

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges
Eigentum

Internationales Büro

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum
31. Januar 2013 (31.01.2013)



(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2013/014146 A1

(51) Internationale Patentklassifikation:

G01N 15/14 (2006.01) B01L 3/00 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2012/064470

(22) Internationales Anmeldedatum:
24. Juli 2012 (24.07.2012)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2011 080 012.3 28. Juli 2011 (28.07.2011) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): SIEMENS AKTIENGESELLSCHAFT
[DE/DE]; Wittelsbacherplatz 2, 80333 München (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HAYDEN, Oliver
[AT/DE]; Dachsweg 4 a, 91074 Herzogenaurach (DE).
HELOU, Michael, Johannes [DE/DE]; Gertrud-von-le-
Fort Straße 42, 93051 Regensburg (DE). TEDDE, Sandro,
Francesco [DE/DE]; Felix-Klein-Str. 43, 91058 Erlangen
(DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: SIEMENS
AKTIENGESELLSCHAFT; Postfach 22 16 34, 80506
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,
AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN,
KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ,
RU, TJ, TM), europäisches (AL, AT, BE, BG, CH, CY,
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT,
LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE,
SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

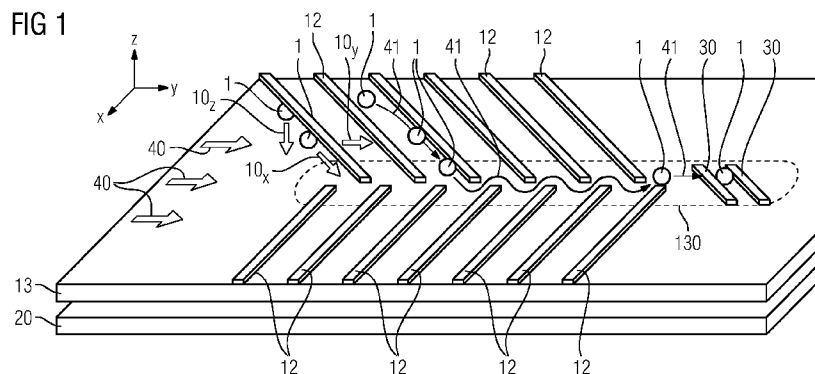
— mit internationalem Recherchenbericht (Artikel 21 Absatz
3)

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: FLUIDIC CELL GUIDANCE FOR FLOW CYTOMETRY

(54) Bezeichnung : STRÖMUNGSMECHANISCHE ZELLFÜHRUNG FÜR DURCHFLUSSZYTOMETRIE

FIG 1



(57) Abstract: The invention relates to a device and a method for fluidic cell guidance for flow cytometry or analyte enrichment. This allows magnetically marked analytes, in particular cells (1), to be dynamically enriched and individually detected in the flow from a sample, in particular magnetoresistively. For cell guidance, guiding ridges (12) are arranged in a flow channel (100), and so, in addition to a magnetic enrichment force (10_z) and the shearing force of the flow (10_y), a deflecting force (10_x) caused by the fluidic obstacles (12) also acts on the cells (1) to be detected.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur strömungsmechanischen Zellführung für Durchflusszytometrie oder Analytanreicherung. Dabei können magnetisch markierte Analyte, insbesondere Zellen (1) dynamisch im Fluss aus einer Probe angereichert und einzeln detektiert werden, insbesondere magnetoresistiv. Für die Zellführung werden Führungsschwellen (12) in einem Durchflusskanal (100) angeordnet, so dass zusätzlich zu einer magnetischen Anreicherungskraft (10_z) und der Scherkraft des Durchflusses (10_y) noch eine ablenkende Kraft (10_x) durch die strömungsmechanischen Hindernisse (12) auf die zu detektierenden Zellen (1) wirkt.



WO 2013/014146 A1



-
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls
Änderungen eingehen (Regel 48 Absatz 2 Buchstabe h)

Beschreibung

Strömungsmechanische Zellführung für Durchflussszytometrie

5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Durchflussszytometrie, insbesondere die Zellführung.

Im Bereich der Zellmessung und Zelldetektion sind optischen Messverfahren, wie Streulicht- oder Fluoreszenzmessung sowie
10 magnetische Detektionsverfahren bekannt.

Insbesondere bei magnetischen Detektionsverfahren ist zur Zellsortierung, Zellführung oder Zellanreicherung die Magnetophorese bekannt, bei der mittels magnetischer Führungs-
15 streifen eine magnetische Kraft auf die markierten Zellen derart ausgeübt wird, dass sie diesen Führungstreifen folgend abgetrennt werden können oder auch auf eine Zellmesseinrichtung hin ausgerichtet werden können. Bisher wird mit Hilfe eines magnetischen Gradientenfeldes eine Anreicherung markierter Zellen oder Partikel auf einer Substratoberfläche bewirkt, auf der wiederum mittels Magnetophorese die Zellen
20 oder zu detektierenden Partikel ausgerichtet werden.

Zur Herstellung einer derartigen Magnetophorese-Anreicherungs- und Ausrichtungsstrecke ist es bekannt, auf das Substrat z.B. durch Lithographie magnetische Streifen aufzubringen. Derartige Herstellungsverfahren sind jedoch sehr aufwendig und daher von Nachteil für die Herstellung eines Bauteils, das von seiner Verwendung her auf hohe Stückzahlen ausgerichtet ist. Einen weiteren Nachteil der magnetophoretischen Anreicherungsstrecke birgt der dadurch vergrößerte Silizium-Footprint. Für die Integration von Anreicherungsstrecke und Zellmesseinrichtung auf einen Siliziumchip übersteigt dessen Größe vernünftige Kosten für die Anwendung derartiger
30 Bauteile.
35

Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung eine vereinfacht herstellbare Vorrichtung zur Durchflussszytometrie zu schaffen.

5 Die Aufgabe wird durch eine Vorrichtung gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Ein Verfahren zur Zellführung wird in Patentanspruch 11 angegeben. Ein Herstellungsverfahren für eine erfindungsgemäße Vorrichtung wird in Patentanspruch 13 angegeben. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Durchflussszytometrie umfasst einen Durchflusskanal, eine magnetische Einheit, welche unterhalb des Kanalbodens des Durchflusskanals angeordnet ist und ausgestaltet ist ein magnetisches Gradientenfeld zu erzeugen, welches das vom Durchflusskanal umschlossene Volumen durchsetzt, wenigstens eine Zellmesseinrichtung sowie mindestens eine Führungsschwelle, welche derart im Durchflusskanal angeordnet ist, dass durch den Durchflusskanal strömbare Zellen von der Führungsschwelle zur Zellmesseinrichtung hinlenkbar sind. Dies hat den Vorteil, dass die zu detektierenden Zellen in einer Mikrofluidik durch die Strömungsbedingungen und das magnetische Gradientenfeld in zwei Dimensionen angereichert werden können. Die Vorrichtung hat weiter den Vorteil auf eine magnetophoretische Anreicherung verzichten zu können und somit baulich wesentlich weniger aufwendig zu sein als bisher bekannte Anreicherungsstrecken.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung umfasst die Vorrichtung einen Durchflusskanal, welcher hinsichtlich Kanaldurchmesser und Oberflächenbeschaffenheit der Kanalinnenwand so ausgestaltet ist, dass ein Fluss einer komplexen Zellsuspension in dem Durchflusskanal mit laminarem Strömungsprofil erzeugbar ist. Insbesondere handelt es sich bei dem Durchflusskanal um einen Mikrofluidikkanal. Vorzugsweise wird mit relativ großen Kanaldurchmessern gearbeitet, welche einen laminaren Durchfluss einer komplexen Lösung gewährleisten, ohne dass es zu Verstopfungen, beispielsweise aufgrund

von Ablagerungen kommt. Auch ist durch die Ausgestaltung des Kanals mit der Führungsschwelle eine Anreicherung zur Zellmesseinrichtung hin gewährleistet, die erlaubt auf eine Y-förmige Mikrofluidik zu verzichten, wie sie beispielsweise im Stand der Technik zur Separation markierter Zellen verwendet wird.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung umfasst die Vorrichtung eine magnetische Einheit, welche ausgestaltet ist, ein magnetisches Gradientenfeld zu erzeugen, durch welches magnetisch markierte Zellen am Kanalboden anreicherbar sind. Bei der Markierung der Zellen handelt es sich insbesondere um eine superparamagnetische Markierung, beispielsweise mittels superparamagnetischer Beads. Dies hat den Vorteil, dass alle magnetisch markierten Zellen am Kanalboden anreicherbar sind, wo sie in der laminaren Strömung an die mindestens eine Führungsschwelle herangeführt werden, so dass sie durch diese abgelenkt werden können. Dabei weist die Führungsschwelle eine Höhe in etwa des Zelldurchmessers der zu detektierenden Zellsorte auf.

