

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-508571

(P2004-508571A)

(43) 公表日 平成16年3月18日(2004.3.18)

| | | |
|----------------------------|--------------------|-------------|
| (51) Int. Cl. ⁷ | F I | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/53 | GO 1 N 33/53 D | 4 B O 2 9 |
| GO 1 N 37/00 | GO 1 N 37/00 1 O 2 | |
| // C 1 2 M 1/34 | GO 1 N 37/00 1 O 3 | |
| | C 1 2 M 1/34 A | |

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 84 頁)

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2002-526506 (P2002-526506) | (71) 出願人 | 500491786 プレジデント・アンド・フェローズ・オブ ・ハーバード・カレッジ アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 38, ケンブリッジ, マサチューセッツ・ アベニュー 1350, ホルヨーク・セン ター, スイート 727 |
| (86) (22) 出願日 | 平成13年9月18日 (2001. 9. 18) | (74) 代理人 | 100089705 弁理士 社本 一夫 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成15年3月18日 (2003. 3. 18) | (74) 代理人 | 100076691 弁理士 増井 忠式 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/US2001/042195 | (74) 代理人 | 100075270 弁理士 小林 泰 |
| (87) 国際公開番号 | W02002/022264 | (74) 代理人 | 100080137 弁理士 千葉 昭男 |
| (87) 国際公開日 | 平成14年3月21日 (2002. 3. 21) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 60/233, 142 | | |
| (32) 優先日 | 平成12年9月18日 (2000. 9. 18) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 勾配発生方法及び装置

(57) 【要約】

流体を処理する方法及び装置。流体を処理する方法は、2つ以上の別個の流れを共通流れに結合するステップと、その後共通流れを分割して異なる特性を有する新しい一組の別個の流れとするステップとを含む。別個の流れを結合して、濃度勾配又は剪断勾配等の勾配を生成することができる。本発明の装置は流体チャネルのネットワークを提供し、このネットワークは、流体を操作して、例えば勾配又は様々な濃度で物質を含有する一連の溶液を生成するのに使用できる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

装置であって、
少なくとも2つの第1世代 (generation) チャンネルを備える第1世代と、
該少なくとも2つの第1世代チャンネル間を連通する共通チャンネルと、
少なくとも3つの第2世代チャンネルを備える第2世代にして、各第2世代チャンネルが第1
端部及び第2端部を有し、各第2世代チャンネルの該第1端部が該共通チャンネルと連通する
、前記第2世代とを備える装置。

【請求項 2】

請求項 1 の装置において、一つの世代内のすべてのチャンネルが流体流通に対しほぼ等しい 10
抵抗を提供できる、装置。

【請求項 3】

請求項 1 の装置において、該チャンネルの少なくとも1つが弁と連通する、装置。

【請求項 4】

請求項 1 の装置において、一つの第1世代チャンネルの少なくとも一部が幅約 1 mm に満た
ない、装置。

【請求項 5】

請求項 4 の装置において、一つの第1世代チャンネルの少なくとも一部が幅約 100 μ m に
満たない、装置。

【請求項 6】

請求項 5 の装置において、一つの第1世代チャンネルの少なくとも一部が幅約 50 μ m に満
たない、装置。 20

【請求項 7】

請求項 1 の装置において、該チャンネルのすべてが幅 1 mm に満たない、装置。

【請求項 8】

請求項 1 の装置において、該第2世代が該第1世代より少なくとも1つチャンネルを多く備
える、装置。

【請求項 9】

請求項 1 の装置において、第3世代をさらに備え、該第3世代が該第2世代より少なくと
も1つチャンネルを多く備え、各第3世代チャンネルが第1端部及び第2端部を有し、各第3 30
世代チャンネルの該第1端部が各第2世代チャンネルの該第2端部と連通する、装置。

