

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 978**

51 Int. Cl.:

B01L 3/02 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2015 PCT/EP2015/054559**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132317**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2015 E 15708493 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2021 EP 3113883**

54 Título: **Sistema de clasificación de células que usa componentes micro fabricados**

30 Prioridad:

05.03.2014 US 201461948493 P

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

29.12.2021

73 Titular/es:

**MILTENYI BIOTEC B.V. & CO. KG (100.0%)
Friedrich-Ebert-Strasse 68
51429 Bergisch Gladbach, DE**

72 Inventor/es:

**KABAHA, EIAD;
PETERS, RALF-PETER;
PETH, CHRISTIAN;
MARTINEZ, NICHOLAS;
BÜSCHER, MARTIN;
FOSTER, JOHN y
BODDENBERG, JAN**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 887 978 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

Sistema de clasificación de células que usa componentes micro fabricados

Esta invención se refiere a un sistema de clasificación de células que usa un mecanismo de clasificación de células móvil, micro fabricado.

5 Antecedentes

Los sistemas (MEMS) microelectromecánicos son estructuras muy pequeñas, a menudo móviles, hechas sobre un sustrato usando técnicas de procesamiento litográfico de superficie o en masa, tales como aquellas que se usan para fabricar dispositivos semiconductores. Los dispositivos MEMS pueden ser accionadores, sensores, válvulas, pistones o interruptores móviles, por ejemplo, con dimensiones características de unas pocas micras a cientos de micras. Un interruptor MEMS móvil, por ejemplo, puede usarse para conectar uno o más terminales de entrada a uno o más terminales de salida, todos micro fabricados sobre un sustrato. Los medios de accionamiento del interruptor móvil pueden ser térmicos, piezoeléctricos, electrostáticos o magnéticos, por ejemplo. También se pueden hacer dispositivos MEMS que manipulen partículas que pasan por el dispositivo MEMS en una corriente de fluido.

Por ejemplo, un dispositivo MEMS puede ser una válvula móvil, usada como mecanismo de clasificación para clasificar diversas partículas de una corriente de fluido, como las células de la sangre. Las partículas se pueden transportar al dispositivo de clasificación dentro de la corriente de fluido encerrada en un micro canal, que fluye a presión. Al llegar al dispositivo de clasificación MEMS, el dispositivo de clasificación dirige las partículas de interés, tales como una célula madre sanguínea, a un receptáculo separado y dirige el resto de la corriente de fluido a un receptáculo de residuos.

Anteriormente, los clasificadores (FACS) de partículas existían usando clasificación de células activada por fluorescencia y se conocen como citómetros de flujo. Los citómetros de flujo son generalmente sistemas grandes y costosos que clasifican las células basándose en una señal de fluorescencia de una etiqueta fijada a la célula de interés. Las células se diluyen y suspenden en un fluido envolvente y después se separan en gotas individuales mediante una descompresión rápida a través de una boquilla. Después de la expulsión desde una boquilla, las gotas se separan electrostáticamente en diferentes recipientes, según la señal de fluorescencia de la etiqueta. Entre los problemas con estos sistemas se encuentran el daño celular o la pérdida de funcionalidad debido a la descompresión, los procedimientos de esterilización difíciles y costosos entre muestras, la incapacidad de reclasificar subpoblaciones según diferentes parámetros y la capacitación sustancial necesaria para poseer, operar y mantener estos grandes, costosos equipos. Por al menos estas razones, el uso de citómetros de flujo se ha restringido a grandes hospitales y laboratorios y la tecnología no ha sido accesible para entidades más pequeñas. Los sistemas de clasificación de células basados en MEMS pueden tener ventajas sustanciales sobre los citómetros de flujo en términos de coste, velocidad y tamaño. Se han concedido varias patentes que están dirigidas a tales dispositivos de clasificación de partículas basados en MEMS. Por ejemplo, la patente de EE. UU. nº. 6,838,056 (la patente '056) está dirigida a un dispositivo de clasificación de células basado en MEMS, la patente de EE. UU. nº. 7,264,972 b1 (la patente '972) está dirigida a un accionador micro mecánico para un dispositivo de clasificación de células basado en MEMS. La patente de EE. UU. nº. 7,220,594 (la patente '594) está dirigida a estructuras ópticas fabricadas con un aparato de clasificación de células MEMS, y la patente de EE. UU. nº. 7,229,838 (la patente '838) está dirigida a un mecanismo de accionamiento para operar un sistema de clasificación de partículas basado en MEMS. Además, las solicitudes de patente de EE. UU. nº. 13/374,899 (la solicitud '899) y 13/374,898 (la solicitud '898) proporciona detalles adicionales de otros diseños de MEMS. Se describen dispositivos adicionales de clasificación de partículas basados en MEMS en los documentos US 20120255373A1, EP2857099A1 y EP 2857100A1. Entre los problemas encontrados con el uso de dispositivos de micro fluidos en los sistemas de clasificación de células como se mencionó anteriormente, está la obstrucción de los pasos estrechos y la interfaz de estos pasos estrechos con el mundo macroscópico y el control del movimiento de estos dispositivos móviles muy pequeños.

Compendio

Se describe un sistema de clasificación de células que hace uso de un chip MEMS de clasificación de células micro fabricado. Los pasos en el chip MEMS se forman litográficamente y, por lo tanto, son muy pequeños. La obstrucción de estos pasos estrechos presenta un desafío significativo para el funcionamiento fiable a largo plazo. Además, estos pasos estrechos deben emparejarse a características macroscópicas mucho más grandes y manejar volúmenes pequeños de fluidos, particularmente al clasificar células poco comunes.

Objeto de la invención

El objeto de la invención era proporcionar un medio que previene la obstrucción de los pasos en un chip MEMS y al mismo tiempo es capaz de emparejar los pasos del chip MEMS a canales mucho más grandes de un depósito de fluido.

En el sistema descrito aquí, se utilizan diversos elementos de diseño novedosos para permitir tal sistema de clasificación de células MEMS. El mecanismo de clasificación puede ser una válvula de fluido MEMS formada sobre un sustrato de silicio, que se adhiere a un intercaldador y se instala en un cartucho desechable. El cartucho puede proporcionar todos los pasos de fluidos para la manipulación de la muestra de fluido y puede incluir depósitos más grandes (p, ej., depósitos de clasificación, muestras y residuos) para el almacenamiento de volúmenes de fluidos. A

continuación, se usa un intercalador de plástico para proporcionar las interconexiones entre los pasos microscópicos de la válvula de fluido MEMS y las características macroscópicas de los depósitos. La válvula de fluido MEMS, el intercalador y los depósitos pueden estar todos contenidos en un cartucho desechable, de modo que la esterilización del sistema de clasificación de células es sencilla, el cartucho simplemente se desecha.

- 5 Un electroimán especialmente diseñado puede proporcionar los campos electromagnéticos ubicados con precisión que provocan que el chip MEMS muy pequeño se mueva dentro de un sistema mucho más grande. Este electroimán minimiza el calor producido y, por lo tanto, mejora la eficiencia. Finalmente, se usa una formulación especial de materiales fluidos para reducir o eliminar las obstrucciones.

- 10 El cartucho desechable y el intercalador pueden incluir una serie de características novedosas, como un mezclador y regiones en forma de embudo que pueden ayudar en la manipulación de volúmenes pequeños de fluidos. El mezclador puede sumergirse en el depósito de muestra, lo que permite mezclar los contenidos. Pueden proporcionarse regiones en forma de embudo en el depósito de clasificación, el depósito de muestra y el depósito de residuos, para la recogida de volúmenes pequeños de fluidos.

- 15 En consecuencia, se describe un sistema de clasificación de células, que incluye una válvula de clasificación de células micro fabricada sobre un sustrato de silicio con canales micro fabricados que salen de la válvula de clasificación de células, un cartucho desechable que contiene un depósito de muestra, un depósito de clasificación y un depósito de residuos y un intercalador que proporciona comunicación de fluidos entre los canales micro fabricados en el sustrato de silicio y los depósitos en el cartucho desechable.

- 20 El sistema de clasificación de células puede incluir adicionalmente un electroimán con una punta ahusada, bobinas y núcleo magnético, en donde la forma ahusada sirve para concentrar las líneas de flujo producidas por las bobinas y el núcleo, y salir del electroimán en las proximidades de la punta.

Finalmente, se puede usar una ADN asa independiente de cationes como tampón en el que suspender las partículas objetivo, reduciendo o eliminando la obstrucción de los pequeños canales en el dispositivo.

Breve descripción de los dibujos

- 25 Se describen diversos detalles de ejemplo con referencia a las siguientes figuras, en donde:

La Fig. 1 es una ilustración esquemática de un clasificador de chips MEMS en una primera posición; La Fig. 2 es una ilustración esquemática de un clasificador de chips MEMS; La Fig. 3 es una ilustración esquemática de un sistema de clasificación de células MEMS de ejemplo que puede hacer uso del clasificador MEMS de las Figs. 1 y 2

- 30 La Fig. 4 es una vista despiezada de un cartucho desechable de ejemplo que puede usarse en el sistema de clasificación de células MEMS de la Fig. 3, que incluye un clasificador de chips MEMS y un intercalador.

La Fig. 5a es una vista lateral del ejemplo de cartucho desechable que se puede usar en el sistema de clasificación de células MEMS de la Fig. 3, que incluye un clasificador de chips MEMS y un intercalador. La Fig. 5b es una vista desde un extremo del cartucho desechable de ejemplo.

- 35 La Fig. 6 es otra vista lateral del cartucho desechable de ejemplo que se puede usar en el sistema de clasificación de células MEMS de la Fig. 3, que incluye un clasificador de chips MEMS y un intercalador.

La Fig. 7 es una vista en planta de un intercalador de ejemplo que puede usarse con el cartucho desechable de la Fig. 4;

- 40 La Fig. 8a es una vista en perspectiva del intercalador de ejemplo que puede usarse con el cartucho desechable de la Fig. 4, que muestra el lado que mira al cartucho; La Fig. 8b es una vista en sección transversal de un canal. La Fig. 8c es una ilustración en sección transversal de otra realización de un canal.

La Fig. 9 es una vista en perspectiva del lado anverso del intercalador de ejemplo;

La Fig. 10 es una vista en perspectiva del lado anverso del intercalador de ejemplo;

La Fig. 11 es una vista en perspectiva del lado anverso del intercalador de ejemplo;

- 45 La Fig. 12a es una vista en planta del electroimán objetivo que puede generar el campo magnético que puede activar el clasificador de chips MEMS desde la primera posición (Fig. 1) hasta la segunda posición; La Fig. 12b es una vista de cerca de la punta del imán. La Fig. 12c es una vista en perspectiva del electroimán objetivo.

Debería entenderse que los dibujos no están necesariamente a escala y que los números similares pueden referirse a características similares.

Descripción detallada

- 50 Se describen sistemas y métodos para clasificar partículas objetivo de materiales no objetivo en una corriente fluida.

Los sistemas y métodos hacen uso de una válvula móvil o mecanismo de clasificación micro fabricado (MEMS), que dirige la partícula objetivo desde un paso de entrada de muestra a un paso de clasificación, mientras permite que el material no objetivo fluya hacia un paso de residuos. Tanto los pasos de clasificación como los de residuos conducen a un depósito respectivo separado, el depósito de clasificación y el de residuos, y se almacenan allí hasta su eliminación.

