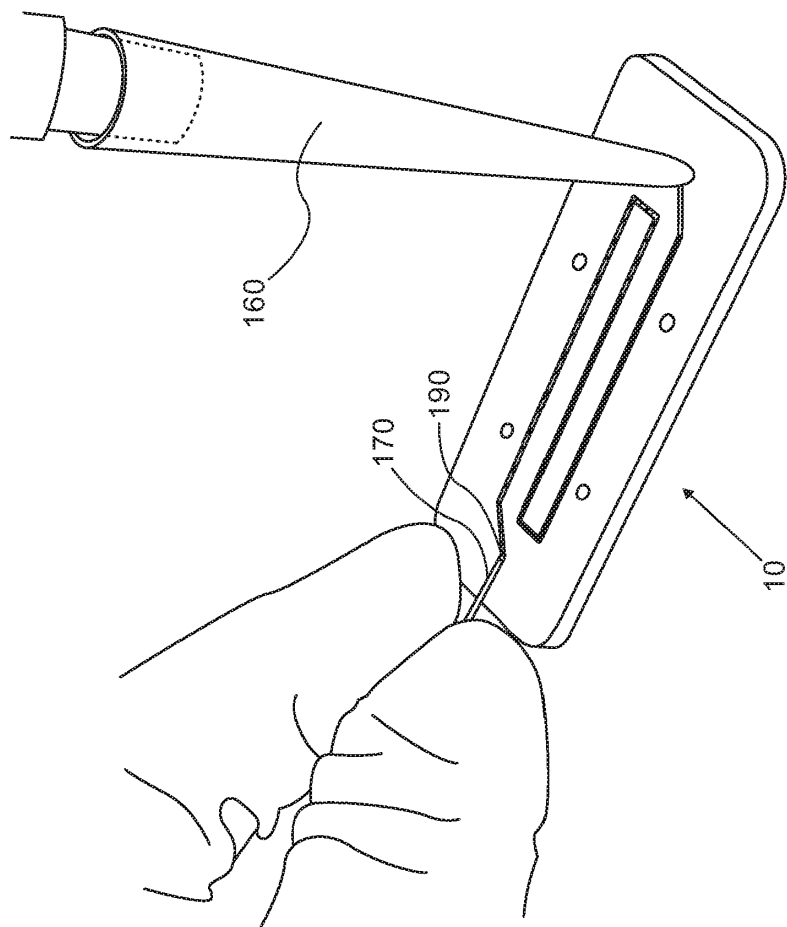


Fig. 3B

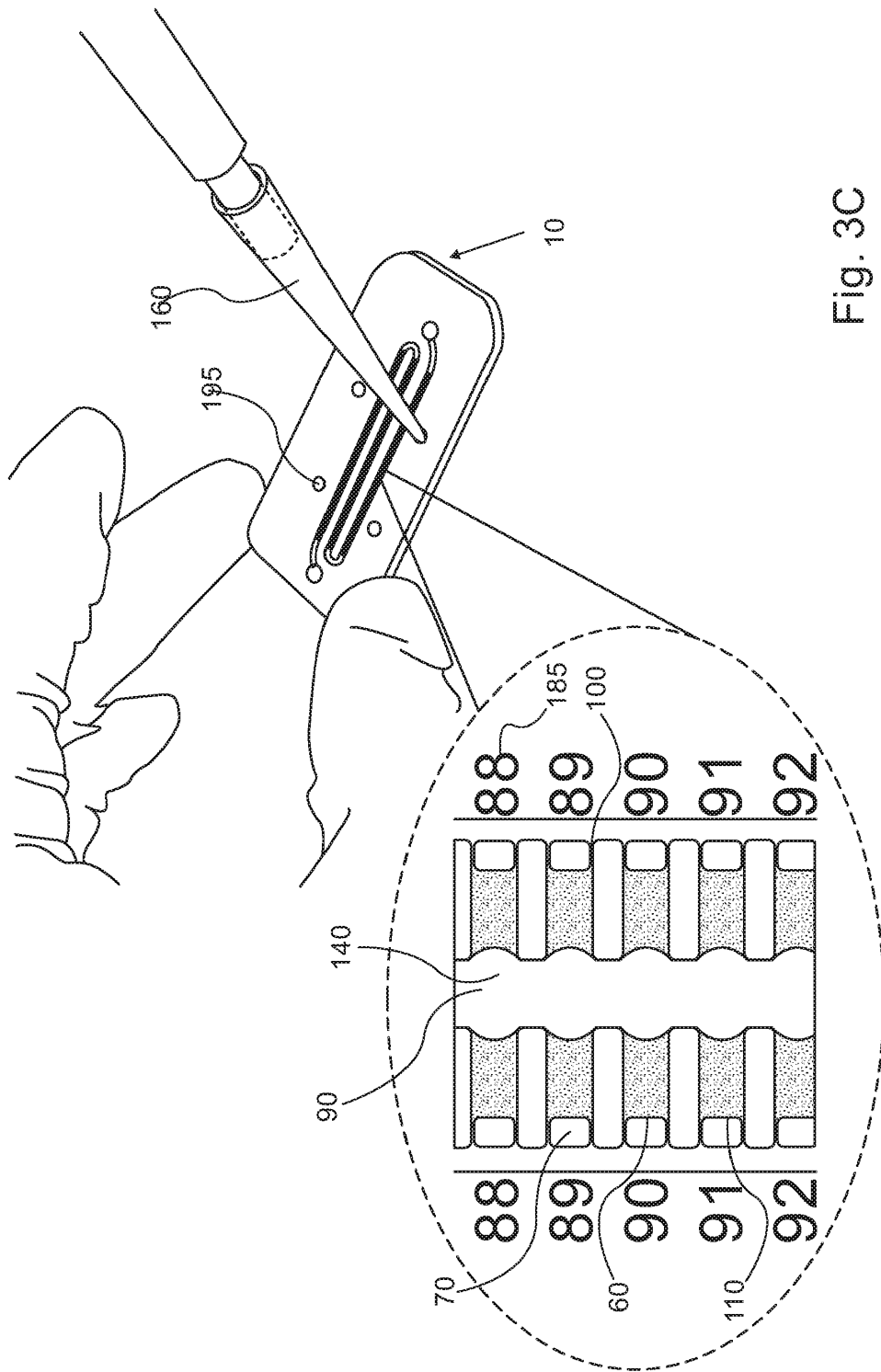