【請求項 10】

請求項 1 の装置において、各第2世代チャンネルの該第2端部がその他の第2世代チャンネル
と連通する、装置。

【請求項 11】

請求項 9 の装置において、追加の世代をさらに備え、各連続世代が直前の世代より1つ多
くチャンネルを備える、装置。

【請求項 12】

請求項 1 の装置において、2つの隣接する第2世代チャンネルの夫々の該第1端部が該第1
世代チャンネルの1つからほぼ等距離である、装置。 40

【請求項 13】

請求項 1 の装置において、該第2世代チャンネルが渦巻状である、装置。

【請求項 14】

請求項 1 の装置において、該共通チャンネルが該第1及び第2世代チャンネルより流れに対し
少ない抵抗を提供できる、装置。

【請求項 15】

請求項 1 の装置において、該第2世代チャンネルの少なくとも2つが別個の受け容器と流体
連通する、装置。

【請求項 16】

請求項 15 の装置において、該第2世代チャンネルのすべてが別個の受け容器と流体連通す 50

る、装置。

【請求項 17】

請求項 1 の装置において、第 2 共通チャネルを備え、該第 2 共通チャネルが該第 2 世代チャネルの少なくとも 1 つの該第 2 端部と流体連通する、装置。

【請求項 18】

請求項 17 の装置において、該第 2 共通チャネルの幅が該第 2 共通チャネルの長さの少なくとも一部にわたって変化する、装置。

【請求項 19】

請求項 9 の装置において、複合チャネルを備え、該複合チャネルが該第 3 世代チャネルの少なくとも 1 つの該第 2 端部と流体連通する、装置。

10

【請求項 20】

請求項 11 の装置において、複合チャネルを備え、該複合チャネルが最終世代チャネルの少なくとも 1 つの該第 2 端部と流体連通する、装置。

【請求項 21】

請求項 20 の装置において、該最終世代チャネルのすべてが該複合チャネルと流体連通する、装置。

【請求項 22】

請求項 1 乃至 21 の装置を 2 つ以上備えたネットワーク。

【請求項 23】

勾配の形成方法であって、

20

第 1 チャネル内に第 1 流体を流すステップと、

第 2 チャネル内に第 2 流体を流すステップと、

該第 1 流体及び該第 2 流体を共通チャネルにおいて合流させるステップと、

該共通チャネルからの流体を少なくとも 3 つの追加のチャネル内へと流すステップと、

該 3 つの追加のチャネルからの該流体を実質的に層流の条件下で単一のチャネル内へと再結合して複合流体を生成するステップとを備える、方法。

【請求項 24】

請求項 23 の方法において、該流体が液体である、方法。

【請求項 25】

請求項 23 の方法において、該流体が気体である、方法。

30

【請求項 26】

請求項 23 の方法において、少なくとも該第 1 流体を追加のステージ (s t a g e) の追加のチャネル内に流すステップをさらに備える、方法。

【請求項 27】

請求項 23 の方法において、該再結合流体を 4 つの追加のチャネル内へと分割するステップをさらに備える、方法。

【請求項 28】

請求項 23 の方法において、第 3 チャネル内に第 3 流体を流すステップと、該第 3 流体を該共通チャネルにおいて該第 1 及び第 2 流体と合流させるステップとをさらに備える、方法。

40

【請求項 29】

請求項 23 の方法において、少なくとも該第 1 流体の流量を調整するステップをさらに備える、方法。

【請求項 30】

請求項 23 の方法において、該再結合流体における勾配プロフィールを平滑化するステップをさらに備える、方法。

【請求項 31】

請求項 30 の方法において、実質的な拡散が該再結合流体における層流流れ間に生じるのを許容するステップをさらに備える、方法。

【請求項 32】

50

請求項 3 1 の方法において、少なくとも該第 1 流体の流速を変更することによって拡散量を変更するステップをさらに備える、方法。

【請求項 3 3】

流体流れであって、

流体の流通の方向と実質的に直交する方向に濃度が変化する第 1 物質と、

該流体の流通の方向と実質的に直交する方向に濃度が変化する第 2 物質と、

該第 1 物質の濃度勾配が該第 2 物質の濃度勾配と異なるプロファイルである、流体流れ。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 の流体流れにおいて、該流体が液体である、流体流れ。