Los depósitos de clasificación, muestras y residuos, junto con el clasificador de chips MEMS, pueden estar contenidos en un cartucho de plástico desechable. Este cartucho puede descartarse después de que se recojan los fluidos de los depósitos. Esto permite una carga muy reducida para esterilizar el sistema entre muestras. Los sistemas y métodos también pueden tener ventajas significativas en términos de coste, rendimiento, velocidad y complejidad. El sistema también puede ser sustancialmente más suave en el manejo de las células, de modo que la viabilidad de las células en el efluente mejora enormemente en comparación con los citómetros de flujo basados en gotas.

Debido a la naturaleza micro fluida de este sistema de clasificación de células, se toman medidas para reducir o eliminar la obstrucción, y para manejar los volúmenes pequeños de fluidos y controlar la válvula móvil muy pequeña. Se usa un intercalador para proporcionar las interconexiones entre los pasos microscópicos y las características macroscópicas. Finalmente, un electroimán especialmente diseñado proporciona los campos electromagnéticos ubicados con precisión que provocan que el chip MEMS muy pequeño se mueva dentro de un sistema mucho más grande. Este electroimán minimiza el calor producido y, por lo tanto, mejora la eficiencia. Cada una de estas características se describe más adelante.

Clasificador de células/chip MEMS

La Fig. 1 es un diagrama esquemático de un mecanismo de clasificación de células micro fabricado, el clasificador 10 de chips MEMS, que puede usarse en el sistema de clasificación de partículas descrito aquí. Los detalles del mecanismo de clasificación de células se pueden encontrar en la solicitud de patente de EE. UU. nº 13/998,095. Entre las características únicas del mecanismo 10 de clasificación de células micro fabricado está que el movimiento de la válvula 10 de clasificación de células es paralelo al plano de fabricación de la válvula. Además, el canal 140 de residuos es sustancialmente ortogonal al canal 120 de entrada de muestra y al canal 122 de salida de clasificación. Estas características permiten distintas ventajas en términos de velocidad y precisión, rendimiento de la válvula y facilidad de clasificación de micro fluidos.

Debería entenderse que el término "clasificador de chips" 10 es un término abreviado para una válvula 10 de clasificación de células micro fabricada, ya que un "chip" es un dispositivo micro fabricado sobre un sustrato. Cualquiera de los dos términos está destinado a designar una válvula móvil micro fabricada formada sobre una superficie de un sustrato, usando técnicas de fabricación MEMS, que, mediante su movimiento, es capaz de separar partículas objetivo del material no objetivo.

En la ilustración de la vista en planta de la Fig. 1, el clasificador de chips MEMS novedoso o la válvula 10 de clasificación de células está en la posición inactiva (no accionada). El clasificador 10 de chips puede incluir una válvula de fluidos micro fabricada o un miembro 110 móvil (área rayada) y una serie de canales 120, 122 y 140 de fluidos micro fabricados. El canal 140 de fluidos micro fabricados (mostrado como área 140 discontinua en la Fig. 1) sirve como canal de salida y puede estar ubicado directamente debajo de al menos una parte del miembro 110 micro fabricado y no es paralelo al plano de los canales 120, 122 de fluidos micro fabricados o el miembro 110 micro fabricado. El miembro 110 micro fabricado se fabrica y se mueve en una trayectoria paralela o dentro de este plano. Preferiblemente, el canal 140 de fluidos micro fabricados es ortogonal al plano de los canales 120, 122 de fluidos micro fabricados y a la trayectoria de movimiento del miembro 110 micro fabricado. La abertura del canal 140 de fluidos micro fabricados puede cubrir preferiblemente solaparse al menos una parte de la trayectoria de movimiento del miembro 110 micro fabricado, es decir, el área discontinua se superpone al miembro 110 micro fabricado en al menos una parte de su movimiento, como se muestra en la Fig. 1. Esta superposición puede permitir que exista una trayectoria de fluido entre el canal 120 de entrada y el canal 140 de salida cuando el miembro micro fabricado está en la posición de "residuo" o no accionado (Fig. 1), y esta trayectoria se cierra y las partículas se redirigen a la posición de "clasificación" o accionada. Como se describió anteriormente, esta arquitectura puede reducir la resistencia de los fluidos, aumentando de ese modo la velocidad del miembro 110 micro fabricado.

El miembro 110 móvil y los canales 120, 122 y 140 de fluidos micro fabricados pueden formarse en la superficie de un sustrato adecuado, tal como un sustrato de silicio, usando técnicas de fabricación litográfica MEMS como se describe con mayor detalle en la solicitud '095. El sustrato de fabricación puede tener un plano de fabricación en el que se forma el dispositivo y en el que se mueve el miembro 110 móvil.

Se puede introducir una corriente de muestra en el miembro 110 móvil micro fabricado mediante un canal 120 de entrada de muestra. El fluido de muestra se puede almacenar en un depósito 20 de muestra antes de la clasificación mediante el miembro 110 móvil. La corriente de muestra puede contener una mezcla de partículas, que incluye al menos una partícula deseada objetivo y una serie de otras partículas no objetivo no deseadas. Las partículas pueden estar suspendidas en un fluido. Por ejemplo, la partícula objetivo puede ser un material biológico como una célula madre, una célula cancerígena, un cigoto, una proteína, una célula T, una bacteria, un componente de la sangre, un fragmento de ADN, por ejemplo, suspendido en un fluido tampón como solución salina, o la química novedosa que se describe a continuación. El canal 120 de entrada puede formarse en el mismo plano de fabricación que el miembro 110 móvil, de manera que el flujo del fluido se encuentre sustancialmente en ese plano. El movimiento de la válvula

10 de clasificación de células también se encuentra dentro de este plano de fabricación. La decisión de clasificar/guardar o desechar/desperdiciar una partícula determinada puede basarse en cualquier número de señales distintivas. En una realización de ejemplo, la decisión se basa en una señal de fluorescencia emitida por la partícula, basada en una etiqueta fluorescente fijada a la partícula y excitada por un láser de iluminación. La región 200 de interrogación láser es la parte del paso de micro fluidos en la que se dirige un láser de iluminación o interrogación sobre la partícula objetivo, para distinguirla de los otros constituyentes de la muestra de fluido. Los detalles de este mecanismo de detección son bien conocidos en la bibliografía, y se comentan a continuación con respecto a la Fig. 3. Sin embargo, se pueden anticipar otros tipos de señales distintivas, incluida la luz dispersa o la luz dispersa lateral que puede basarse en la morfología de una partícula, o cualquier número de efectos mecánicos, químicos, eléctricos o magnéticos que pueden identificar una partícula como una partícula objetivo y, por lo tanto, clasificada o guardada, o una partícula no objetivo y, por lo tanto, rechazada o desechada de otro modo.

Con el miembro 110 móvil en la posición mostrada, la corriente de entrada pasa sin obstáculos a un canal 140 de salida de residuos que está fuera del plano del canal 120 de entrada y, por lo tanto, fuera del plano de fabricación del clasificador 10 de chips MEMS. Es decir, el flujo es desde el canal 120 de entrada al orificio 140 de salida, desde el que fluye sustancialmente verticalmente, y por lo tanto ortogonalmente con respecto al canal 120 de entrada. Este orificio 140 de salida conduce a un canal fuera del plano que puede ser perpendicular al plano del documento que muestra la Fig. 1. De manera más general, el canal 140 de salida de residuos no es paralelo a, al menos uno del plano del canal 120 de entrada o al canal 122 de clasificación, o al plano de fabricación del miembro 110 móvil. En una realización, los canales de clasificación y muestra pueden ser antiparalelos, es decir, el flujo en el canal de clasificación está en una dirección opuesta al flujo en el canal de muestra entrante.

En consecuencia, el sistema de clasificación de células puede incluir una válvula 10 de clasificación de células, que dirige las partículas objetivo desde un canal 120 de muestra a un canal 122 de clasificación formado en el sustrato de silicio y el material no objetivo desde el canal 120 de muestra a un canal 140 de salida de residuos también formado en el sustrato de silicio. La válvula 10 de clasificación de células también puede moverse en un plano paralelo a la superficie y dirigir las partículas no objetivo desde el canal 120 de muestra al canal 140 de residuos cuando la válvula 10 de clasificación de células micro fabricada está en una primera posición, y que dirige la otras partículas hacia el canal 122 de clasificación cuando están en una segunda posición, en donde el canal 122 de clasificación y el canal 140 de residuos son sustancialmente antiparalelos, y el canal 120 de muestra y el canal 140 de residuos son sustancialmente ortogonales. El canal 140 de salida de residuos puede tener un orificio, que puede ser un agujero formado en el sustrato de fabricación o en un sustrato de cobertura que está unido al sustrato de fabricación. Además, el miembro 110 móvil puede tener una superficie 112 de desvío curvada que puede redirigir el flujo de la corriente de entrada a una corriente de salida de clasificación. El contorno de la superficie 112 puede ser tal que redirija la corriente de muestra desde el canal 120 de entrada al canal 122 de clasificación en una posición, mientras permite que fluya al canal 140 de salida de residuos en otra posición. En consecuencia, al hacer que la superficie 112 se superponga al canal 120 de entrada, existe una ruta para que la corriente de entrada fluya directamente al canal 140 de salida de residuos cuando el miembro 110 móvil está en la posición de residuos no accionada, como se muestra en la Fig. 1. El canal 140 de salida de residuos puede conducir a un depósito 40 de residuos, que puede recoger el material no objetivo. El material 116 permeable magnéticamente incrustado en el miembro 110 móvil puede provocar su movimiento, y se describirá a continuación en la descripción de la Fig. 2.

La Fig. 2 es una vista en planta del clasificador 10 de chips MEMS. La superficie 112 de desvío curvada es un contorno de clasificación que redirige el flujo del canal 120 de entrada al canal 122 de salida de clasificación. El canal 122 de salida puede estar sustancialmente en el mismo plano que el canal 120 de entrada, de modo que el flujo dentro del canal 122 de clasificación también está sustancialmente en el mismo plano que el flujo dentro del canal 120 de entrada. Puede haber un ángulo α entre el canal 120 de entrada y el canal 122 de clasificación. Este ángulo puede tener cualquier valor hasta aproximadamente 90 grados. El accionamiento del miembro 110 móvil puede surgir de una fuerza del aparato 400 generador de fuerza, mostrado genéricamente en la Fig. 2. En algunas realizaciones, el aparato 400 generador de fuerza puede ser un electroimán, como se describió anteriormente. Sin embargo, debería entenderse que el aparato generador de fuerza también puede ser electrostático, piezoeléctrico o algún otro medio para ejercer una fuerza sobre el miembro 110 móvil, provocando que se mueva desde una primera posición (Fig. 1) a una segunda posición. El canal 122 de clasificación puede conducir a un depósito 22 de clasificación que recoge las partículas clasificadas objetivo como efluente de la válvula móvil. El canal 120 de entrada puede conducir la muestra de fluido desde un depósito 20 de muestra al canal 140 de residuos y al depósito 40 de residuos como se muestra en la Fig. 1, o al canal 122 de clasificación y al depósito 22 de clasificación.

En algunas realizaciones, el aparato 400 generador de fuerza puede incluir bobinas que generan un campo magnético, que después interactúan con el miembro 110 móvil. Para hacer que el miembro 110 móvil responda a tal fuerza electromagnética, puede tener incrustado un material magnéticamente permeable en la válvula 110 móvil. La extensión de este material 116 magnético incrustado puede estar justo dentro del borde del contorno del miembro 110 móvil, como se muestra mediante las líneas discontinuas en las Figs. 1 y 2.

Debería entenderse que un material magnéticamente permeable significa cualquier material que sea capaz de soportar la formación de un campo magnético dentro de sí mismo. En otras palabras, la permeabilidad de un material es el grado de magnetización que obtiene el material en respuesta a un campo magnético aplicado.