Fig. 3C

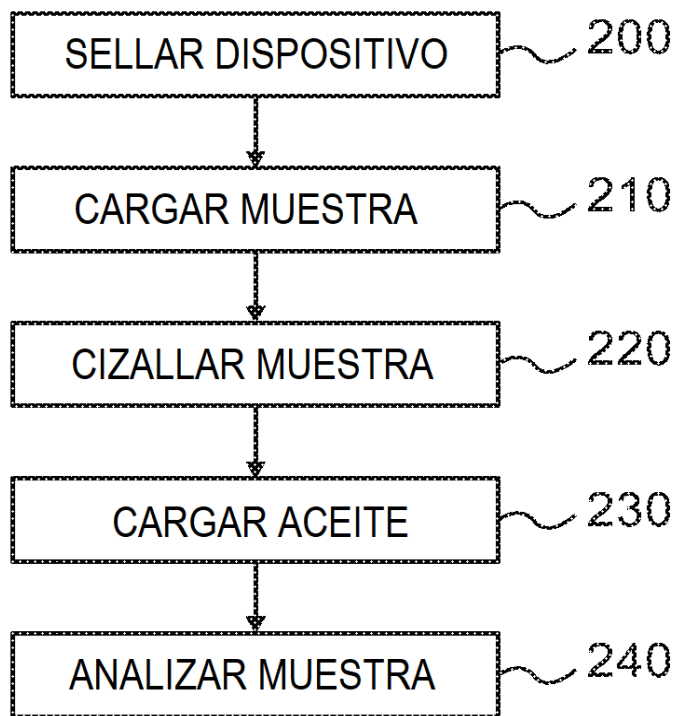


Fig. 4

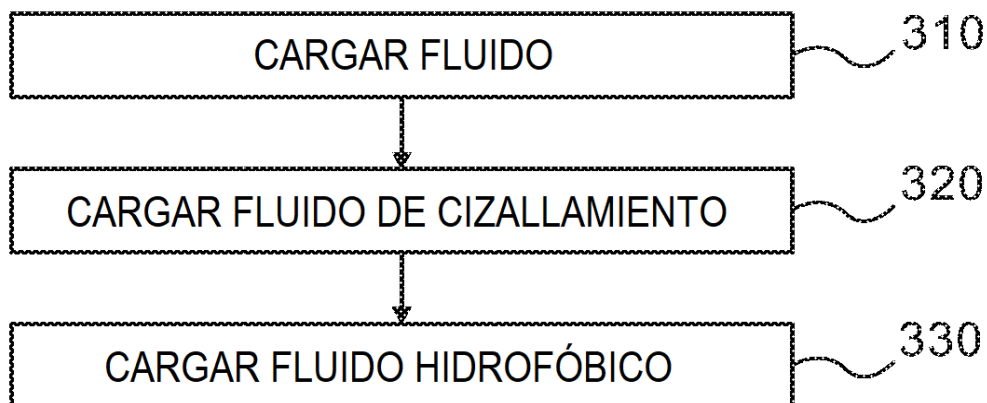