【請求項 3 5】

請求項 3 3 の流体流れにおいて、該流体が気体である、流体流れ。

【請求項 3 6】

請求項 3 3 の流体流れにおいて、該第 1 物質の該濃度勾配を表すプロファイルが二次又はより高次の多項式によって表すことができる、流体流れ。

【請求項 3 7】

請求項 3 3 の流体流れにおいて、第 3 物質をさらに備え、該第 3 物質の濃度が流通の方向と実質的に直交する方向に変化する、流体流れ。

【請求項 3 8】

請求項 3 4 の流体流れにおいて、該物質が生化学物質である、流体流れ。

【請求項 3 9】

請求項 3 8 の流体流れにおいて、該生化学物質がペプチドである、流体流れ。

【請求項 4 0】

n 次多項式の濃度勾配であって、 n が 2 より大きいか又は等しい、濃度勾配。

【請求項 4 1】

請求項 4 0 の濃度勾配において、該勾配の横幅が 1 c m に満たない、濃度勾配。

【請求項 4 2】

請求項 4 1 の濃度勾配において、該勾配の横幅が 1 m m に満たない、濃度勾配。

【請求項 4 3】

請求項 4 0 の濃度勾配において、該勾配が流体中にあり、少なくとも約 1 0 秒間安定である、濃度勾配。

【請求項 4 4】

請求項 4 0 の濃度勾配において、該勾配が面上にある、濃度勾配。

【請求項 4 5】

請求項 4 4 の濃度勾配において、該勾配が化学物質又は生化学物質勾配である、濃度勾配。

【請求項 4 6】

請求項 4 5 の濃度勾配において、該勾配の幅が約 1 c m に満たない、濃度勾配。

【請求項 4 7】

請求項 4 6 の濃度勾配において、該勾配の幅が約 1 m m に満たない、濃度勾配。

【請求項 4 8】

請求項 4 6 の面において、該面が蛋白質チップである、面。

【請求項 4 9】

面であって、

面の一部に配置された第 1 化学又は生化学勾配と、

該面の該一部に配置された第 2 化学又は生化学勾配と、

該面の該一部に配置された第 3 化学又は生化学勾配とを備え、各勾配が互いに異なる、面。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 の面において、該勾配の少なくとも 1 つの幅が約 1 m m に満たない、面。

【請求項 5 1】

10

20

30

40

50

請求項 49 の面において、該面が蛋白質チップであり、かつ該化学又は生化学物質の少なくとも 1 つがペプチドである、面。

【請求項 52】

請求項 49 の面において、少なくとも該第 1 化学又は生化学物質がマトリックスに組み込まれる、面。

【請求項 53】

請求項 51 の面において、該マトリックスがゲルである、面。

【請求項 54】

面処理方法であって、

実質的に層流の条件下で面の一部に沿って流体を流すステップにして、該流体が少なくとも 1 つの物質の濃度勾配を備え、該濃度勾配が流通の方向と実質的に直交しかつ実質的に該流体の横方向全体に連続する、ステップと、

該物質の異なった濃度に露された該面の該一部の複数の箇所を差別的に処理するステップとを備える、方法。

【請求項 55】

請求項 54 の方法において、該面の該一部が幅 10 cm に満たない、方法。

【請求項 56】

請求項 55 の方法において、該面の該一部が幅 1 cm に満たない、方法。

【請求項 57】

請求項 56 の方法において、該面の該一部が幅 1 mm に満たない、方法。

【請求項 58】

請求項 54 の方法において、該物質が触媒である、方法。

【請求項 59】

請求項 54 の方法において、該処理が該面を硬化させるステップを備える、方法。

【請求項 60】

請求項 54 の方法において、該処理が該面に該物質を堆積させるステップを備える、方法。

【請求項 61】

請求項 60 の方法において、該面の該一部の幅が 1 cm に満たない、方法。

【請求項 62】

請求項 54 の方法において、該処理が該面にトポロジ（topological）勾配を形成するステップを備える、方法。

【請求項 63】

請求項 62 の方法において、該処理が該面から材料を除去するステップを備える、方法。

【請求項 64】

請求項 63 の方法において、該面の該一部の幅が 1 cm に満たない、方法。

【請求項 65】

流体希釈方法であって、

第 1 入口に高濃度流体を供給するステップと、

第 2 入口に低濃度流体を供給するステップと、

該第 1 入口からの該流体及び該第 2 入口からの該流体を第 1 世代共通チャネル内へと流すステップと、

該共通チャネルの該流体を少なくとも 3 つの第 2 世代チャネル内へと分割するステップと、

該少なくとも 3 つの第 2 世代チャネルからの該流体を第 2 世代共通チャネル内へと再結合するステップと、

該第 2 世代共通チャネルの該流体を複数の第 3 世代チャネル内へと分割するステップと、

該複数の第 3 世代チャネルの少なくとも 1 つから流体を集めるステップとを備える、方法。

【請求項 66】

10

20

30

40

50

2つの異なった濃度勾配プロフィールを示す流体の生成方法であって、少なくとも第1出発流体を第2出発流体と結合させて結合流を形成するステップにして、該第1出発流体が実質的に該第2流体に存在しない第1物質を備える、ステップと、該結合流を一連の第2ステージ流に分割するステップと、該第2ステージ流の少なくとも2つを合流させて複合流を形成するステップにして、該複合流が該第1物質及び第2物質に関し異なった濃度勾配プロフィールを示す、ステップとを備える、方法。

【請求項67】

一連の溶液の生成方法であって、物質の濃厚溶液と該物質のより低濃度溶液とを接触させて結合流体を形成するステップと、該結合流体を膜を使用せずに複数の別個の流れに分離するステップにして、該別個の流れの少なくとも1つが該別個の流れの別の流れにおける該物質の濃度と実質的に異なる濃度で該物質を含む、ステップとを備える、方法。