Los términos "material permeable" o "material con alta permeabilidad magnética" como se usan en el presente documento debería entenderse como un material con una permeabilidad que es grande en comparación con la permeabilidad del aire o el vacío. Es decir, un material permeable o un material con alta permeabilidad magnética es un material con una permeabilidad relativa (en comparación con el aire o el vacío) de al menos aproximadamente 100, es decir, 100 veces la permeabilidad del aire o el vacío, que es aproximadamente $1,26 \times 10^{-6} \text{ H} \cdot \text{m}^{-1}$. Existen muchos ejemplos de materiales permeables, que incluyen aleaciones de cromo (Cr), cobalto (Co), níquel (Ni) y hierro (Fe). Un material permeable popular se conoce como Permalloy, que tiene una composición de entre aproximadamente un 60% y aproximadamente un 90% de Ni y un 40% y un 10% de hierro. La composición más común es 80% de Ni y 20% de Fe, que tiene una permeabilidad relativa de aproximadamente 8.000. En consecuencia, el miembro 110 móvil puede tener un material de Permalloy incrustado 116 en el miembro 110 móvil y posteriormente aplanado de modo que el perfil de la válvula móvil permanezca plano. Se pueden encontrar detalles adicionales sobre la fabricación de tales características permeables en la solicitud de patente '095.

Es bien sabido por la magnetostática que los materiales permeables son atraídos hacia áreas en las que se concentran las líneas de flujo magnético, con el fin de reducir la reluctancia de la trayectoria proporcionada por el material permeable al flujo. Por consiguiente, un gradiente en el campo magnético impulsa el movimiento del miembro 110 móvil debido a la presencia de material 116 permeable incrustado, hacia áreas que tienen una alta concentración de flujo magnético. Es decir, el miembro 110 móvil con material 116 permeable incrustado será atraído en la dirección del gradiente positivo en el flujo magnético. Un diseño de núcleo novedoso se describe a continuación con respecto a las Fig. 10a-10c, que concentra las líneas de flujo en un área muy específica, para optimizar el control sobre el miembro 110 móvil.

Debería entenderse que la realización magnetostática descrita anteriormente es solo uno de una serie de mecanismos de accionamiento que se pueden usar para mover la válvula de clasificación de células o el clasificador 10 de chips. De manera más general, el sistema de clasificación de células se puede construir con una válvula 10 de clasificación de células, en donde cuando la válvula 10 de clasificación de células está en una primera posición, se forma un paso entre el canal 120 de muestra y el canal 140 de residuos. Cuando la válvula 10 de clasificación de células está en la segunda posición, se forma un paso entre el canal 120 de muestra y el canal 122 de clasificación. La válvula 10 de clasificación de células puede moverse desde la primera posición a la segunda posición en respuesta a la aplicación de una fuerza, y esa fuerza puede ser al menos una mecánica, electrostática, magnetostática, piezoeléctrica y electromagnética. En la realización electrostática, se incrusta un material magnético permeable en el miembro móvil de la válvula 10 de clasificación de células micro fabricada, y se proporciona una fuente de flujo 400 magnético. El flujo magnético interactúa con el material 116 magnético permeable incrustado para mover la válvula 10 de clasificación de células micro fabricada, por lo que la válvula de clasificación de células micro fabricada se mueve desde la primera posición a la segunda posición cuando se activa la fuente de flujo 400 magnético.

Detección celular

La Fig. 3 es una ilustración esquemática del sistema 1 de clasificación de células que puede usar pasos de micro fluidos, un clasificador 10 de chips MEMS alojado en un cartucho 1000 desechable y un aparato 400 generador de flujo. Lo que sigue es una descripción de algunos otros componentes del sistema y cómo interactúan con el clasificador 10 de chips MEMS. En particular, la Fig. 3 muestra la trayectoria óptica del láser interrogador para la región 200 de interrogación, y el control del flujo de fluido en los canales 120-140 y el control del clasificador 10 de chips MEMS. Después de la descripción del nivel del sistema, el análisis pasará a las características únicas del sistema 1 que permiten que el sistema 1 de micro fluidos funcione de una manera precisa, fiable y predecible.

Como se muestra en la Fig.3, el clasificador 10 de chips MEMS micro fabricado puede alojarse en un cartucho 1000 desechable, que puede cargarse en una plataforma móvil y orientarse con respecto a la óptica 2100 de detección y los láseres 2400 de interrogación en el sistema 1 de clasificación de células. El fluido a continuación fluye a través del clasificador 10 de chips MEMS desde depósitos de fluido también alojados en el cartucho 1000 desechable a través de una serie de pasos como se describirá a continuación con respecto a las Figs. 4-9.

En el funcionamiento normal del sistema 1, la partícula objetivo puede ser una célula particular, como una célula madre, o una célula cancerígena, que se ha etiquetado con un marcador fluorescente. Este marcador emite fotones que tienen una energía particular cuando se irradia con un láser 2400 que opera a una longitud de onda predefinida. Por consiguiente, en este sistema de clasificación de células, una fuente 2400 de láser puede ser dirigida por un espejo 2250 giratorio a través de la óptica 2100 de detección/recogida a la región 200 de interrogación láser que se mostró en las Figs. 1 y 2. El eje óptico de la óptica 2100 de detección/recogida y la fuente 2400 de láser pueden ser colineales, al menos en una parte de la trayectoria óptica. Por lo tanto, la orientación de la aplicación del láser y la detección óptica a lo largo de este eje óptico puede ser perpendicular u ortogonal al plano de fabricación del sustrato, ortogonal al plano de movimiento de la válvula 110 móvil y ortogonal al flujo del fluido de muestra a través de la región de detección.

La fluorescencia emitida por las partículas irradiadas puede conformarse mediante la óptica 2100 de detección/recogida y separarse mediante espejos 2200 dicróicos y dirigirse a un banco de fotodetectores 2300. Una pluralidad de fotodetectores puede acomodar múltiples longitudes de onda de luz emitida, para la detección multiparamétrica. La señal enviada por los fotodetectores 2300 indica la presencia o ausencia de la partícula objetivo en la región 200 de interrogación láser. La señal puede entregarse a un controlador 2900, que gestiona la sincronización relativa de los componentes en el sistema 1 de clasificación de partículas, y recoge los datos. El

controlador 2900 puede ser un ordenador de uso general o un circuito especializado o ASIC. Tras la detección de la partícula objetivo, el controlador 2900 genera una señal que activa el aparato 400 generador de fuerza o generador de flujo. El controlador 2900 también puede proporcionar el control de fluidos al clasificador 10 de chips MEMS, a través de uno o más mecanismos neumáticos, hidráulicos, basados en pistones o basados en fuerzas mecánicas que se ilustran genéricamente mediante los medios 2500 de control de fluido. La velocidad a la que se detectan partículas puede ser monitorizada por el controlador 2900, que puede mantener los medios 2500 de control de fluido.

El aparato 400 generador de fuerza es un dispositivo que provoca que surja una fuerza en el propio miembro 110 móvil, provocando el movimiento del miembro móvil. Este aparato 400 generador de fuerza puede no estar acoplado mecánicamente directamente al dispositivo 10 de manipulación de partículas MEMS, como se indica con la línea discontinua en la Fig. 3. Por ejemplo, el aparato 400 generador de fuerza puede ser una fuente de flujo magnético que provoca que surja una fuerza magnetostática en un material 116 permeable incrustado en el miembro 110 móvil MEMS de la válvula 10 de clasificación de células como se describió anteriormente. Por consiguiente, el aparato 400 de generación de flujo puede ser un electroimán con un núcleo magnético y bobinados. Esta fuerza puede tirar del miembro 110 móvil hacia el aparato 400 generador de fuerza, abriendo el canal 122 de clasificación y cerrando el canal 140 de residuos, como se muestra en las Figs. 1 y 2. Es importante destacar que el aparato 400 generador de fuerza puede residir en el sistema 1 de clasificación de partículas, en lugar de en el clasificador 10 de chips MEMS. Como se mencionó anteriormente, esto puede reducir el coste y complejidad del clasificador 10 de chips MEMS, que puede estar alojado en la parte 1000 desechable del sistema 1. En el sistema compacto que se muestra en la Fig. 3, es importante que el aparato 400 generador de fuerza no genere un calor excesivo. Como se mencionó anteriormente, debido al tamaño muy pequeño del clasificador 10 de chips MEMS, el aparato 400 generador de fuerza también puede necesitar generar líneas de flujo que se concentran en un área pequeña. Los detalles en cuanto al diseño de un nuevo aparato 400 generador de flujo que puede ser adecuado en esta aplicación se analizan a continuación con respecto a las Figs. 10a-10c.

También se puede incluir otro láser 2410 opcional para proporcionar un segundo canal óptico en el sistema 1 de clasificación de células.

Como se mencionó, la región 200 de interrogación láser es la parte del paso de micro fluidos en la que el láser 2400 se dirige sobre la partícula objetivo, para distinguirla de los otros constituyentes de la muestra de fluido.

Al pasar a través de la región 200 de detección, el detector 2300 genera una señal que indica que una partícula objetivo está presente en la región 200 de interrogación. Después de un retraso conocido, el controlador 2900 genera una señal que indica que la puerta de clasificación, es decir el miembro 110 móvil de la válvula 10 de clasificación de células se va a abrir, con el fin de separar la partícula objetivo que se detectó, de los otros componentes en la corriente de fluido. El miembro 110 móvil de la válvula 10 MEMS puede comprender materiales 116 magnéticos permeables como se mencionó anteriormente, de modo que la fuerza magnética pueda surgir en él en presencia de un campo magnético. Cuando la señal es generada por el controlador 2900, surge una fuerza en el material 116 permeable magnéticamente embebido que atrae la válvula 110 móvil hacia el aparato 400 generador de fuerza. Este movimiento puede cerrar el canal 140 de residuos y redirigir la partícula objetivo a un canal 122 de clasificación. La muestra clasificada se recoge posteriormente desde un depósito de clasificación en el extremo del canal 122 de clasificación, que contiene la muestra clasificada. Como se mencionó anteriormente, el controlador 2900 también puede controlar las velocidades de flujo en función de la velocidad a la que se registran los eventos de clasificación.

Circuito de retroalimentación

Un medio 2500 de control de fluido puede controlar la dirección y velocidad del fluido que fluye a través de los canales de la válvula 10 de clasificación de células de chip MEMS. Los medios 2500 de control de fluido pueden controlarse basándose en una serie de criterios como se describe a continuación. Los medios 2500 de control de fluido pueden incluir válvulas neumáticas, hidráulicas y/o unidireccionales, y/o pueden incluir un pistón o una bomba y los pasos de fluido asociados. Durante el funcionamiento normal, el flujo puede ser controlado por los medios 2500 de control de fluido en un circuito de retroalimentación con el controlador 2900 para mantener constante la velocidad de célula, la presión del fluido o la velocidad de eventos, por ejemplo.

En una realización adicional, el sistema 1 de clasificación de células puede comprender un circuito de retroalimentación para prevenir la obstrucción de los canales por las células u otro material sólido suspendido en el fluido. Las células biológicas tienden especialmente a adherirse a las superficies, bordes o desvíos del canal, reduciendo de ese modo el flujo de líquido a través del sistema y/o el rendimiento general de clasificación de las células. El circuito de retroalimentación puede consistir en al menos los medios 2500 de control de fluido, tales como una bomba y el controlador 2900.