Die Führungsschwelle in der Vorrichtung, ist insbesondere eine Erhebung gegen den Kanalboden oder sie ist aus einer Absenkung gegen den Kanalboden gebildet. D.h. also die Führungsschwelle bildet beispielsweise eine Verengung des Kanals, indem sie als Erhebung in das Kanalvolumen hineinragt, oder sie bildet eine Verbreiterung des Kanals, indem sie als Rand einer Absenkung, sozusagen einer Rinne, im Kanalboden gebildet ist. Durch diese Führungsschwellen-Ausführungsformen können unterschiedliche strömungsmechanische Beeinflussungen der Zellprobe vorgenommen werden.

Die Schwellenhöhe ist im Fall der Erhebungen gegen den Kanalboden die Höhe der Erhebung, im Fall der Absenkung gegen den Kanalboden, handelt es sich bei der Schwellenhöhe sozusagen um die Tiefe der Rinne im Kanalboden. Dabei bildet die Rinne außenwand, auf die die Strömung zuläuft, sozusagen die Führungsschwelle.

Insbesondere ist von der Vorrichtung eine Vielzahl von Führungsschwellen umfasst. Diese sind derart im Durchflusskanal angeordnet, dass durch den Durchflusskanal strömbare Zellen von den Führungsschwellen in einem Teilvolumen des Durchflusskanals über einer Teilfläche des Kanalbodens anreicherbar sind. Dies hat den Vorteil, dass es sich bei der Vorrichtung nicht um eine Y-förmige Mikrofluidik handelt, bei der markierte Zellen aussortiert werden, sondern es ist eine Anreicherung der zu detektierenden Zellen innerhalb des Probenvolumens möglich. Zweckdienlicherweise ist das Teilvolumen bzw. die Teilfläche des Kanalbodens in der Mitte des Durchflusskanals, wohin die Zellen von beiden Seiten aus angereichert werden können. Innerhalb der Teilfläche des Kanalbodens ist dann auch insbesondere die Zellmesseinrichtung angeordnet. Die Zellmesseinrichtung ist beispielsweise am oder im Kanalboden angeordnet. Insbesondere erstreckt sich der Erfassungsbereich der Zellmesseinrichtung über das Teilvolumen oberhalb der Zellmesseinrichtung.

Die Erhebungen der Führungsschwellen sind insbesondere so ausgestaltet, dass die Zellen in den Zwischenräumen zwischen den Führungsschwellen nicht steckenbleiben und diese Zwischenräume nicht verstopfen. Daher ist die Strukturhöhe, also die Höhe der Schwellen relativ zum Kanalboden, vorzugsweise in der Größenordnung des Zelldurchmessers, vorzugsweise etwas geringer als der Zelldurchmesser. Die Anordnung von mehreren Führungsschwellen muss einen ausreichend großen Teilbereich des Kanalbodens freilassen auf dem die angereicherten Zellen ihre Bahn durch den Durchflusskanal fortsetzen können. Entweder ist ein ausreichend breiter Kanal zwischen den Führungsschwellen freigehalten oder alternativ ein ausreichender Versatz bei Fingerstrukturen gewährleistet.

In einer beispielhaften Ausführungsform der Vorrichtung können die Führungsschwellen mittels Fotolackstreifen beispielsweise auf einem Siliziumwafer realisiert sein. Dazu werden die Fotolackschwellen insbesondere mittels Fotolithographie

erzeugt. Vorteilhafterweise wird die Anreicherungsstrecke mit den Führungsschwellen als einteiliges Kunststoffteil ausgeführt, insbesondere mittels Spritzguss, womit die Anreicherungsstrecke kein Siliziumsubstrat beansprucht. Dies hat den Vorteil den Silizium-Footprint zu reduzieren und damit auch die Herstellungs- und Bauteilkosten der Durchflusszytometrie-Vorrichtung.

In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung erstrecken sich die Führungsschwellen der Vorrichtung so über den Kanalboden, dass magnetisch markierte Zellen, welche eine magnetische Kraft in Richtung Kanalboden sowie eine fluidische Scherkraft in Durchflussrichtung erfahren, die Führungsschwellen nur auf einem Weg über eine vorgebbare Teilfläche des Kanalbodens überwinden können. D.h., dass die Führungsschwellen insbesondere an den Kanalwänden beidseitig des Kanalbodens so ansetzen, dass am Kanalboden angereicherte magnetisch markierte Zellen nicht an den Kanalwänden entlang fließen können. Insbesondere erstrecken sich die Führungsschwellen über beide Längshälften des Kanalbodens jeweils von einer Kanalwand bis in etwa zur Kanalmitte hin, wo ein Durchlass für am Kanalboden angereicherte Zellen in Strömungsrichtung gewährleistet ist. Dabei können die Führungsschwellen insbesondere so angeordnet sein, dass die Teilfläche über der die markierten Zellen angereichert werden, eine schmale rechteckige Teilfläche ist, die entlang der Kanalmitte in Durchflussrichtung verläuft. Alternativ können die Führungsschwellen auch fingerartig ineinander greifen, so dass die Teilfläche, über der die Zellen angereichert werden, eine zickzack- bzw. wellenförmig verlaufende Teilstrecke darstellt. Insbesondere kann sich die Teilfläche, auf die die Zellen hin angereichert werden, auch im Verlauf des Durchflusskanals in Durchflussrichtung verzüngen.

In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung sind die Führungsschwellen mit dem Kanalboden einteilig ausgeführt. Insbesondere sind die Führungsschwellen mit dem Kanalboden als ein Spritzgussteil ausgeführt. Die Ausführungsform als

Spritzgussteil hat den Vorteil, dass die Anreicherungsstrecke nicht zusätzlich auf dem Substrat für die Zellmessung angeordnet sein muss, welches in den meisten Fällen zweckdienlicherweise ein Siliziumwafer ist. Dadurch kann der sogenannte Footprint, also die Maße des Siliziumsubstrats, für das Bauteil zur Durchflussszytometrie erheblich reduziert werden, was auch den Preis für eine derartige Durchflussszytometrie-Vorrichtung senkt. Außerdem ist die Ausgestaltung der strömungsmechanischen Anreicherungsstrecke wesentlich einfacher in der Herstellung, vor allem gegenüber lithographischen Verfahren wie sie beispielsweise bei der Herstellung von magnetophoretischen Anreicherungsstrecken verwendet werden.

Insbesondere sind die Führungsschwellen gerade linienförmige Erhebungen gegen den Kanalboden. Mit der geraden Linienform werden die am Boden angereicherten Zellen durch den laminaren Fluss an den Schwellen entlang transportiert, ohne dass es zu störenden Turbulenzen im Fluss am Kanalboden kommt. Alternativ können die Führungsschwellen in einem Bogen zur Kanalmitte hin verlaufen. Bei der Ausrichtung der geraden linienförmigen Schwellen werden diese insbesondere in einem spitzen Winkel zur Durchflussrichtung angeordnet. D.h., dass die an den Führungsschwellen entlang zu transportierenden angereicherten Zellen durch diese nicht zurückgehalten werden, sondern dass der Transport der Zellen in Durchflussrichtung weiter verläuft.

Vorteilhafterweise umfasst die Vorrichtung mit der Anreicherungsstrecke eine Kombination aus Führungsschwellen auf einem separaten Kunststoffkanalabschnitt, die beispielsweise mit dem Kanalboden einteilig ausgeführt sind und einen kleinen Teil der Anreicherungsstrecke mittels Fotolackschwellen auf dem Siliziumwafer, auf dem auch die Zellmesseinrichtung angeordnet ist. Mittels einer derartigen Kombination kann der Silizium-Footprint reduziert werden. Die Zellen werden auf einer beliebig langen Anreicherungsstrecke durch die Geometrie der Führungsschwellen und die strömungsmechanischen Bedingungen angereichert und sobald diese den Siliziumwafer errei-

chen, sind auch dort vor der Zellmesseinrichtung, vorzugsweise noch ein paar wenige Führungsschwellen vorgeschaltet, um die Anreicherung und Ausrichtung der Zellen bei Übertritt auf das neue Kanalbodensubstrat zu erhalten.

5

Die hybride Form der Anreicherungsstrecke bildet also eine vorteilhafte Variante den Silizium-Food-Print zu reduzieren. Der Aufbau der strömungsmechanischen Anreicherungsstrecke mittels der Führungsschwellen auf einem Plastiksubstrat ist dann beispielsweise dem Silizium Die vorgelagert. Auf dem Silizium Die befinden sich insbesondere die magnetoresistiven Bauteile zur Detektion der magnetisch markierten Einzelzellen.