Fig. 5

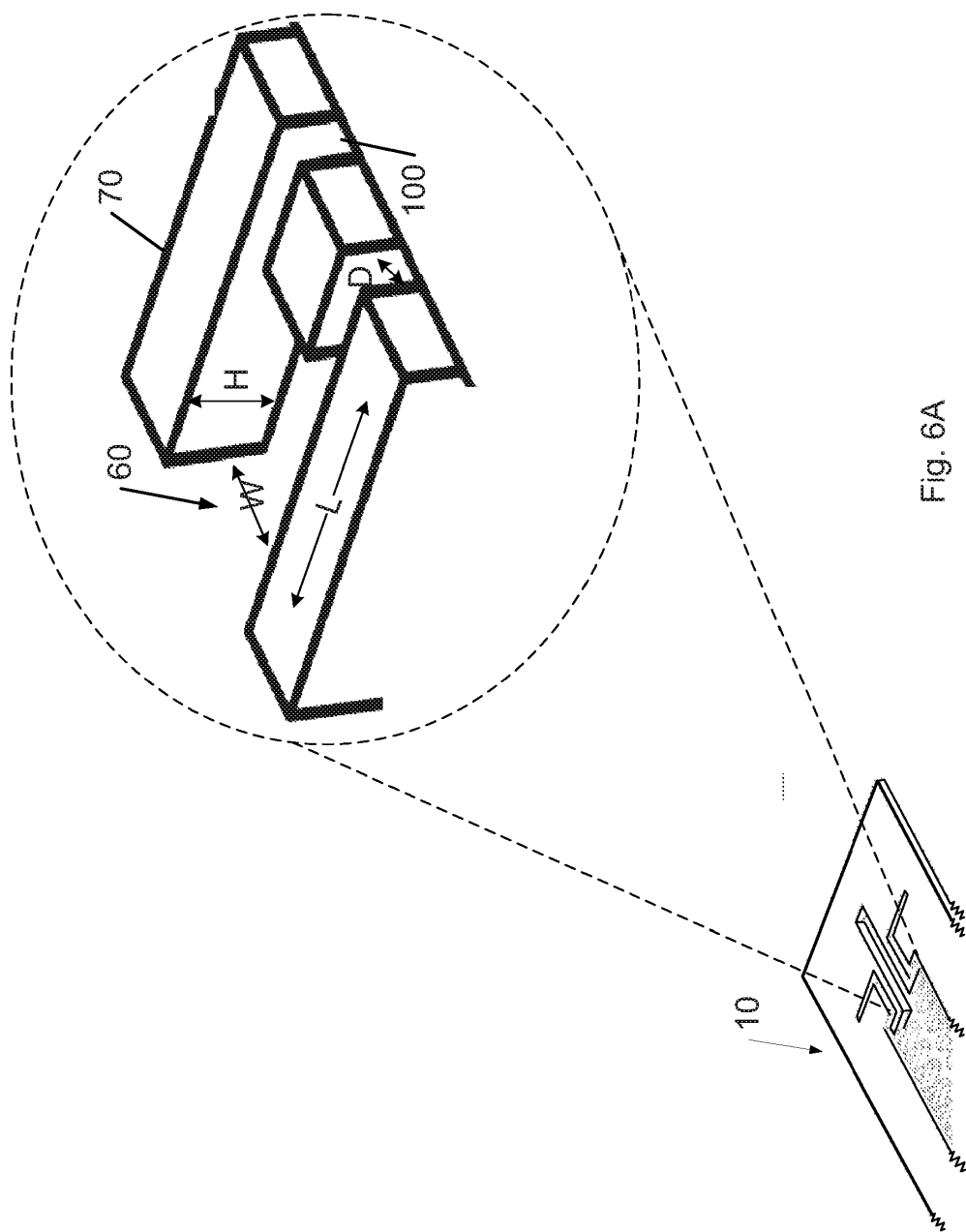


Fig. 6A