El controlador 2900 puede detectar una obstrucción inminente monitoreando la presión del fluido y/o la velocidad de la célula dentro del sistema. Si la presión del fluido y/o la velocidad de la célula caen por debajo de un umbral predefinido, puede ser indicativo de una obstrucción inminente. El controlador 2900 puede aumentar la velocidad de bombeo hasta que la presión del fluido y/o la velocidad de la célula alcancen nuevamente el umbral. La presión del fluido se puede monitorear mediante un detector apropiado y la velocidad de la célula se puede deducir monitoreando la velocidad de eventos en el canal óptico. Preferiblemente, la velocidad de la célula puede estar entre 0,2 y 10 m/s, y puede ser constante dentro de +/- 0,2 m/s. Por consiguiente, el umbral que activa el circuito de retroalimentación puede

ser una reducción de la velocidad de la célula en aproximadamente 0,2 m/s o el equivalente en pérdida de presión. Debería entenderse que los detalles proporcionados aquí son solo a modo de ejemplo, y que la selección de tales parámetros operativos dependerá de las características específicas de la aplicación.

Al final de una operación de clasificación, cuando el volumen de muestra que se va a clasificar está casi agotado, el controlador 2900 en concierto con los medios 2500 de control de fluido pueden invertir el flujo de fluido en los micro canales, manteniendo de ese modo los pasos húmedos, como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. nº de serie 14/167,566, presentada el 29 de enero de 2014. El sistema 1 también puede tener los medios para evaluar la efectividad del proceso de clasificación invirtiendo el flujo a través de la región 200 de interrogación láser, como se describe en detalle en la solicitud de patente de EE. UU. nº de serie 13/104,084, presentada el 12 de diciembre de 2013.

Por consiguiente, el sistema 1 de clasificación de células descrito aquí puede incluir un medio 200 de interrogación que comprende un láser en un sistema de fluorescencia inducida basado en láser, en donde se fija una etiqueta fluorescente a una partícula objetivo y emite una señal fluorescente cuando se irradia con el láser. El sistema puede incluir un cartucho 1000 desechable que está configurado para ser aceptado en el sistema 1 de clasificación de células en una plataforma ubicable, en la que puede posicionarse con respecto a al menos una fuente 2400 láser y al menos un detector 2300 óptico. El sistema 1 de clasificación de células puede incluir adicionalmente un ordenador 2900 que está en comunicación con al menos una fuente 2400 láser, al menos una fuente 2100 óptica y la válvula 10 de clasificación de células, para separar las partículas objetivo del material no objetivo.

Lo que sigue es una descripción de los aspectos habilitadores del sistema 1 de clasificación de células MEMS, en particular, qué aspectos permiten que el fluido fluya hacia y desde el clasificador 10 de chips MEMS de una manera repetible y fiable, desde depósitos macroscópicos hasta el clasificador 10 de chips MEMS, y para controlar el clasificador 10 de chips MEMS muy pequeño.

Cartucho desechable como depósito de muestra

La Fig. 4 es una vista en perspectiva despiezada de un cartucho 1000 desechable de ejemplo que puede usarse en el sistema de clasificación de partículas mostrado en la Fig. 3. El cartucho 1000 desechable puede incluir varias piezas ensamblables, tales como la parte superior 1135 y la base 1130.

El cartucho 1000 desechable puede albergar el clasificador 10 de chips MEMS y proporcionar almacenamiento en depósitos de fluido. En consecuencia, la base 1130 del cartucho 1000 desechable puede tener una pluralidad de huecos o compartimentos formados en ella, incluido el depósito 20 de muestra, el depósito 22 de clasificación y el depósito 40 de residuos. Como se describe más adelante, la muestra que se va a clasificar puede almacenarse en el depósito 20 de muestra, el efluente clasificado en el depósito 22 de clasificación y el efluente residual en el depósito 40 de residuos. Los pasos de fluidos entre estos huecos pueden estar todos dispuestos en el intercalador 1400 y/o en el clasificador 10 de chips MEMS. En consecuencia, el intercalador 1400 puede proporcionar una trayectoria de fluido de clasificación entre un depósito 22 de clasificación en el cartucho desechable y el canal 122 de clasificación en el sustrato de silicio, una trayectoria de fluido residual entre un depósito 40 de residuos en el cartucho desechable y el canal 140 de residuos, y una trayectoria de fluido de muestra entre el canal 120 de muestra y un depósito 20 de muestra.

Debería entenderse que el término fluido "de clasificación", muestra "de clasificación" o depósito "de clasificación" puede referirse a una colección recogida de partículas objetivo. El fluido de "residual", la muestra de "residuo" o el depósito de "residuo" pueden referirse a una recogida de materiales no objetivo en la corriente de fluido. Otro lenguaje equivalente es "fracción positiva" para referirse a la muestra de clasificación y "fracción negativa" para referirse al material no objetivo. Por consiguiente, en el texto siguiente, la parte "de clasificación" puede ser equivalente a la "fracción positiva" y referirse a una recogida de partículas objetivo, y "residuo" puede referirse a la fracción negativa y a una recogida de materiales no objetivo.

Entre la parte superior 1135 y la base 1130 pueden disponerse una serie de filtros 1180 para proteger la muestra de la contaminación o los desechos. Estos filtros 1180 pueden ser Sterifiltros de 0,20 micrones, por ejemplo. Los filtros 1180 pueden ubicarse directamente encima de los diversos depósitos 20, 22 y 40 de fluido. También puede haber filtros en línea dentro de los canales de fluido, que son para atrapar desechos en el fluido y pueden tener un tamaño de poro de aproximadamente 20 micras.

El depósito 20 de muestra, el depósito 22 de clasificación y el depósito 40 de residuos también pueden incluir características en forma de embudo que permiten la manipulación de volúmenes pequeños de fluidos. El depósito 22 de clasificación puede contener una estructura similar a un sifón que se describe a continuación con respecto a la Fig. 7, donde se ilustra con mayor detalle. Sin embargo, el depósito 20 de muestra y el depósito 40 de residuos también pueden contener características que ayuden a la manipulación de volúmenes pequeños. Esta característica puede ser una superficie contorneada. Debería entenderse que una característica en forma de embudo significa una estructura generalmente cónica que está conformada para recoger volúmenes pequeños de fluido que corren por la pared del depósito. Tanto el depósito 20 de muestra como el depósito 40 de residuos pueden incluir tales características 21 y 41 en forma de embudo, respectivamente. Por lo tanto, el sistema 1 de clasificación de células descrito aquí puede incluir un depósito 20 de muestra y un depósito 40 de residuos, en donde el depósito 20 de muestra comprende adicionalmente una característica 21 en forma de embudo formado en la pared del depósito 20 de muestra, que recoge

volúmenes más pequeños de fluido de muestra, en donde el volumen más pequeño de fluido de muestra es menor que aproximadamente el 10% del volumen total de fluido del depósito 20 de muestra. De forma similar, el depósito 40 de residuos puede comprender adicionalmente una característica 41 en forma de embudo formado en la pared del depósito 40 de residuos, que recoge volúmenes más pequeños de fluido residual, en donde el volumen más pequeño de fluido residual es menor que aproximadamente el 10% del volumen total de fluido del depósito 40 de residuos.

Hélice magnetizada

Dentro del depósito 20 de muestra y encerrado entre la parte superior 1135 y la base 1130 puede haber una hélice 1150 magnetizada y una aguja 1160 que puede actuar como un árbol para la hélice 1150 magnetizada. Tras la exposición a un campo magnético circulante, la hélice 1150 magnetizada puede rotar sobre el árbol 1160, provocando que el contenido del depósito 20 de muestra se mezcle u homogeneice. Finalmente, se puede colocar un filtro 1170 de 0,20 micrones sobre el depósito 22 de clasificación, para proteger el contenido clasificado de la contaminación del entorno ambiental. Alternativamente, la hélice 1150 puede ser impulsada directamente por un acoplamiento mecánico a un pequeño motor, que puede provocar la rotación de la hélice 1150 y, por lo tanto, la mezcla de los contenidos del depósito 20 de muestra. Los detalles de la construcción de los elementos de mezcla se pueden mostrar con más detalle en la Fig. 6, y se analiza a continuación con respecto a esa figura.

El fluido de muestra puede introducirse en el depósito 20 de muestra con una pipeta, o con una jeringa y un émbolo (no mostrados) a través de los puertos 1111 de acceso mostrados, después de lo que el cartucho 1000 se puede sellar con elementos 1110 de sellado de cierre luer macho. También se pueden usar técnicas de sellado alternativas, como tornillos de mariposa. Alternativamente, el cartucho 1000 puede suministrarse con la muestra de fluido ya cargada en el mismo.

La Fig. 5 es una vista lateral del cartucho 1000 desechable ensamblado, que muestra el depósito 20 de muestra, el depósito 22 de clasificación y el depósito 40 de residuos. En la vista ensamblada se muestran las ubicaciones relativas del clasificador 10 de chips MEMS y el intercalador 1400 con respecto a la base 1130 del cartucho. Cabe señalar que la Fig. 5 está invertida en comparación con la Fig. 4, de modo que el depósito 20 de muestra, que se muestra en el lado izquierdo del cartucho en la Fig. 4, ahora está ubicado en el lado derecho en Fig.5, al igual que los canales asociados, agitador, etc.

Intercalador

Se proporciona un intercalador 1400 para proporcionar una región de transición entre las características micro fabricadas muy finas del clasificador 10 de chips MEMS y los volúmenes de fluido mucho mayores de los depósitos 20, 22 y 40. El intercalador 1400 puede estar formado de plástico mediante, por ejemplo, moldeo por inyección y puede tener tolerancias intermedias del orden de +/- 10 mm. Una característica del intercalador 1400 es proporcionar una transición entre las estructuras muy pequeñas del dispositivo 10 MEMS y las estructuras macroscópicas gruesas del cartucho 1000 y los depósitos 20, 22 y 40. En consecuencia, el sistema 1 de clasificación de células descrito en el presente documento incluye un válvula 10 de clasificación de células micro fabricada sobre una superficie de un sustrato de silicio, con canales micro fabricados que conducen desde la válvula 10 de clasificación de células, en donde la válvula 10 de clasificación de células separa las partículas objetivo del material no objetivo, un cartucho 1000 desechable que contiene un depósito 20 de muestra, un depósito 22 de clasificación y un depósito 40 de residuos; y un intercalador 1400 que proporciona una comunicación de fluidos entre los canales micro fabricados en el sustrato de silicio y los depósitos en el cartucho desechable.

Debido a que el intercalador 1400 puede estar hecho con tolerancias razonablemente finas (+/- 10 mm), es posible alinear los pasos en el intercalador 1400 con pasos en el chip MEMS cuando las aberturas de los canales son del orden de aproximadamente 300 micrones. Aunque las anchuras de los canales que conducen hacia y desde la válvula 110 móvil pueden ser sustancialmente más pequeñas, del orden de 150 micras, las aberturas que introducen el fluido en los canales pueden estar hechas cercanas a esta escala. Las aberturas se muestran en la Fig.6.

Como se muestra en el inserto de la Fig. 6, los agujeros pasantes tales como el 1420 en el intercalador 1400 pueden tener una forma ahusada, con un diámetro del orden de 300 micrones en la parte superior. Esta abertura puede estrecharse hasta un diámetro de aproximadamente 150 micrómetros en la base donde se encuentra con la abertura correspondiente del canal 20 de clasificación del clasificador 10 de chips MEMS.