15 Eine derartige hybride Anreicherungsstrecke kann beispielsweise auch einen Teil umfassen, in dem die Führungsschwellen einen Nickelanteil aufweisen oder als Nickelstreifen realisiert sind. Mit einem Nickelanteil in den Führungsschwellen können überschüssige ungebundene magnetische Marker durch
20 magnetische Haltekräfte an den Nickelstreifen oder Nickelführungsschwellen zurückgehalten werden und sozusagen aus der komplexen Suspension herausgefiltert werden. Insbesondere werden Nickelführungsschwellen mittels Laserablation strukturiert. Die Führungsschwellen mit einem Nickelanteil werden
25 insbesondere der Anreicherungsstrecke mit dem nicht nickelhaltigen Führungsschwellen vorgeschaltet, d.h. sind in Durchflussrichtung im Kanal vor den Führungsschwellen angeordnet. Alternativ können die nickelhaltigen Führungs- und Filterstreifen aber auch auf dem Siliziumsubstrat unmittelbar vor
30 Erreichen der Zellmesseinrichtung angeordnet sein und dort die doppelte Funktion der Anreicherung und Führung als auch der Filterung von überschüssigen Markern vollbringen.

Durch die dynamische Anreicherung und Zellführung im Fluss
35 ist der Vorteil der Vorrichtung gewährleistet, das Anreicherung und Messung in einem Kanal vorgenommen werden kann. Die Vorrichtung ist nicht auf eine Aussortierung mittels Y-förmiger Abtrennung von markierten Zellen von der umgebenden

komplexen Suspension angewiesen und auch überschüssige Marker müssen nicht aufwendig aus der Suspension abgetrennt werden, sondern können durch die Führungsschwellen zurückgehalten werden. Insbesondere sind die Führungsschwellen in ihrer Höhe und in ihrem Winkel zur Durchflussrichtung so angeordnet, dass ungebundene magnetische Marker, welche sehr viel kleiner in ihrem hydrodynamischen Durchmesser sind als markierte Zellen, an den Führungsschwellen hängen bleiben und zurückgehalten werden, d.h. diese nicht überwinden können. Nur die größeren Anteile oder Partikel, wie markierte Zellen in der komplexen Suspension, werden im laminaren Fluss mitgerissen und so an den Schwellen entlang transportiert. D.h. auch nicht magnetische bzw. nicht magnetophoretische Anreicherung wie in diesem Fall mittels der Führungsschwellen kann eine Filterwirkung auf überschüssige und demnach unerwünschte Marker im Messbereich der Zellmesseinrichtung ausüben.

Zur Unterstützung des strömungsmechanischen Filtereffektes an den Führungsschwellen, die insbesondere nicht magnetisch sind, d.h. keinen Nickelanteil aufweisen, können diese in der Höhe variiert werden, d.h. insbesondere auf die Größe der zu detektierenden Zellsorte und die Größe der zu filternden, nicht gebundenen magnetischen Partikel bzw. Marker angepasst werden. In einer vorteilhaften Ausführungsform steigt die Schwellenhöhe im Verlauf des Durchflusskanals in Durchflussrichtung an. Die erste Schwelle ist noch sehr niedrig und kann von den meisten Partikeln und Zellen überwunden werden. Im Kanalverlauf steigt die Schwellenhöhe dann zunehmend an und hält somit immer größere Partikel zurück. Nur die magnetisch markierten Zellen, die detektiert werden sollen, werden von den Schwellen nicht aufgehalten, sondern werden an den Schwellen entlang transportiert und in einem Teilvolumen des Kanals aufkonzentriert. Dazu weisen alle Schwellen insbesondere auf dieses Teilvolumen hin, welches sich insbesondere in der Kanalmitte am Kanalboden befindet.

Der Kanaldurchmesser bzw. die Kanalhöhe und -breite betragen insbesondere einige 100 µm, beispielsweise 200 µm. Die

Schwellenhöhe ist von der zu detektierenden Zellsorte und deren Zelldurchmesser abhängig und beträgt insbesondere einige Mikrometer, beispielsweise 10 µm oder auch bis zu 30 µm. Der Durchflusskanal kann also insbesondere ein ausreichend großes
5 Volumen einer komplexen Suspension führen ohne dadurch zu verstopfen.

In dem erfindungsgemäßen Verfahren zur magnetischen Durchflusszytometrie wird ein laminarer Fluss einer Zellprobe erzeugt und die Zellen mittels Führungsschwellen in einem vorgebbaren Teilvolumen des Durchflusskanals angereichert. Dabei werden die zu detektierenden Zellen magnetisch markiert und in einem magnetischen Gradientenfeld dynamisch am Kanalboden angereichert. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass strömungsmechanische und magnetische Kräfte so zusammenwirken,
15 dass magnetisch markierte Zellen gezielt in einem vorgebbaren Volumen angereichert werden können, ohne dass diese aus der Zellsuspension abgetrennt werden müssen. In einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens verläuft das Teilvolumen
20 in Flussrichtung entlang des Kanalbodens, so dass die Zellen entlang einer Achse einzeln über eine Zellmesseinrichtung geführt werden.

Für das Verfahren zur Durchflusszytometrie wird beispielsweise eine Blutprobe laminar durch die Mikrofluidik transportiert. Im Fluss werden die Zellen nahe am Kanalboden durch die Strukturierung des Substrats, d.h. die Führungsschwellen partiell ausgerichtet. Im Gradientenfeld werden beispielsweise superparamagnetische Analyte an den strukturierten Kanalboden herangezogen und dort magnetoresistiv detektiert.
30

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur magnetischen Durchflusszytometrie wirken also auf die magnetisch markierten Zellen oder auf Magnetbeads oder allgemein auf zu detektierende magnetische Partikel drei Kräfte: Die magnetische Kraft des magnetischen Gradientenfeldes, welches durch die magnetische Einheit unter dem Kanalboden erzeugt wird. Magnetische Feldstärken dieses Gradientenfeldes betragen beispielsweise
35

zwischen 1 und 300 mT. Diese magnetische Kraft zieht die Zellen also senkrecht zur Kanalbodenfläche hin. Des Weiteren wirkt die Scherkraft der fließenden Zellprobe auf die Einzelzellen. Der Fluss ist insbesondere ein laminarer Fluss. Diese Kraft wirkt also in Richtung des Zellprobenflusses durch den Kanal. Eine dritte Kraft üben die Führungsschwellen am Kanalboden aus, welche ein strömungsmechanisches Hindernis für die am Boden angereicherten magnetisch markierten Zellen darstellen. Dadurch wird bewirkt, dass die Zellen sich, um in Flussrichtung weiter voranzukommen, entlang der Führungsschwellen zur Kanalmitte hin bewegen oder allgemein je nach Ausrichtung der Führungsschwellen auf einen Teilbereich des Kanals hin bewegen. Die magnetische Markierung geschieht vorzugsweise durch superparamagnetische Partikel.

Bei der Durchführung des Verfahrens zur Durchflusszytometrie spielen auch die Strömungsgeschwindigkeit, die Oberflächeneigenschaft sowie die magnetische Feldstärke eine Rolle. Die Strömungsgeschwindigkeit etwa ist insbesondere auf die Zellprobe und vor allem den Kanaldurchmesser angepasst, um einen laminaren Fluss zu gewährleisten. Mittels einer Oberflächenfunktionalisierung können die Oberflächeneigenschaften der Kanalinnenwände und des Kanalbodens optimiert werden. Mittels der Feldstärke des magnetischen Gradientenfeldes kann weiter Einfluss auf die abzulenkenden und anzureichernden Zellen genommen werden. Die zu detektierenden Zellen besitzen auch mechanische Eigenschaften, welche durch die Größen der Strömungsgeschwindigkeit, Oberflächenbeschaffenheit und Magnetfeldstärke beeinflussbar sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren für eine Vorrichtung zur Durchflusszytometrie werden Führungsschwellen mit dem Kanalboden einteilig ausgeführt, insbesondere als Spritzgussteil.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung hat also den Vorteil eine Lösung zur Durchflusszytometrie ohne Magnetophorese anzubieten. Beispielsweise kann mit verschiedenen Techniken, wie un-

ter anderem Spritzguss oder Embossing, ein derartig strukturiertes Substrat hergestellt werden, welches durch die Führungsschwellen, also die Struktur des Substratbodens, die magnetisch markierten Zellen entsprechend führt und anreichert. Demnach sind keine lithographischen Aufwendungen wie bei der magnetophoretischen Anreicherung notwendig. Sozusagen werden die magnetischen Führungslinien einer magnetophoretischen Anreicherungsstrecke durch eine dreidimensionale Struktur des Substratbodens ersetzt. Die bevorzugte Fischgrätenform wird dabei insbesondere übernommen. Die Strukturierung weist insbesondere linienförmige Erhebungen auf, die als Führungsschwellen bezeichnet werden. Diese sind insbesondere in einem steilen Winkel zur Flussrichtung durch den Kanal angeordnet. Die Schwellen messen gegen den Kanalboden typischerweise Höhen zwischen 0,1 und 20 μm . In ihrer Breite messen die Führungsschwellen beispielsweise zwischen 1 und 100 μm . Die Länge der Führungsschwellen wird in Abhängigkeit von der Kanalbreite so gewählt, dass sie am Kanalrand mit der Kanalwand abschließen und in etwa bis zur Mitte des Kanals reichen. Entweder sie reichen nur knapp bis zur Mitte, so dass zwischen den Führungsschwellen, die von beiden Seiten in Richtung Kanalmitte ragen, ein Durchlass bestehen bleibt oder alternativ ragen sie von ihrer Länge her über die Kanalmitte hinaus und sind dann fingerförmig ineinandergreifend angeordnet. Der Winkel zur Flussrichtung beträgt beispielsweise weniger als 45° , insbesondere weniger als 20° .