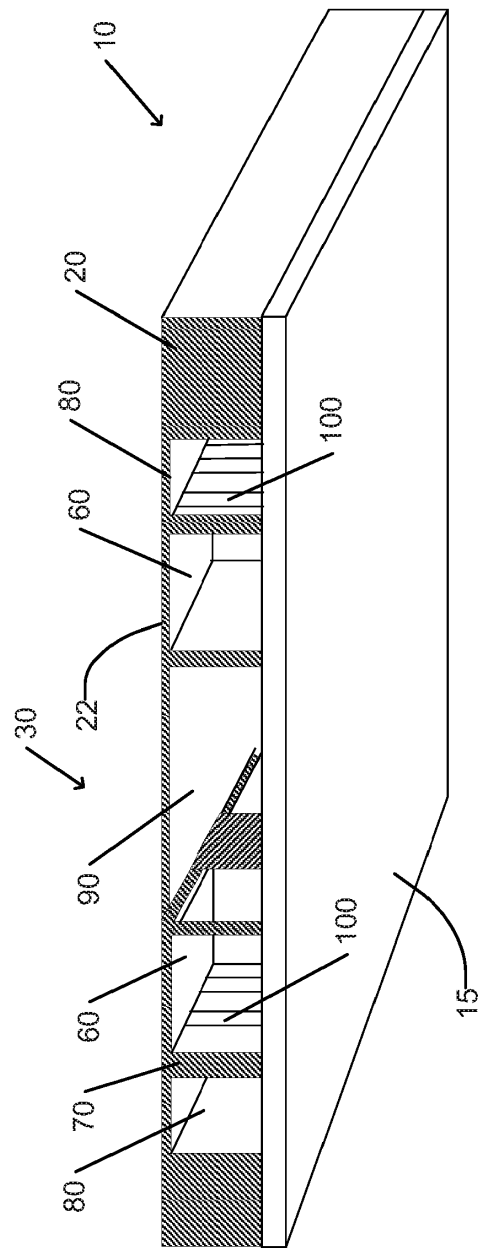


Fig. 6B

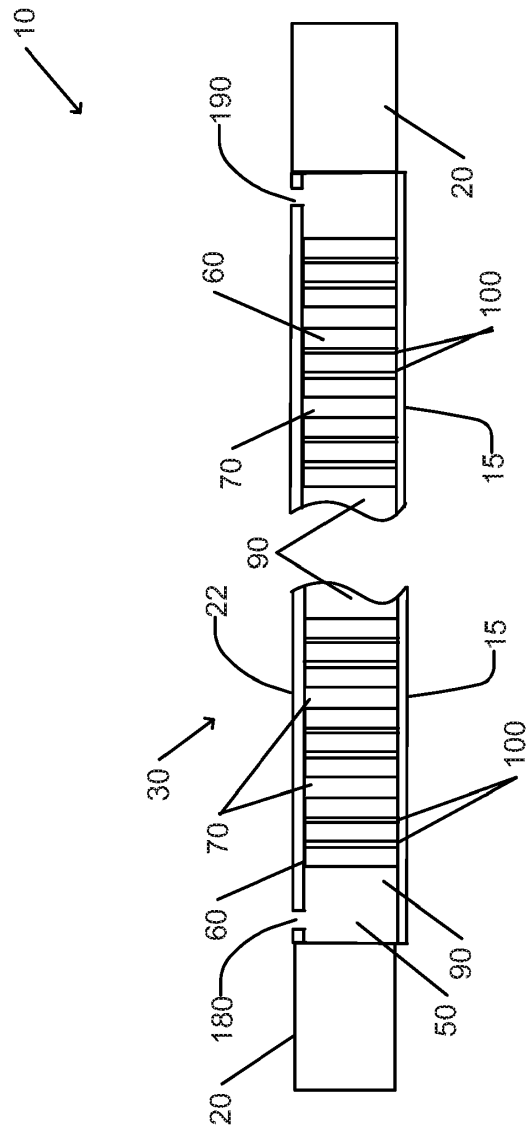


Fig. 6C