La Fig. 6 también ilustra los detalles del mecanismo de mezcla, que puede incluir una hélice 1150 montada en un árbol 1160 de rotación. El árbol puede extenderse desde la superficie superior 1135 del cartucho a través de una estructura portante que permite rotar al árbol libremente. Si la hélice 1150 contiene componentes magnéticos, la acción de mezcla puede lograrse mediante un campo magnético de rotación externo al cartucho 1000. El campo aplicado puede impulsar el movimiento de la hélice, provocando que rote sobre el árbol 1160. Alternativamente, un acoplamiento mecánico puede acoplar un motor que a continuación hace rotar el árbol 1160. En consecuencia, el sistema 1 de clasificación de células puede incluir un cartucho 1000 desechable, que puede incluir adicionalmente una hélice en un árbol, en donde la hélice 1150 está dispuesta en el depósito 20 de muestra. La hélice 1150 puede comprender material magnético, y que interactúa con un campo magnético variable que hace girar la hélice 1150 sobre su árbol 1160, mezclando de ese modo el contenido del depósito 20 de muestra. Alternativamente, el sistema 1 de clasificación de células puede incluir una hélice 1150 que rota mediante un acoplamiento mecánico que hace rotar el árbol 1160 y es

impulsado por un motor.

El intercalador 1400 puede tener pasos formados en él, 1120, 1122 y 1140, mostrados en la Fig. 7, que pueden corresponder a los canales 120, 122 y 140 mostrados en las Figs. 1 y 2. Es decir, el paso 1120 puede emparejarse con el paso 120 en el clasificador 10 de chips MEMS, para proporcionar una vía de fluidos desde el depósito 20 de muestra al clasificador 10 de chips MEMS. Aguas abajo del clasificador 10 de chips MEMS, el intercalador 1400 puede proporcionar una vía de fluidos desde la válvula 110 móvil al depósito 22 de clasificación (en el cartucho) a través del canal 122 de clasificación (en el chip) y 1122 (en el intercalador). De manera similar, el intercalador 1400 puede proporcionar una vía de fluidos desde la válvula 110 móvil al depósito 40 de residuos (en el cartucho) a través del canal 140 de residuos (en el chip) y 1140 (en el intercalador). En otras palabras, el intercalador 1400 puede proporcionar una trayectoria de fluido de clasificación entre un depósito 22 de clasificación en el cartucho 1000 desechable y el canal 122 de clasificación en el sustrato de silicio, una trayectoria de fluido de residuo entre un depósito 40 de residuos en el cartucho 1000 desechable y el canal 140, y una trayectoria de fluido de muestra entre el canal 120 de muestra y un depósito 20 de muestra.

Otro propósito del intercalador 1400 es proporcionar una región de recogida para posiblemente volúmenes pequeños de material clasificado. Por ejemplo, dado que las células objetivo pueden ser poco comunes, tales como las células madre, el volumen de fluido recogido en el depósito 22 de clasificación también puede ser bastante pequeño y en proporción a la frecuencia de las células objetivo en la muestra. Por consiguiente, se pueden esperar volúmenes tan bajos como unos pocos microlitros. El intercalador 1400 puede proporcionar una región en la que el efluente clasificado es sifonado, para una recogida fácil con una pipeta pequeña. Esta región 1450 de sifón se muestra en la Fig.7.

En particular, debería observarse que el piso de la región 1450 de sifón está a una altura más baja que el fondo del canal 1122 de clasificación. En consecuencia, el fluido puede fluir asistido por la acción de sifón y las fuerzas de menisco desde el clasificador 10 de chips MEMS al depósito 22 de clasificación, desde el que se puede recuperar mediante una aguja hipodérmica o una micropipeta. Este sifón puede ayudar a compensar las fuerzas capilares que pueden ocurrir por un flujo de volumen pequeño en los canales muy pequeños. Por consiguiente, el depósito 22 de clasificación puede comprender adicionalmente una estructura de sifón que recoge un volumen de fluido de clasificación más pequeño dentro del depósito 22 de clasificación, en donde el volumen de fluido de clasificación más pequeño es menor que aproximadamente el 10% del volumen total de fluido del depósito 22 de clasificación.

Es importante destacar que el canal 1122 de clasificación puede hacerse relativamente corto en comparación con el canal 1120 de muestra y el canal 1140 de residuos, de modo que la cantidad de material perdido por adhesión a las paredes del canal, por ejemplo, se minimiza.

También se muestra en el detalle de la Fig. 7 un dique 1460 de pegamento, que se describirá a continuación con respecto al conjunto de cartucho.

Como puede verse en la Fig. 7, el canal 1122 de muestra puede extraer material del fondo del depósito 20 de muestra. Esto puede ser importante para maximizar el rendimiento, o el porcentaje de material recuperado, de un volumen de muestra dado. En contraste, el canal 1140 de residuos puede entregar el material no objetivo a un punto en la inclinación de la pared del depósito 40 de residuos o vacío.

El intercalador 1400 puede estar hecho de policarbonato polimetacrilato de metilo (PMMA) o polímero de olefina cíclica (COP), mediante moldeo por inyección, estampado, mecanizado por láser o impresión 3D. Las tolerancias en los pasos 1420 mostrados en la Fig. 6 en el intercalador 1400 pueden ser aproximadamente +/- 10 micrómetros en un diámetro total de aproximadamente 100 a 400 micrómetros. Los pasos 20 correspondientes en el clasificador 10 de chips MEMS pueden ser aproximadamente 50 a 150 micrómetros. Estos pasos 20 y 1420 se pueden alinear entonces como se muestra en el inserto de la Fig. 6 dentro de aproximadamente 10 micrómetros. El intercalador 1400 se fija al sustrato de silicio mediante cualquier adhesivo conveniente, como pegamento, epoxi y cemento. El clasificador 10 de chips MEMS se puede pegar primero al intercalador asentándolo en la cavidad 1470 de chip mostrada en la Fig. 9. La cavidad 1470 puede formarse con suficiente precisión para que los pasos en el clasificador 10 de chips MEMS se superpongan aproximadamente a los pasos en el intercalador 1400. El desajuste permitido puede ser de hasta aproximadamente 20 micrómetros, fácilmente alcanzable. Una máquina de recoger y colocar, bien conocida en la fabricación de placas de circuito impreso, puede ser adecuada para esta tarea. El clasificador 10 de chips MEMS se puede pegar en su lugar dentro de la cavidad 1470. Por supuesto, los materiales y métodos descritos aquí son sólo a modo de ejemplo. Pueden usarse otros materiales, tales como otros plásticos, y otros métodos correspondientes.

El intercalador 1400 puede instalarse a continuación en la base 1130 del cartucho con pegamento o cemento, ubicando el intercalador 1400 ubicando los agujeros 1410 contra los postes correspondientes en el cuerpo 1000 del cartucho. Dado que este pegamento o cemento deberá ser impermeable, pero que no interfiera con los pasos 1120, 1122 o 1140, algunas características pueden formarse como diques 1460 de pegamento alrededor de estos canales, como se muestra en las Figs. 7 y 8. Estos diques 1460 de pegamento pueden servir para evitar que el pegamento líquido sin curar entre en los canales 1120, 1122 y 1140 pequeños. Las características 1460 pueden ser rebordes elevados de material plástico que evitan que el líquido entre en los canales u otras depresiones. En particular, se puede inyectar pegamento en un puerto que da acceso a la interfaz entre el intercalador 1400 y el resto del cuerpo 1000 del cartucho. El pegamento se esparcirá alrededor de esta área, pero puede mantenerse fuera de los pasos 1120, 1140 y 1122 de

micro fluidos mediante diques 1460 de pegamento que rodean estos pasos como se muestra en la Fig. 7 y en el dibujo en perspectiva de la Fig. 8a. Los diques de pegamento reducen el espesor de la interfaz entre el intercalador 1400 y el resto del cuerpo 1000 del cartucho de aproximadamente 5 a 50 μm a 0,2 a 2 μm creando de ese modo un efecto capilar que evita que el pegamento fluya más allá del dique hacia los pasos de micro fluidos. Debería entenderse que estas dimensiones son solo a modo de ejemplo y que tales detalles dependerán de las características específicas de la aplicación. Dependiendo del tipo de pegamento utilizado, el pegamento líquido puede curarse mediante calor, presión o exposición a radiación UV, por ejemplo.

La Fig. 9 es una vista en perspectiva simplificada del lado anverso del intercalador 1400. Este lado incluye el área 1470 de asiento para el clasificador 10 de chips MEMS. El clasificador 10 de chips MEMS puede pegarse o adherirse de otra manera contra las características del área 1470 de asiento.

Las dimensiones de ejemplo para el intercalador son 16 mm de largo, 6 mm de anchura, 1 mm de alto. Los depósitos de residuos y muestras pueden tener 2 mm de diámetro. El canal 1120 de muestra, el canal 1122 de clasificación y el canal 1140 de residuos pueden tener cada uno 300 micrones de anchura. La altura de los diques de pegamento puede ser unas 20 micras.

Por consiguiente, un proceso de fabricación del cartucho 1000 puede incluir las siguientes etapas:

- 1) Pegue el clasificador 10 de chips MEMS al intercalador 1400
- 2) Coloque el intercalador 1400 contra los pines de ubicación del cartucho 1000
- 3) Presione intercalador 1400
- 4) Introduzca pegamento en los huecos entre el intercalador 1400 y el cartucho 1000
- 5) Pegamento de curado UV
- 6) Una la base 1130 del cartucho a la parte superior 1135 del cartucho con pegamento, cemento o soldadura ultrasónica, por ejemplo

Debería quedar claro que las etapas 1-6 no necesitan ejecutarse en el orden mostrado. Por ejemplo, la base 1130 del cartucho se puede unir a la parte superior 1135 del cartucho antes de unir el chip 10 MEMS o el intercalador 1400.

En otra realización del sistema de clasificación de células, el cartucho desechable y/o el intercalador comprenden adicionalmente al menos una región de calibración para calibrar los medios de interrogación.

La Fig. 10 es un diagrama simplificado del intercalador 1400 que comprende regiones de calibración. El intercalador 1400 puede tener áreas 1480 que se usan con fines de calibración. Estas áreas 1480 pueden tener propiedades ópticas o de fluorescencia predefinidas particulares que se usan para la calibración o compensación de un sistema óptico. Por lo tanto, las áreas 1480 pueden estar hechas de uno o más materiales fluorescentes o se añaden (imprimen) uno o más materiales fluorescentes a estas superficies. Alternativamente, se pueden usar estructuras de micro fluidos para guiar y almacenar uno o más líquidos fluorescentes a estas áreas de calibración. Por tanto, la aplicación de estos líquidos fluorescentes puede tener lugar en una posición diferente en el intercalador. La Fig. 11 es una vista en sección transversal de tal variante del intercalador 1400 con áreas de calibración 1480. El intercalador puede tener un canal 1120 de muestra como se describió anteriormente, que lleva el fluido de muestra al clasificador 10 de chips MEMS. El fluido puede pasar a continuación en las áreas 1480 de calibración.

La calibración está destinada a garantizar que la materia en suspensión que tenga una tinción fluorescente equivalente se detecte de forma constante en los instrumentos y con el tiempo. Esto se logra midiendo la intensidad de un material con fluorescencia conocida. En lugar de usar partículas de calibración en una ejecución diferente, esto se logra iluminando y detectando la fluorescencia del área de calibración sobre o en el intercalador dentro del cartucho. La calibración puede llevarse a cabo en cualquier momento, por ejemplo, después de insertar el cartucho en el sistema antes de iniciar el proceso de clasificación, o durante un proceso de clasificación para controlar o mantener el rendimiento del sistema.