Bei dem Verfahren zur Durchflusszytometrie wird insbesondere eine Blutprobe laminar durch die Mikrofluidik transportiert. Zellen innerhalb dieser Blutprobe werden nahe an der Substratoberfläche durch die Substratstrukturierung partiell ausgerichtet. Magnetisch markierte Analyte, insbesondere superparamagnetisch markierte Analyte werden in dem Gradientenfeld an die Substratoberfläche, d.h. an den Kanalboden herangezogen und nahe am Substrat, d.h. am Kanalboden geführt, wo sie die Substratstrukturierung beeinflussen kann. Die so angereicherten und ausgerichteten Zellen können dann magnetoresistiv detektiert werden.

Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden in exemplarischer Weise mit Bezug auf die Figuren 1 bis 7 der angehängten Zeichnung beschrieben:

5

Figur 1 zeigt eine perspektivische Darstellung des Kanalbodens mit den zellführenden Erhebungen,

10

Figur 2 zeigt einen Längsschnitt bzw. eine Seitenansicht des Kanalbodens mit darunterliegendem Permanentmagneten,

Figur 3 zeigt einen Querschnitt bzw. eine Frontansicht des Durchflusskanals,

15

Figur 4 zeigt eine Draufsicht auf die Anordnung mit den fischgrätenartig angeordneten Führungsrinnen bzw. -schwellen,

Figur 5 zeigt eine weitere Draufsicht auf die Anordnung mit den fischgrätenartig angeordneten Führungsrinnen bzw. -schwellen und

Figur 6 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt der Figur 4.

20

Figur 7 zeigt eine hybride Zellanreicherungsstrecke.

25

Die Figur 1 zeigt eine perspektivische Ansicht des Kanalsbodens 13, der als flaches Substrat dargestellt ist. Darunter beabstandet ist ein weiterer flacher Quader 20 gezeigt, welcher die magnetische Einheit 20 darstellt. Die magnetische Einheit ist insbesondere ein Permanentmagnet. Die magnetische Einheit 20 kann sich auch über eine größere Fläche als die des Kanalbodens 13 erstrecken, um im Bereich des Durchflusskanals 100 ein homogenes Magnetfeld zu gewährleisten. Insbesondere erzeugt die magnetische Einheit 20 in dem Durchflusskanal 100 ein Gradientenfeld in dem magnetische Partikel wie etwa die magnetisch markierten Zellen 1 oder auch ungebundene magnetische Marker in Minus-z-Richtung zum Kanalboden 13 hin angereichert werden. x-, y- und z-Richtung sind in den Figuren jeweils durch kleine Koordinatensysteme am Rand angezeigt. In der Figur 1 sind auf dem Kanalbodensubstrat 13 eine Vielzahl an Führungsschwellen 12 angeordnet, die als schmale Quader dargestellt sind. Diese Erhebungen 12 setzen insbesondere am

30

35

Rand des Kanalbodens bzw. an den Kanalwänden 14 an. Die Kanalwände 14 sind in der Darstellung von Figur 1 nicht gezeigt. Die Führungsschwellen 12 ragen in die Kanalmitte hin, wo sie jedoch nicht mit den gegenüberliegenden Führungs-

5 schwellen zusammenstoßen, sondern entweder in der Mitte einen geraden Durchlass gewähren oder derart fingerförmig ineinandergreifen, dass eine zickzack- oder schlangenförmige Linie durch die Führungsschwellen verlaufen kann. Mögliche Fließbahnen von magnetisch markierten Zellen 1 sind mit Pfeilen 41
10 in der Figur 1 eingezeichnet. Die magnetisch markierten Zellen 1 sind als Kreise oder Ovale gezeigt. Die an die Zellen angreifenden Kräfte $10_{x,y,z}$ sind durch Doppelpfeile angedeutet. Wiederum durch breite Doppelpfeile ist die Durchflussrichtung 40 angezeigt, welche in der Figur 1 von links nach
15 rechts verläuft. Im Durchflusskanal 100 werden also an einem Ende die magnetisch markierten Zellen 1 innerhalb einer komplexen Zellsuspension eingeleitet und durchfließen in Durchflussrichtung 40 die Anreicherungsstrecke mit den Führungsschwellen 12. Durch die magnetische Kraft 10_z , die in Rich-
20 tung Kanalboden 13 weist, die Scherkraft 10 der Flüssigkeit im laminaren Strom, die in Durchflussrichtung 40 weist und durch die Führungsschwellen 12, die eine Barriere darstellen, welche wiederum eine mechanische Kraft 10_x in der x-y-Ebene der Figur 1 auf die Zellen 1 ausüben, werden die Zellen 1
25 entlang der Führungsschwellen geschoben, in Richtung des Teilbereichs 130 des Kanalbodens 13. Am Ende dieses Teilbereichs 130, in dem die Zellen 1 aufkonzentriert werden, befindet sich noch die Zellmesseinrichtung 30, welche insbesondere wenigstens ein magnetoresistives Element umfasst.

30 Die Figur 2 zeigt einen Längsschnitt bzw. eine Seitenansicht einer Vorrichtung ähnlich wie in Figur 1. Dabei sind zwei flache Rechtecke übereinander angeordnet, die das Substrat bzw. den Kanalboden 13 und beabstandet darunter die magnetische Einheit 20 darstellen. Alternativ zu der gezeigten Ausführungsform kann der Permanentmagnet auch direkt unterhalb des Kanalbodens 13 ohne Beabstandung angeordnet sein. Oberhalb des Kanalbodens 13 ist wieder mit einem Doppelpfeil die

Durchflussrichtung 40, in der Figur 2 von links nach rechts, angezeigt und ein Querschnitt durch drei der Führungsschwellen 12 sowie durch die Zellmesseinrichtung 30 am rechten Ende der Figur 2 und somit am Ende der Anreicherungsstrecke. Die magnetisch markierten Zellen 1 erfahren durch den Permanentmagneten 20 eine magnetische Kraft 10 senkrecht zum Kanalboden 13 hin. Die Höhe der Führungsschwellen 12 ist insbesondere auf die Ausdehnung, also den hydrodynamischen Durchmesser der magnetisch markierten Zellen 1 abgestimmt und beträgt insbesondere etwas weniger als der Zelldurchmesser. Bei einer zu geringen Höhe jedoch würden die magnetisch markierten Zellen keine Führungskraft 10 durch die Schwellen 12 erfahren, sondern im laminaren Strom über diese hinweggerissen werden. Bei zu hohen Barrieren 12 würden die magnetisch markierten Zellen 1 keine Scherkraft 10_y durch den Fluss mehr erfahren und hinter den Schwellen 12 hängen bleiben.

Die Figur 3 zeigt einen Querschnitt bzw. die Frontansicht des Durchflusskanals 100. In der Figur 3 sind wieder als schmale Rechtecke die magnetische Einheit 20 und beabstandet darüber das Substrat 13 für den Kanalboden gezeigt, darüber ist die Kanalwand 14 angeordnet, die ein quaderförmiges Kanalvolumen einschließt. Im Durchflusskanal 100 ist noch gestrichelt das Teilvolumen 110 gezeigt, in welchem die magnetisch markierten Zellen 1 angereichert werden.