Mediante la calibración frente a un material fluorescente conocido, el sistema de la invención puede ajustar una intensidad objetivo predefinida. La calibración se puede realizar varias veces en un proceso iterativo y se puede utilizar adicionalmente para caracterizar y validar el rendimiento del sistema.

El material fluorescente usado para el área de calibración se selecciona de forma que pueda detectarse en al menos uno, en el mejor de los casos todos los canales de detección de fluorescencia usados en el sistema y que su intensidad de fluorescencia (brillo absoluto) sea al menos del mismo orden de magnitud que la intensidad de fluorescencia (brillo absoluto) del material que se va a procesar. Especialmente adecuados como material fluorescente para el área de calibración son Coumarin-6, Nile-Red y/o Bodipy-650.

La geometría del canal de fluido del intercalador está diseñada para evitar el atrapamiento de burbujas y la aglomeración de material celular. Por lo tanto, las geometrías del canal pueden optimizarse con respecto a las

propiedades del fluido. Esto puede comprender volúmenes muertos minimizados y evitar cortes y esquinas redondeadas. Además, las geometrías del canal en las interfaces con el chip y/o el cuerpo principal del cartucho están diseñadas de manera que los diámetros del canal siempre aumentan en la dirección del flujo. Estos elementos de diseño también pueden prevenir la aglomeración de material celular dentro de los canales de fluidos.

- 5 Se puede lograr adicionalmente evitar el atrapamiento de burbujas proporcionando a los canales del intercalador un pequeño canal en la parte inferior del canal principal ("canal en canal"). El canal pequeño puede tener del 5 al 20% de la profundidad y la anchura del canal en el que está ubicado. La Fig. 8b muestra a modo de ejemplo un canal 1490 pequeño en la parte inferior de un canal del intercalador, como los canales 1122 y 1140. Una burbuja de gas que bloquea el canal principal no puede entrar en el canal pequeño debido a la tensión superficial y deja el canal pequeño abierto para el flujo de líquido. Otra variante de evitar burbujas atrapadas se muestra en la Fig. 8c, donde el canal 1122 que conduce al sifón tiene la forma de una rampa que conduce al sifón, evitando de ese modo bordes afilados.

En consecuencia, el intercalador puede incluir al menos un canal que tenga un pequeño canal adicional dispuesto en la parte inferior del al menos un canal, en donde dicho pequeño canal tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20% de una profundidad y una anchura del al menos un canal.

15 **Accionador magnético**

Otro aspecto del sistema descrito anteriormente con respecto a las Figs. 1, 2 y 3 es la necesidad de un campo magnético ubicado con precisión que accionará el pequeño clasificador 10 de chips MEMS.

- 20 Como se describió anteriormente, el mecanismo de accionamiento en el sistema mostrado en la Fig. 3 puede ser electromagnético. Debido a que la válvula 110 móvil es tan pequeña, es importante que la estructura generadora de flujo sea precisa, de baja potencia y eficiente. Tal estructura se muestra en las Figs. 10a, 10b y 10c.

- La fuente externa de líneas de campo magnético (flujo magnético) puede proporcionarse fuera del clasificador 10 de chips MEMS, como se muestra en las Figs. 2 y 3. Esta fuente puede ser un electroimán 400. El electroimán 400 puede incluir un núcleo 470 permeable alrededor del que se enrollan las bobinas 460. Las bobinas 460 y el núcleo 470 generan un campo magnético que sale del polo del imán en la punta 450, se desvía y regresa al polo opuesto, como es bien conocido por el electromagnetismo elemental. En general, puede haber una compensación entre menos capas de bobinas 460 para una disipación de calor más eficaz, o más capas para un mayor flujo (Amp * giro) y, por lo tanto, mayor fuerza y mayor velocidad. En una realización, las bobinas 460 tienen una capa, pero el cuerpo del imán a menudo tendrá como máximo tres capas de bobinas 460. Cuando el electroimán 400 se coloca en las proximidades de la válvula 110 móvil, y la bobina 460 se energiza, la bobina 460 y el núcleo 470 generan líneas de flujo que se desvían rápidamente desde la punta 450. En consecuencia, el miembro 110 móvil es atraído generalmente hacia la punta 450 del electroimán 400 como se muestra en la Fig. 12a, debido a que el material permeable es atraído hacia áreas de aumento de densidad de flujo.

- Como se muestra en la Fig. 12a, el imán 470 puede tener una forma ahusada, que puede tender a concentrar más el flujo magnético en la región alrededor de la punta 450. El ángulo del ahusamiento puede ser, por ejemplo, entre aproximadamente 0 y hasta aproximadamente 30 grados desde la vertical. La relación de aspecto (longitud del ahusamiento/anchura media del ahusamiento) puede ser alrededor de 2/1, por ejemplo, pero puede diseñarse en un amplio intervalo de formas. Sin embargo, para enfocar el flujo en la punta 450, puede ser ventajoso que el diámetro en la punta sea menor que el diámetro en la base de la forma ahusada. La Fig. 12b es una vista ampliada de la punta del electroimán 400, que muestra la forma ahusada de la punta, de frente. La Fig. 12c es una vista en perspectiva de la forma 450 ahusada, las bobinas 460 y el cuerpo 470 de imán.

- El modelado magnético sugiere que una punta de electroimán de la anchura aproximada de los elementos 116 permeables en el clasificador 10 de chips MEMS es óptima, con una altura de aproximadamente el mismo orden de magnitud. A continuación, el tamaño de la base se determina mediante el ángulo del ahusamiento. En una realización, la base de la forma ahusada puede tener una longitud de 2 a 5 mm y una anchura de 0,5 a 2 mm. La punta de la forma ahusada puede ser más pequeña que la base y tener dimensiones rectangulares de aproximadamente 1,0 mm x 0,7 mm, o al menos aproximadamente 0,4 mm x 0,2 mm. Debería entenderse que estas dimensiones son solo a modo de ejemplo y que tales detalles dependerán de las características específicas de la aplicación.

- Si bien se han descrito diversos detalles junto con las implementaciones de ejemplo descritas anteriormente, diversas alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sean conocidos o que sean o puedan ser imprevisibles actualmente, pueden resultar evidentes al revisar la divulgación anterior. Además, los detalles relacionados con los métodos específicos, las dimensiones, los usos de los materiales, las formas, las técnicas de fabricación, etc. están destinados a ser únicamente ilustrativos, y la invención no se limita a tales realizaciones. Los descriptores como en la parte superior, en la parte inferior, izquierda, derecha, parte delantera trasera, etc. son arbitrarios, ya que debería entenderse que los sistemas y métodos pueden realizarse en cualquier orientación. Por consiguiente, las implementaciones de ejemplo expuestas anteriormente están destinadas a ser ilustrativas, no limitantes.

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de clasificación de células que comprende una válvula de clasificación de células micro fabricada (10) sobre una superficie de un sustrato de silicio, con canales micro fabricados que salen de la válvula de clasificación de células, en donde la válvula de clasificación de células separa las partículas objetivo del material no objetivo dirigiendo las partículas objetivo desde un canal (120) de muestra a un canal (122) de clasificación formado en el sustrato de silicio y el material no objetivo desde el canal (120) de muestra hasta un canal (140) de salida de residuos también formado en el sustrato de silicio;
 - un cartucho (1000) desechable que contiene un depósito (20) de muestra, un depósito (22) de clasificación y un depósito (40) de residuos;
 - y un intercalador (1400) que proporciona comunicación de fluidos entre los canales micro fabricados en el sustrato de silicio y los depósitos en el cartucho (1000) desechable, en donde el intercalador (1400) proporciona una trayectoria de fluido de clasificación entre un depósito (22) de clasificación en el cartucho (1000) desechable y el canal (122) de clasificación en el sustrato de silicio, una trayectoria de fluido de residuo entre un depósito (40) de residuo en el cartucho (1000) desechable y el canal (140) de residuos, y una trayectoria de fluido de muestra entre el canal (120) de muestra y un depósito (20) de muestra caracterizado por que las geometrías del canal en las interfaces del intercalador (1400) con el sustrato de silicio y/o el cartucho (1000) desechable están diseñadas de manera que los diámetros del canal siempre aumentan en la dirección del flujo.
2. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, en donde la válvula (10) de clasificación de células se mueve en un plano paralelo a la superficie y dirige las partículas no objetivo desde el canal (120) de muestra al canal (140) de residuos cuando la válvula (10) de clasificación de células micro fabricada está en una primera posición, y que dirige las partículas objetivo al canal (122) de clasificación cuando está en una segunda posición; en donde el canal (120) de clasificación y el canal (140) de residuos son antiparalelos, y el canal (120) de muestra y el canal (140) de residuos son ortogonales.
3. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, en donde el depósito (22) de clasificación comprende adicionalmente una estructura de sifón que recoge un volumen de fluido de clasificación más pequeño dentro de la estructura de sifón del depósito (22) de clasificación, en donde el volumen de fluido de clasificación más pequeño es menor que el 10% de un volumen de fluido total del depósito (22) de clasificación.
4. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, en donde el depósito (20) de muestra comprende adicionalmente una característica (21) en forma de embudo formada en la pared del depósito (22) de muestra, que recoge unos volúmenes más pequeños de fluido de muestra, en donde el volumen más pequeño de fluido de muestra es menor que el 10% de un volumen de fluido total del depósito (22) de muestra.
5. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, en donde el depósito (40) de residuos comprende adicionalmente una característica (41) en forma de embudo formada en la pared del depósito (40) de residuos, que recoge un volumen más pequeño de fluido residual, en donde el volumen más pequeño de fluido residual es menor que el 10% del volumen de fluido total del depósito (40) de residuos.
6. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, en donde el intercalador (1000) se fija al sustrato de silicio mediante un adhesivo y se instala en el cartucho (1400) desechable.
7. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 2, en donde la válvula (10) de clasificación de células comprende adicionalmente un material magnético permeable incrustado (116) en la válvula de clasificación de células micro fabricada; y una primera fuente de flujo (400) magnético externa a la válvula de clasificación de células micro fabricada y el sustrato sobre el que se forma la válvula (10) de clasificación de células, en donde el flujo magnético interactúa con el material magnético permeable incrustado para mover el mecanismo de clasificación de partículas micro fabricado, por lo que el mecanismo de clasificación de partículas micro fabricado se mueve desde la primera posición a la segunda posición cuando se activa la primera fuente de flujo magnético.
8. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 2, en donde la válvula (10) de clasificación de células se mueve desde la primera posición a la segunda posición en respuesta a la aplicación de una fuerza.
9. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 8, en donde la fuerza es al menos una mecánica, electrostática, magnetostática, piezoeléctrica y electromagnética.
10. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un medio (200) de interrogación dispuesto en el canal de muestra, en donde el medio (200) de interrogación distingue las partículas objetivo de los materiales no objetivo en la corriente de muestra y en donde el intercalador comprende adicionalmente al menos una región de calibración para calibrar los medios de interrogación.
11. El sistema de clasificación de células de la reivindicación 1, en donde los canales del intercalador (1400) están provistos en la parte inferior con un canal pequeño adicional que tiene del 5 al 20% de la profundidad y anchura del

canal en donde se ubica.