Die Figur 4 nun zeigt eine Draufsicht auf den Kanalboden 13, auf dem wieder mit Doppelpfeilen 40 die Durchflussrichtung von links nach rechts in der Figur 4 verdeutlicht ist. Jeweils seitlich des Kanalbodens 13 sind im Schnitt die Kanalwände 14 schraffiert dargestellt. Innerhalb der Kanalwände 14 verläuft je eine gestrichelte Linie, die das Ende des magnetischen Bereiches kennzeichnet. D.h. der Abstand der gestrichelten Linien 200 zeigt die Breite des vom Magnetfeld durchsetzten Bereichs an. Dieser ist insbesondere breiter als der Durchflusskanal 100. Somit ist gewährleistet, dass das Magnetfeld im Kanalvolumen möglichst homogen ist. Der vom Magnetfeld durchsetzte Bereich 200 wird durch die magnetische

Einheit 20 erzeugt, die unterhalb des Kanalbodens 13 angeordnet ist, wie in den Figuren 1 bis 3 sichtbar ist. Im Kanal 100 sind wieder Führungsschwellen 12 in einem Winkel δ zur Kanalwand 14 angeordnet, so dass die Führungsschwellen 12 von
5 der Kanalwand 14 in Richtung Kanalmitte in Durchflussrichtung 40 zeigen. So können die magnetisch markierten Zellen 1, wie durch die Fließbahnen 41 angezeigt, an den Führungsschwellen 12 abgelenkt werden in Richtung des Teilbereichs 130, der sich bis zu der Zellmesseinrichtung 30 oder darüber hinaus
10 erstreckt.

Die Figur 5 zeigt eine mögliche Anordnung von Führungsschwellen 12, welche in einem sehr spitzen Winkel δ zueinander verlaufen. Wiederum ist die Kanalbreite 100 angezeigt. Die Figur
15 6 zeigt einen vergrößerten Ausschnitt aus der Figur 5 mit den in einem spitzen Winkel δ zulaufenden Führungsschwellen 12, welche eine Schwellendicke bzw. -breite d und einen Abstand zwischen den Schwellen D aufweisen. Der Winkel δ , in dem die Schwellen 12 relativ zur Flussrichtung 40 angeordnet sind,
20 kann beispielsweise relativ zur Kanalmittellinie wie in Figur 6 gezeigt, oder relativ zur Kanalwand 14 gemessen werden. Wiederum sind magnetisch markierte Zellen 1 als kleine Kreise in der Figur 6 eingezeichnet. Dabei wird verdeutlicht, dass für die Zellen 1 ein ausreichend breiter Fließweg zwischen
25 den Schwellen 12 hindurch gewährleistet ist, so dass diese die Führungsschwellenzwischenräume nicht verstopfen.

Die Figur 7 schließlich zeigt noch eine mögliche Ausgestaltungsform der Vorrichtung mit einer hybriden Anreicherungs-
30 strecke. Im linken Bereich der Figur 7 ist die Anreicherungsstrecke auf einem Kunststoffsubstrat 13 mit Kunststoffführungsschwellen 12 gezeigt, welche mit die beschriebene strömungsmechanische Anreicherung der Zellen 1 bewirken. Im rechten Bereich der Zeichnung schließt sich an das Substrat 13
35 der Siliziumchip 15 an, auf dem die Zellmesseinrichtung 30 angeordnet ist. Dieser kann wie im Beispiel der Figur 7 gezeigt noch weitere Führungsschwellen 125 aufweisen, welche insbesondere die Anreicherungsstrecke auf den Teilbereich 130

fortsetzen. Die Durchflussrichtung 40 ist wieder durch einen Doppelpfeil von links nach rechts in der Zeichnung dargestellt. Die magnetisch markierten Zellen 1 sind als Ovale dargestellt und deren Fließbahnen mit Pfeilen 41 gekennzeichnet. In dem gezeigten Beispiel in Figur 7 greifen die Führungsschwellen 12, die beidseitig an den Kanalwänden 14 ansetzen, nicht fingerförmig ineinander, sondern lassen einen geraden Durchflussbereich im Bereich der Kanalmitte offen, der in dem Teilbereich 130 zur Anreicherung liegt. Um die Zellen 1 auch nach der Anreicherungsstrecke durch die Führungsschwellen 12 noch gerade über den Zellmessbereich 30 zu führen, weist der Siliziumchip 15 noch ein kleines Teilstück Anreicherungsstrecke mit Führungsschwellen 125 auf. Diese können beispielsweise auch einen Nickelanteil im Material der Führungsschwellen 125 aufweisen und somit noch ungebundene Marker vor der Zellmesseinrichtung 30 durch magnetische Rückhaltekräfte herausfiltern. Alternativ können die Führungsschwellen 125 auf dem Siliziumchip 15 etwa durch Fotolackstrukturen realisiert sein. Des Weiteren ist in der Figur 7 wieder durch Doppelpfeile die ablenkende Kraft 10x gezeigt, die die Zellen 1 an den Führungsschwellen 12 entlang zur Mitte führt als auch die Scherkraft des Fluidikstroms 10y, die in Durchflussrichtung 40 weist.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Durchflussszytometrie mit

- einem Durchflussskanal (100),
- 5 - mit einer magnetischen Einheit (20), welche unterhalb des Kanalbodens (13) des Durchflussskanals (100) angeordnet ist und ausgestaltet ist, ein magnetisches Gradientenfeld zu erzeugen, welches das vom Durchflussskanal (100) umschlossene Volumen durchsetzt,
- 10 - wenigstens einer Zellmesseinrichtung (30) sowie
- mindestens einer Führungsschwelle (12), welche derart im Durchflussskanal (100) angeordnet ist, dass durch den Durchflussskanal (100) strömbare Zellen (1) von der Führungsschwelle (12) zur Zellmesseinrichtung (30) hin
- 15 lenkbar sind.

2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei der Durchflussskanal (100) hinsichtlich Kanaldurchmesser und Oberflächenbeschaffenheit der Kanalinnenwand so ausgestaltet ist, dass ein

20 Fluss einer komplexen Zellsuspension in dem Durchflussskanal (100) mit laminarem Strömungsprofil erzeugbar ist.

3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die magnetische Einheit (20) ausgestaltet ist, ein magnetisches

25 Gradientenfeld zu erzeugen, durch welches magnetisch markierte Zellen (1), insbesondere superparamagnetisch markierte Zellen (1), am Kanalboden (13) anreicherbar sind.

4. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei

30 die Führungsschwelle (12) eine Erhebung gegen den Kanalboden (13) ist oder aus einer Absenkung gegen den Kanalboden (13) gebildet ist.

5. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche mit ei-

35 ner Vielzahl von Führungsschwellen (12), welche derart im Durchflussskanal (100) angeordnet sind, dass durch den Durchflussskanal (100) strömbare Zellen (1) von den Führungsschwellen (12) in einem Teilvolumen des Durchflussskanals (100) über

einer Teilfläche (130) des Kanalbodens (13) anreicherbar sind.

6. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei
5 die Zellmesseinrichtung (30) am oder im Kanalboden (13) angeordnet ist.

7. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei
10 sich die Führungsschwellen (12) so über den Kanalboden erstrecken, dass magnetisch markierte Zellen (1), welche eine magnetische Kraft (10_z) in Richtung Kanalboden (13) sowie eine fluidische Scherkraft (10_y) in Durchflussrichtung (40) erfahren, die Führungsschwellen (12) nur auf einem Weg über eine vorgebbare Teilfläche (130) des Kanalbodens (13) überwinden können.
15

8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Führungsschwellen (12) mit dem Kanalboden (13) einteilig ausgeführt sind, insbesondere als Spritzgussteil.
20

9. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Führungsschwellen (12) gerade linienförmige Erhebungen gegen den Kanalboden (13) sind.

25 10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 5 bis 9, wobei die Führungsschwellen (12) in einem spitzen Winkel zur Durchflussrichtung (40) angeordnet sind.

11. Verfahren zur magnetischen Durchflusszytometrie bei dem
30 ein laminarer Fluss einer Zellprobe erzeugt wird, die Zellen (1) magnetisch markiert werden und in einem magnetischen Gradientenfeld dynamisch am Kanalboden (13) angereichert werden und bei dem die Zellen (1) mittels Führungsschwellen (12) in einem vorgebbaren Teilvolumen (110) des Durchflusskanals
35 (100) über einer Teilfläche (130) des Kanalbodens (13) angereichert werden.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Teilfläche (130) in Flussrichtung (40) entlang des Kanalbodens (13) verläuft, so dass die Zellen (1) entlang einer Achse über eine Zellmeseinrichtung (30) geführt werden.

5

13. Herstellungsverfahren für eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10 bei dem die Führungsschwellen (12) mit dem Kanalboden (13) einteilig ausgeführt werden, insbesondere als Spritzgussteil.