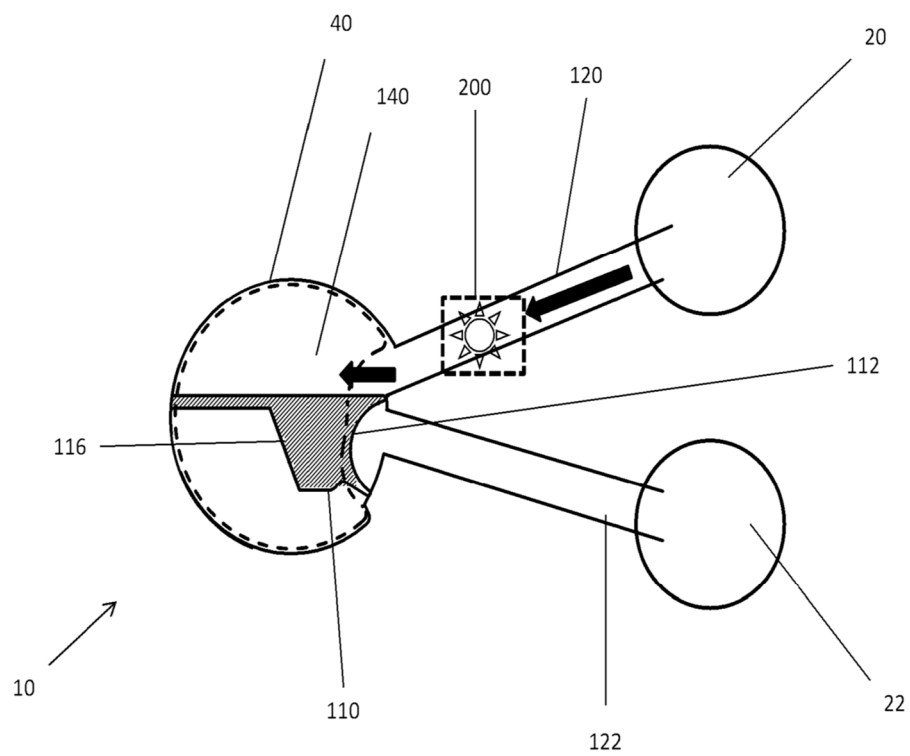


Fig. 1

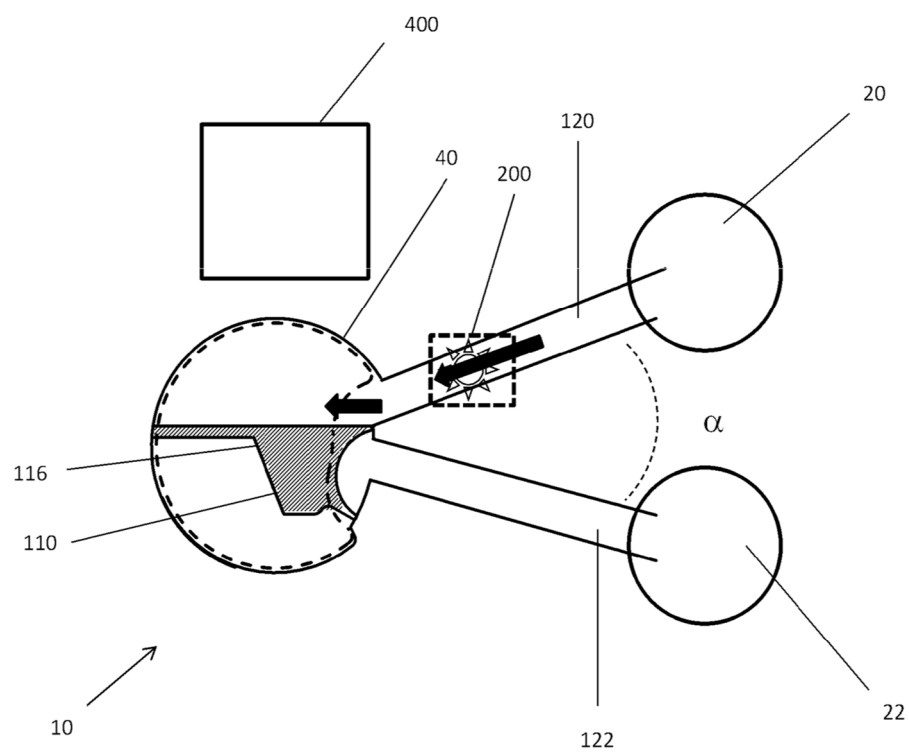


Fig. 2

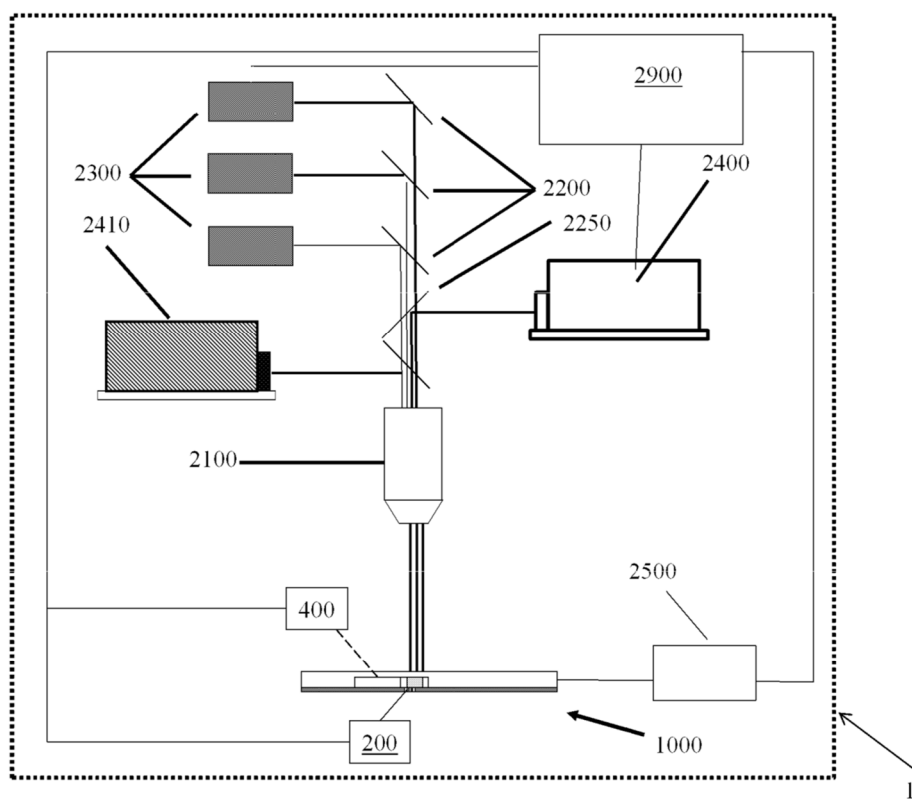


Fig. 3

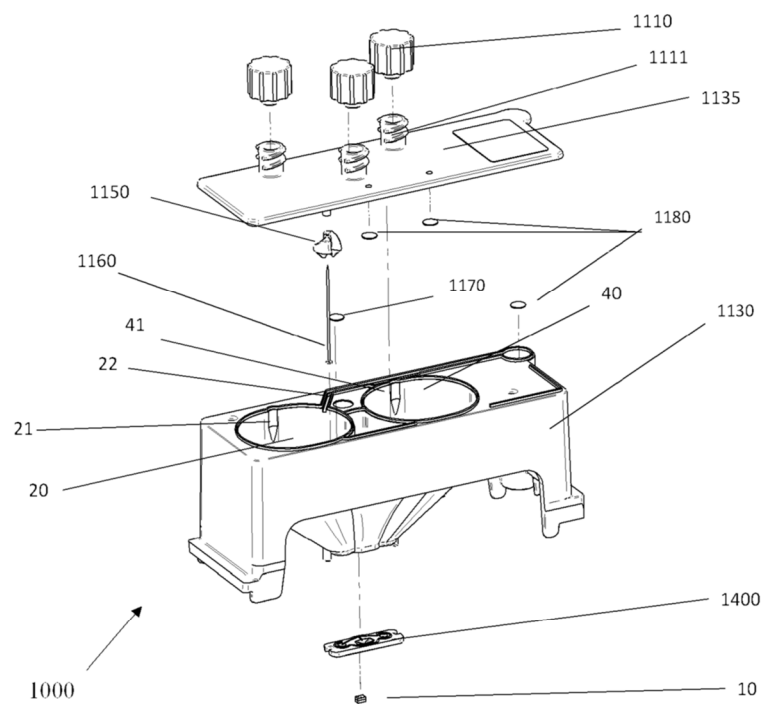


Fig. 4

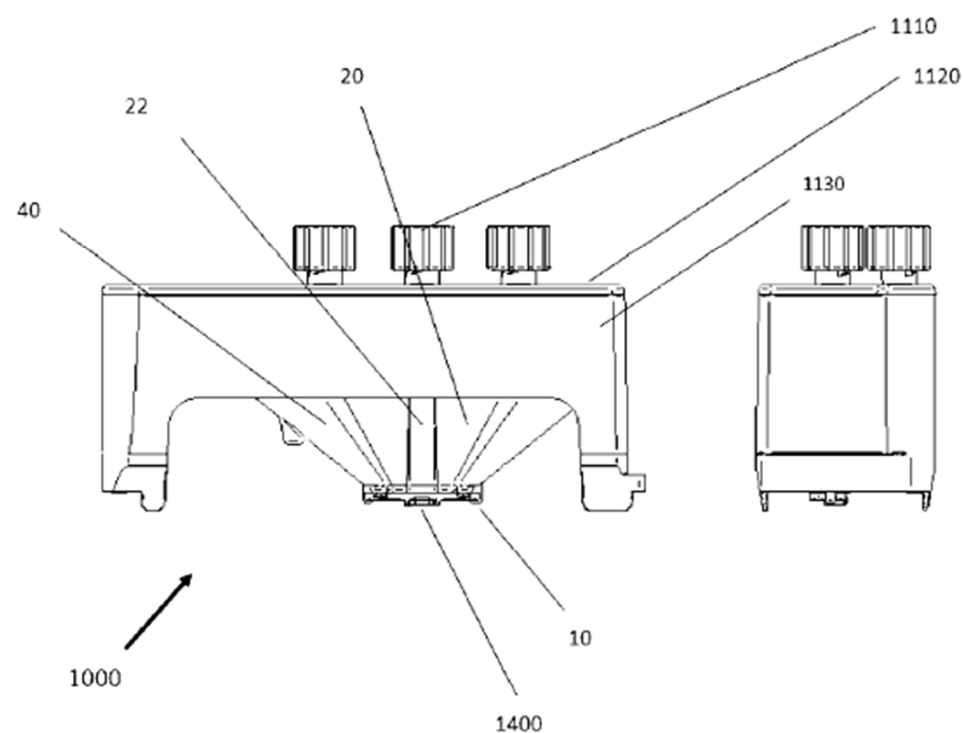


Fig. 5a

Fig. 5b

Fig. 5

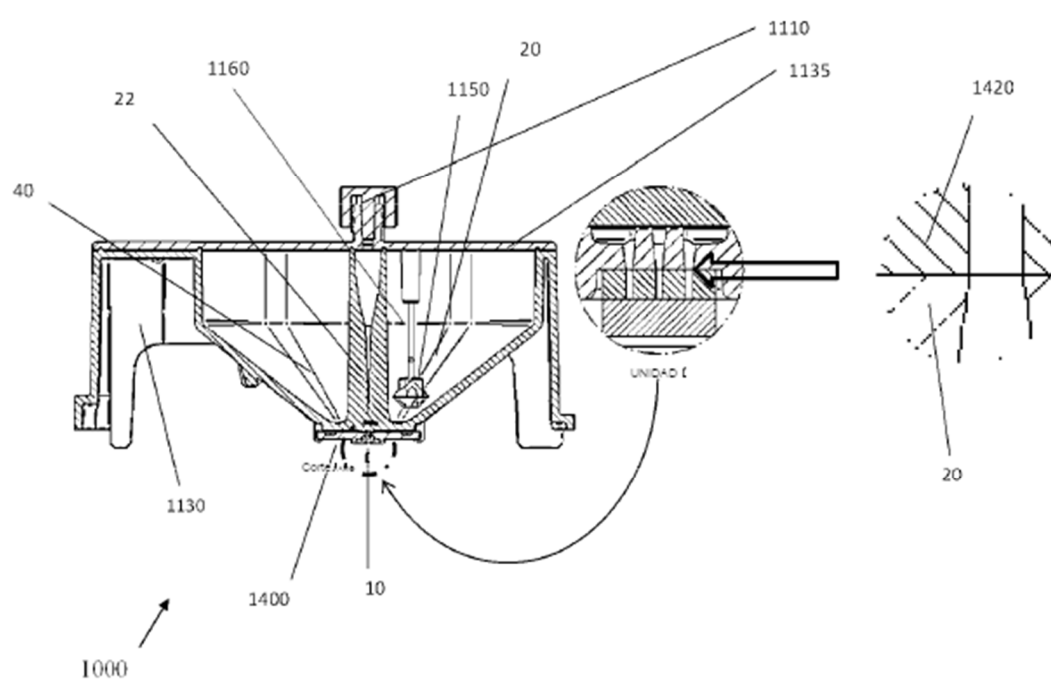