10

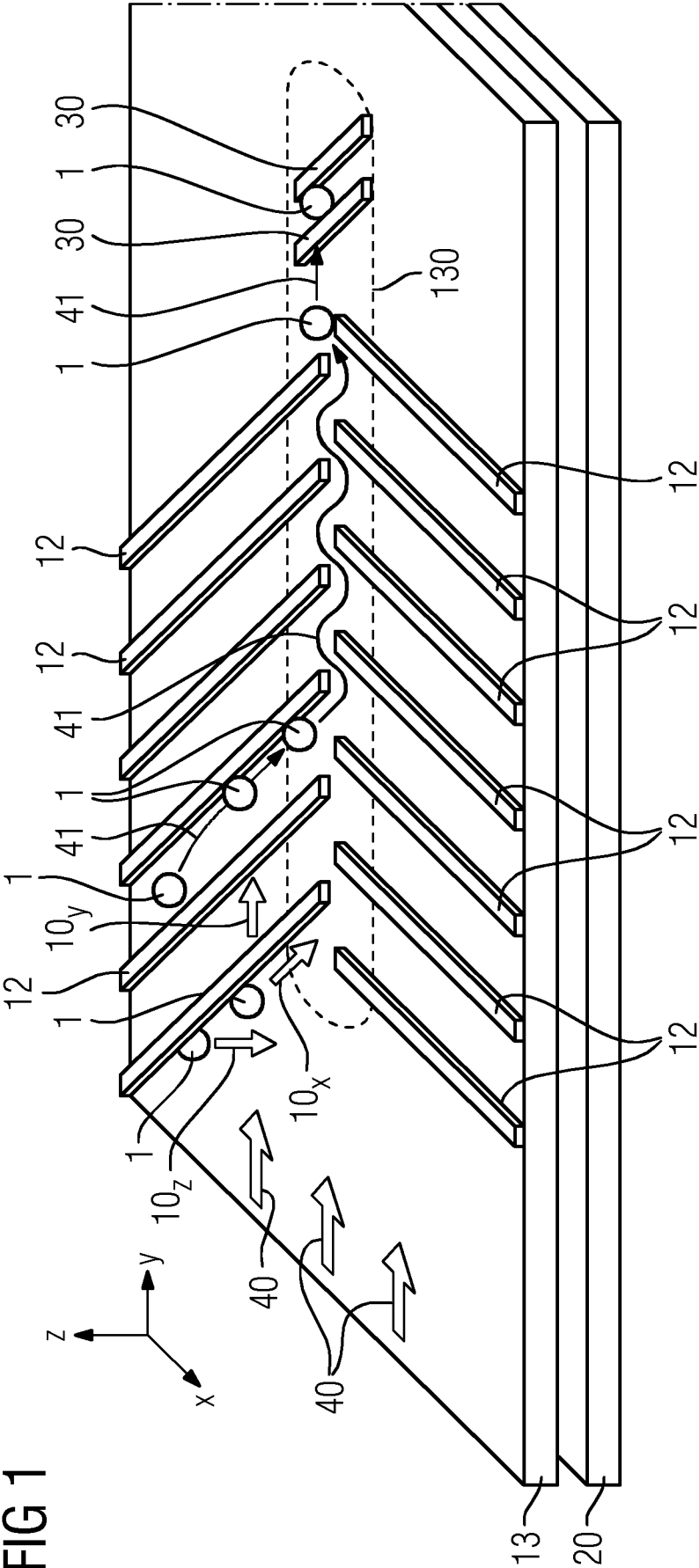


FIG 2

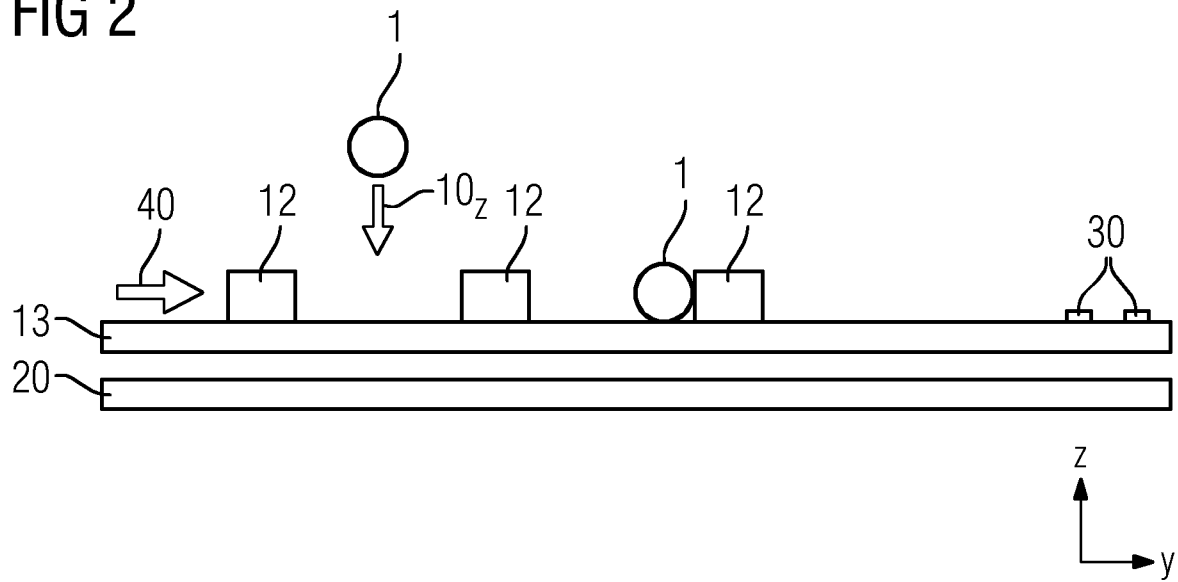
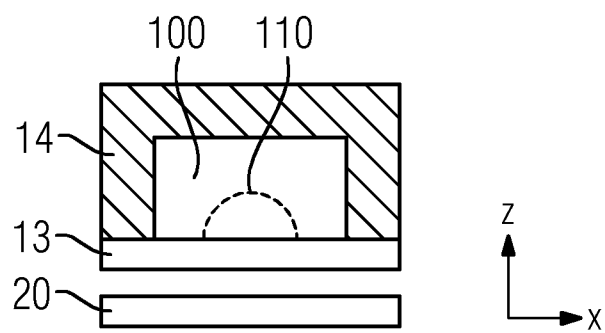