Fig. 6

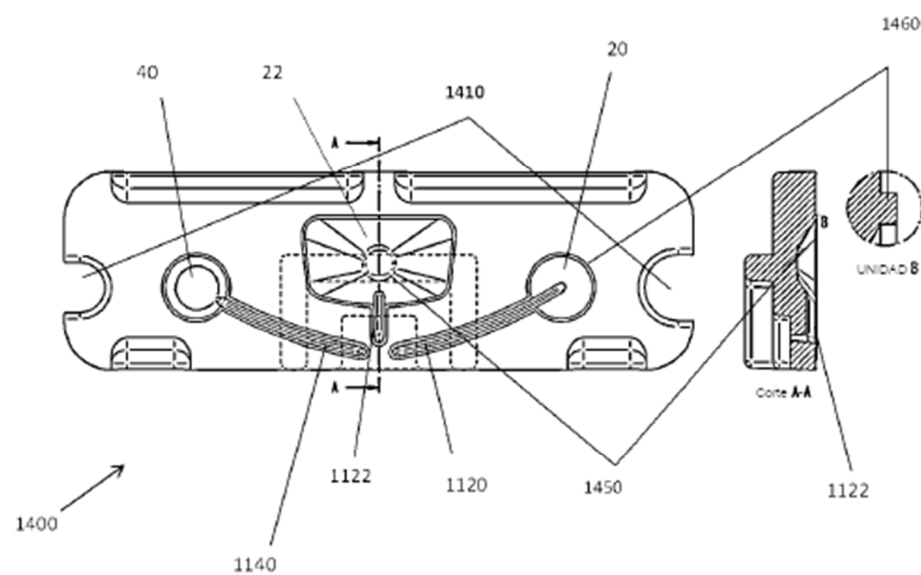


Fig. 7

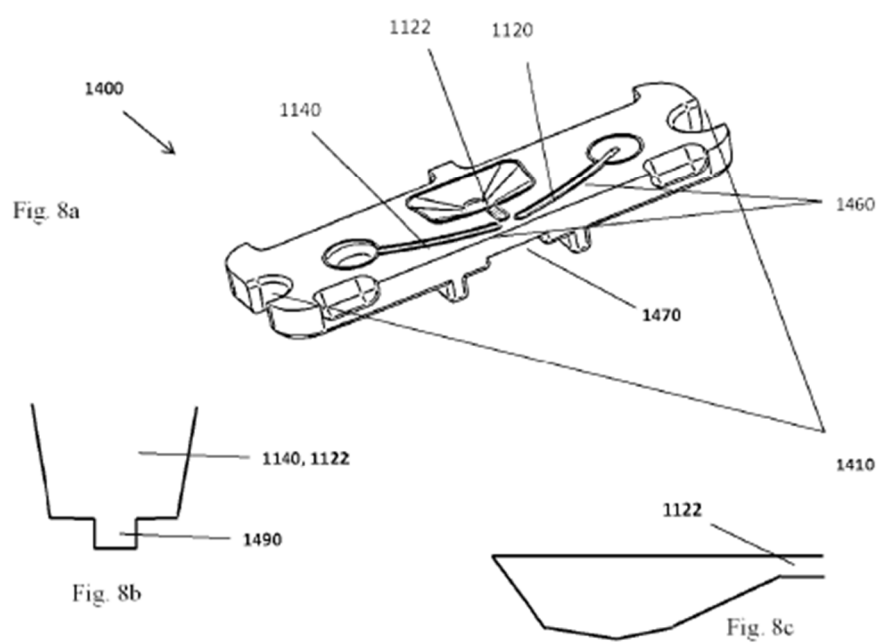


Fig. 8

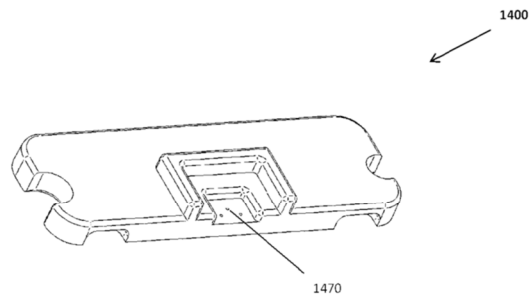


Fig. 9

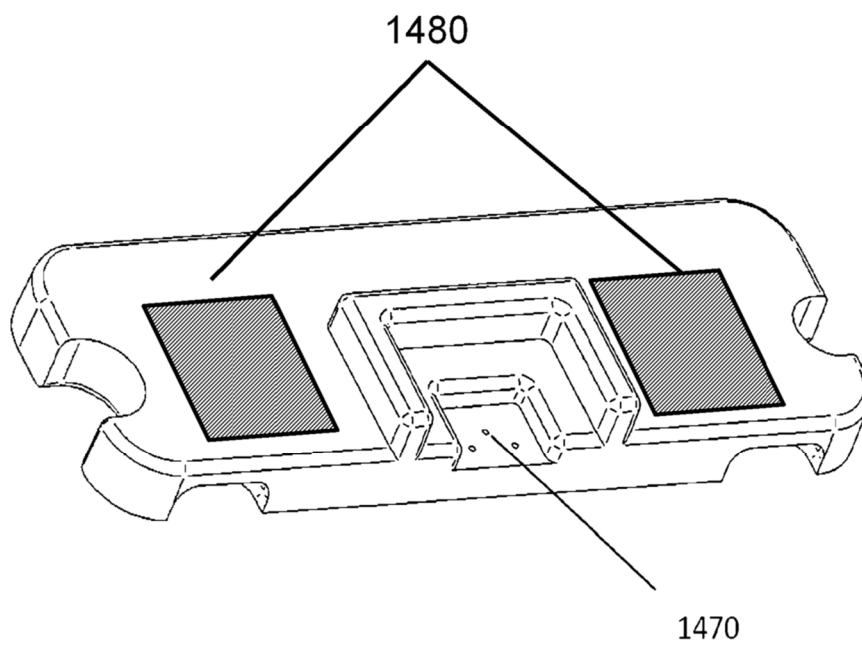


Fig. 10

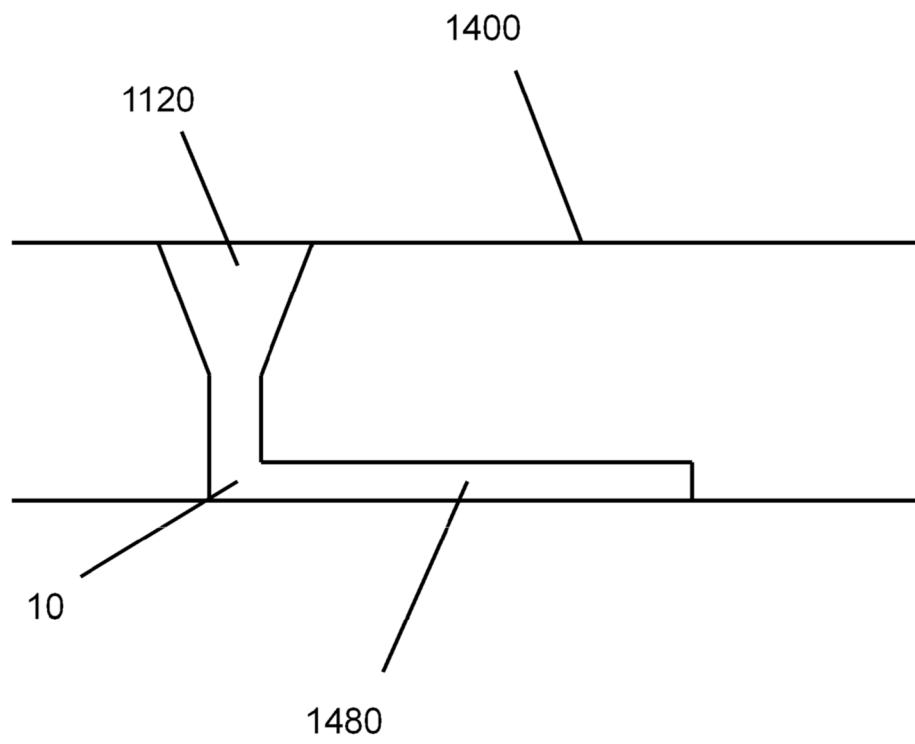


Fig. 11

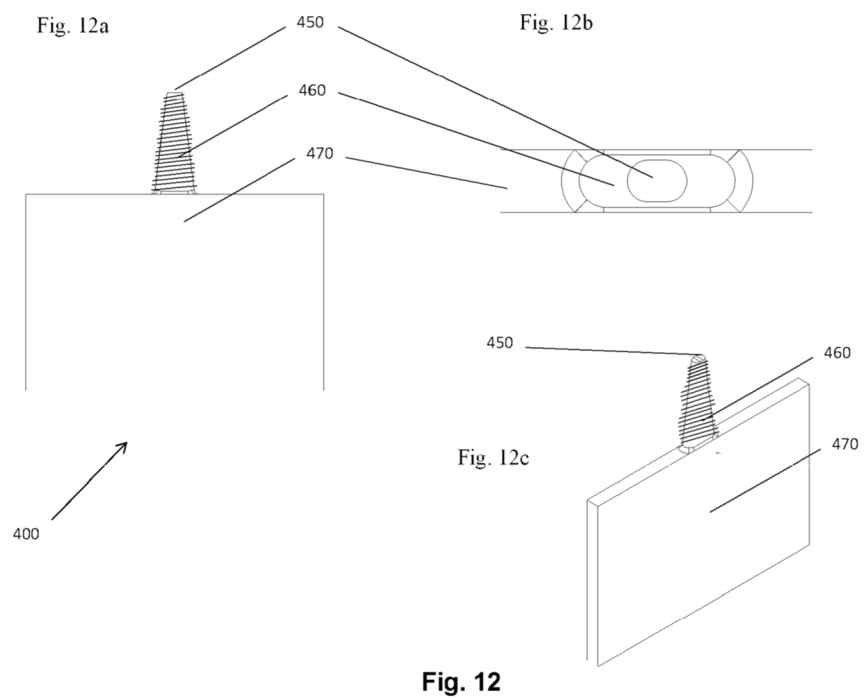


Fig. 12