FIG 3



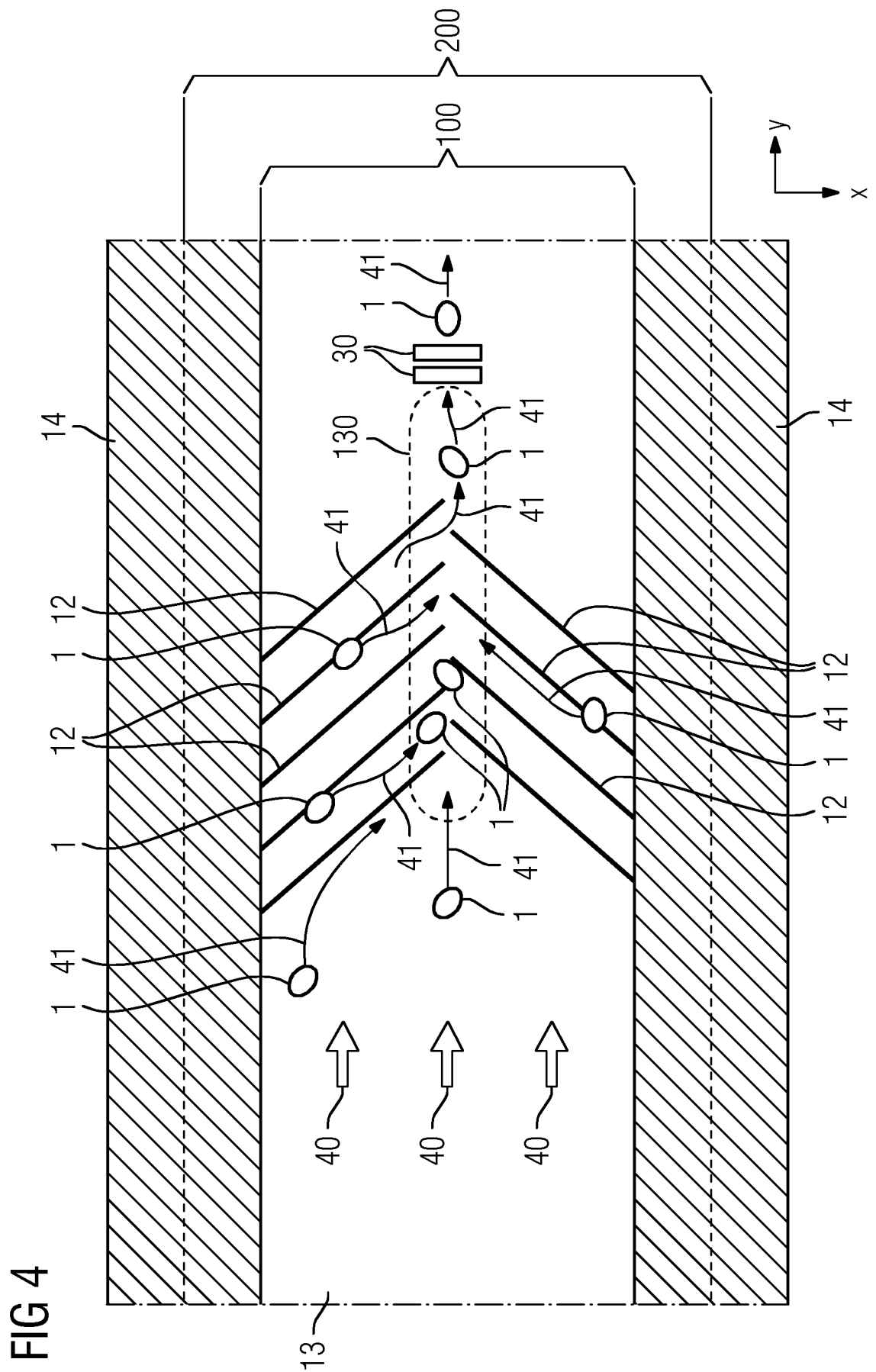


FIG 5

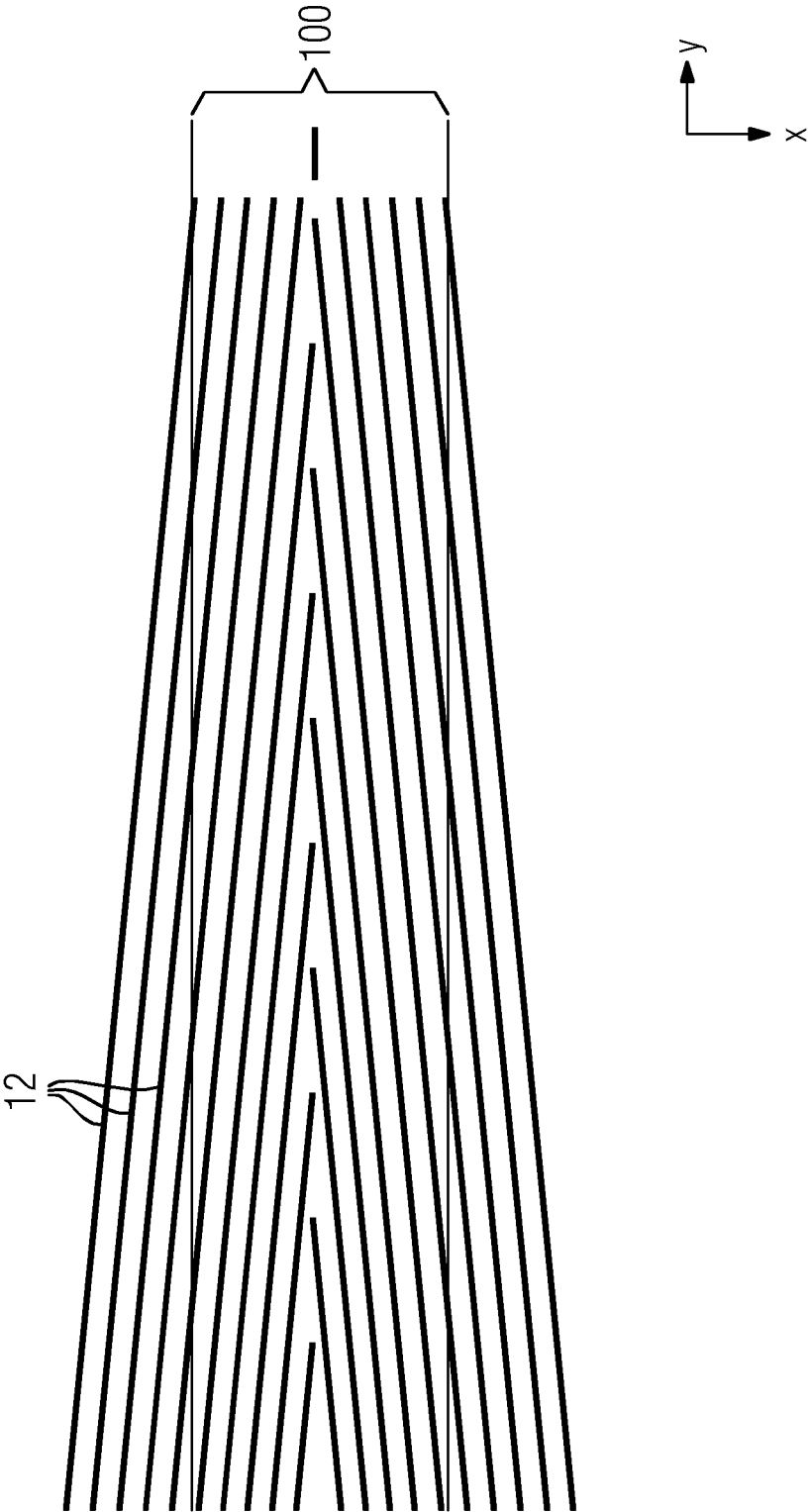


FIG 6

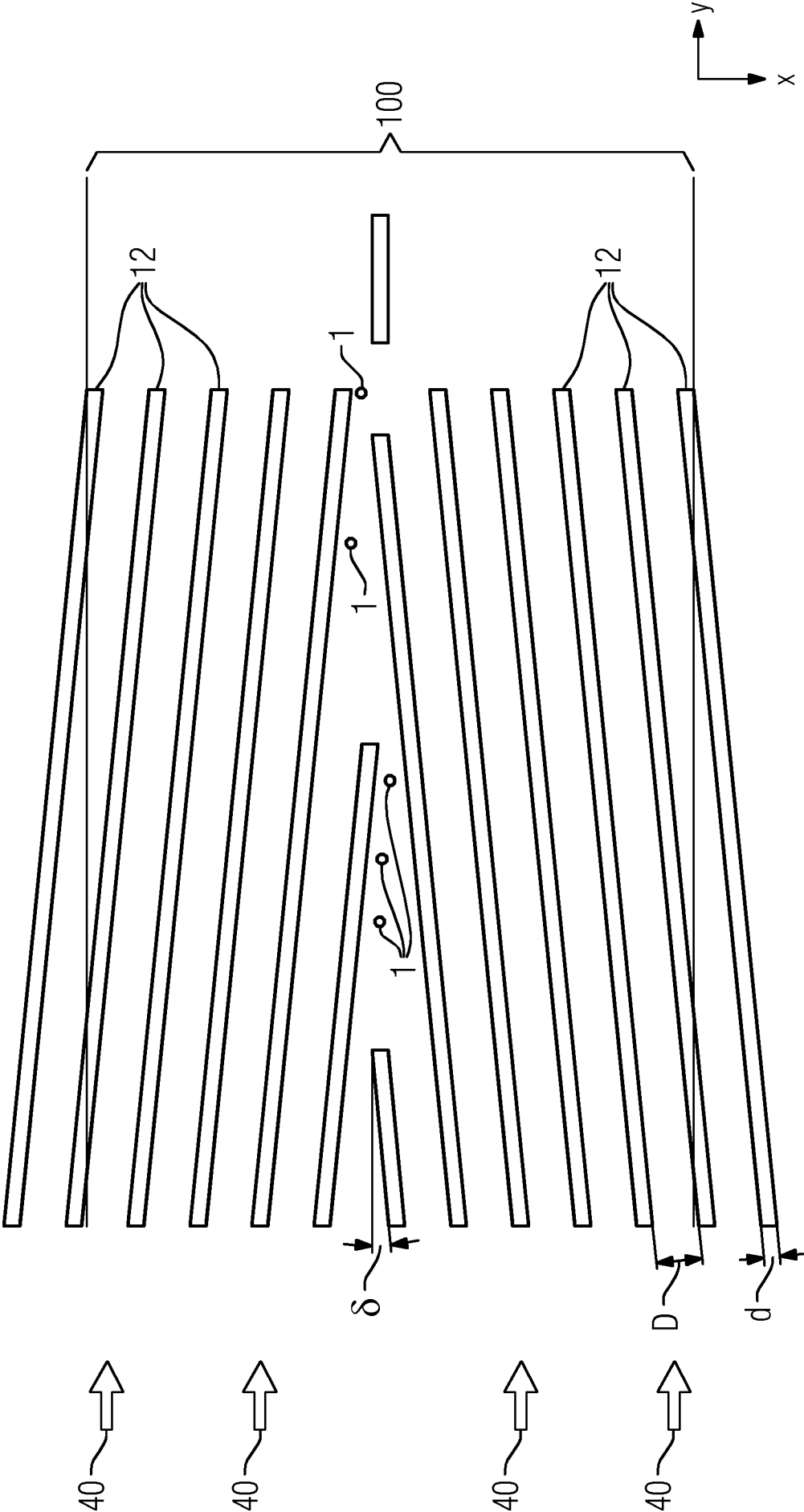
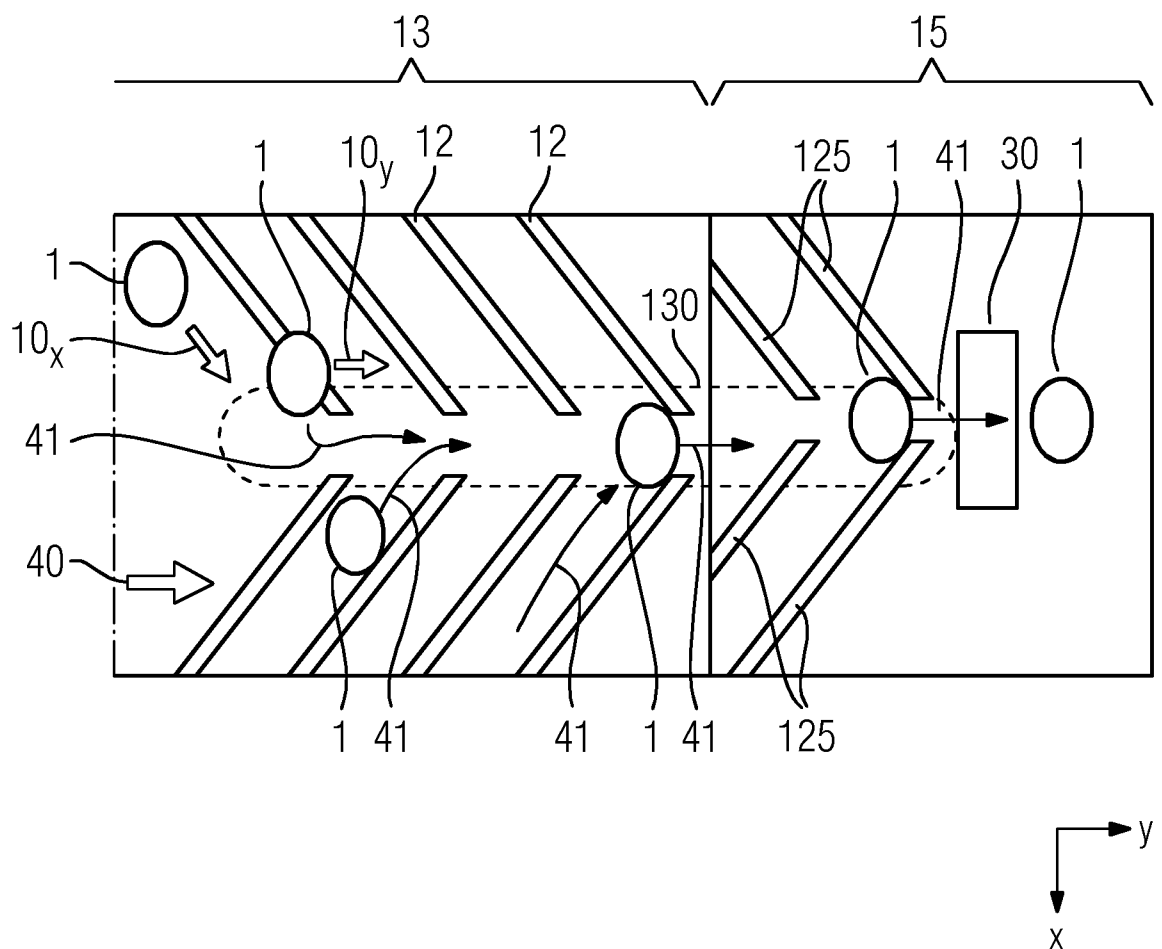


FIG 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/064470

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N15/14 G01N15/10 B01L3/00
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

B01L G01N B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2009/208372 A1 (MOTT DAVID [US] ET AL) 20 August 2009 (2009-08-20) paragraphs [0002], [0005], [0011] paragraph [0030] - paragraph [0040] paragraphs [0057] - [0059], [0063], [0078] ----- -/-	1,2,4-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 November 2012

Date of mailing of the international search report

30/11/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Tiede, Ralph

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/064470

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PETER B HOWELL ET AL: "Two simple and rugged designs for creating microfluidic sheath flow", LAB ON A CHIP, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY , vol. 8 1 January 2008 (2008-01-01), pages 1097-1103, XP007905108, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/B719381E Retrieved from the Internet: URL:http://www.rsc.org/ej/LC/2008/b719381e.pdf [retrieved on 2008-05-13] the whole document	1,2,4-10
X	----- US 2011/003303 A1 (PAGANO PAUL [US] ET AL) 6 January 2011 (2011-01-06) paragraphs [0009] - [0012], [0030], [0031] paragraphs [0051] - [0105] paragraph [0161]	1-13
X	----- US 2008/160630 A1 (LIU DAVID J [US] ET AL) 3 July 2008 (2008-07-03) paragraph [0056]	1-13
X	----- US 2008/124779 A1 (OH SANG-HYUN [US] ET AL) 29 May 2008 (2008-05-29) paragraphs [0001] - [0006] paragraphs [0047] - [0056], [0135]; figure 3 -----	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/064470

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2009208372 A1	20-08-2009	US 2009208372 A1 US 2012052521 A1	20-08-2009 01-03-2012
US 2011003303 A1	06-01-2011	CN 102713640 A EP 2440941 A2 US 2011003303 A1 WO 2010144745 A2	03-10-2012 18-04-2012 06-01-2011 16-12-2010
US 2008160630 A1	03-07-2008	NONE	
US 2008124779 A1	29-05-2008	EP 2086680 A2 US 2008124779 A1 US 2011014600 A1 US 2012108470 A1 US 2012115755 A1 WO 2008048616 A2	12-08-2009 29-05-2008 20-01-2011 03-05-2012 10-05-2012 24-04-2008

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/064470

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

INV. G01N15/14 G01N15/10 B01L3/00
ADD.

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

B01L G01N B03C

Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2009/208372 A1 (MOTT DAVID [US] ET AL) 20. August 2009 (2009-08-20) Absätze [0002], [0005], [0011] Absatz [0030] - Absatz [0040] Absätze [0057] - [0059], [0063], [0078] ----- -/-	1,2,4-10

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen ☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" frühere Anmeldung oder Patent, die bzw. das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. November 2012

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

30/11/2012

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Tiede, Ralph

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	PETER B HOWELL ET AL: "Two simple and rugged designs for creating microfluidic sheath flow", LAB ON A CHIP, ROYAL SOCIETY OF CHEMISTRY , Bd. 8 1. Januar 2008 (2008-01-01), Seiten 1097-1103, XP007905108, ISSN: 1473-0197, DOI: 10.1039/B719381E Gefunden im Internet: URL:http://www.rsc.org/ej/LC/2008/b719381e.pdf [gefunden am 2008-05-13] das ganze Dokument	1,2,4-10
X	US 2011/003303 A1 (PAGANO PAUL [US] ET AL) 6. Januar 2011 (2011-01-06) Absätze [0009] - [0012], [0030], [0031] Absätze [0051] - [0105] Absatz [0161]	1-13
X	US 2008/160630 A1 (LIU DAVID J [US] ET AL) 3. Juli 2008 (2008-07-03) Absatz [0056]	1-13
X	US 2008/124779 A1 (OH SANG-HYUN [US] ET AL) 29. Mai 2008 (2008-05-29) Absätze [0001] - [0006] Absätze [0047] - [0056], [0135]; Abbildung 3	1-13

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2012/064470

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 2009208372 A1	20-08-2009	US 2009208372 A1	20-08-2009
		US 2012052521 A1	01-03-2012

US 2011003303 A1	06-01-2011	CN 102713640 A	03-10-2012
		EP 2440941 A2	18-04-2012
		US 2011003303 A1	06-01-2011
		WO 2010144745 A2	16-12-2010

US 2008160630 A1	03-07-2008	KEINE	

US 2008124779 A1	29-05-2008	EP 2086680 A2	12-08-2009
		US 2008124779 A1	29-05-2008
		US 2011014600 A1	20-01-2011
		US 2012108470 A1	03-05-2012
		US 2012115755 A1	10-05-2012
		WO 2008048616 A2	24-04-2008