【請求項68】

請求項67の方法において、該別個の流れの1つにおける該物質の濃度が該濃厚溶液又は該より低濃度溶液のいずれかにおける該物質の濃度とほぼ等しい、方法。

【請求項69】

請求項67の方法において、第2物質を含む第3溶液を該結合流体と接触させるステップをさらに備える、方法。

【請求項70】

請求項69の方法において、該別個の流れの少なくとも1つが該第1物質及び該第2物質を、該別個の流れの少なくとも他の1つにおける該第1物質及び該第2物質の比と異なる濃度比で含有する、方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の分野】

本発明は、単数又は複数の流体の組成を操作する方法及び装置、より詳細には流体勾配を生成する方法及び装置に関する。

【0002】

【発明の背景】

産業、化学及び生物学上の用途のための流体の送出は、様々なポンプ及びピペット技術を使用して極端に少量又は大量の流体を正確に送出できる段階まで発展してきた。加えて、非常に精密な量で、かつ特定の位置において面を浸食し、また面に化学物質を適用する技術が開発されてきた。これらの技術は、面に正確かつ均一に溶液及び懸濁液を適用してばらつきのない表面化学物質密度を提供するのに使用できる。しかしながら、溶液又は化学物質を均一に導入又は堆積させるのではなく、面の一部分における適用材料の密度が面の別の部分の密度より大きい勾配として導入又は堆積させることが望ましい用途が存在する。

【0003】

伝統的に、濃度が距離との関係で変化する線状濃度勾配は、高濃度の点から物質を低濃度で含有する材料中に溶質を拡散させることによって形成できる。物質をある時間拡散させた後、濃度勾配が点状源から拡がって展開する。点状源から様々な距離において流体をサンプリングでき、一般に点状源からの距離が増加するにつれて次第に低くなる濃度が検出される。しかしながら、溶液中の材料は濃度がより低い領域に拡散し続けるので、任意の一点における物質の濃度は時間とともに変化し、任意の2点間における勾配も変化する。したがって、安定した勾配を必要とする実験又は作業を進めることは困難である。この問題は、急な勾配は一般に傾斜の緩い勾配より速く崩壊するので、急な勾配が求められるときはよりひどいものとなる。

【0004】

10

20

30

40

50

面上の勾配は交差拡散 (cross-diffusion)、光固定及び電気化学脱着を含む自己組織化単分子膜 (SAM) を使用する方法によって生成されてきた。しかしながら、生成できる面上勾配プロファイルの種類、使用できる物質及び勾配の大きさはすべて制限されている。

【0005】

加えて、公知の流体勾配は、濃度がある距離にわたって一定量で減少又は増加する線状勾配に限られる。しばしば、直線的に増加又は減少するのではなく、例えば2次、3次又は対数関数として増加する勾配を採用することが有用である。しかしながら、公知の点状源及び線状源拡散技術はこれらのプロファイルを示す勾配を生成できるとは知られていない。

【0006】

10

【発明の概要】

1つの態様において、本発明は、装置であって、少なくとも2つの第1世代 (generation) チャネルを有する第1世代と、少なくとも2つの第1世代チャネル間を連通する共通チャネルと、少なくとも3つの第2世代チャネルを備える第2世代にして、各第2世代チャネルが第1端部及び第2端部を有し、各第2世代チャネルの第1端部が共通チャネルと連通する、第2世代とを備える装置を提供する。

【0007】

他の態様において、本発明は、勾配の形成方法であって、第1チャネル内に流体を流すステップと、第2チャネル内に第2流体を流すステップと、第1流体及び第2流体を共通チャネルにおいて合流させるステップと、共通チャネルからの流体を少なくとも3つの追加のチャネル内へと流すステップと、3つの追加のチャネルからの流体を実質的に層流の条件下で単一のチャネル内へと再結合するステップとを備える、方法を提供する。

20

【0008】

他の態様において、本発明は、流体流れであって、流体の流通の方向と実質的に直交する方向に濃度が増加する第1物質を備え、流体の流通の方向と実質的に直交する方向に濃度が増加する第2物質を含み、第1物質の濃度勾配が第2物質の濃度勾配と異なるプロファイルである、流体流れを提供する。

【0009】

他の態様において、本発明は、 n 次多項式の濃度勾配であって、 n が2より大きいか又は等しい、濃度勾配を提供する。

30

他の態様において、本発明は、面であって、面の一部に配置された第1化学又は生化学勾配と、面の一部に配置された第2化学又は生化学勾配と、面の一部に配置された第3化学又は生化学勾配とを備え、各勾配が互いに異なる、面を提供する。

【0010】

他の態様において、本発明は、面処理方法であって、実質的に層流の条件下で面の一部に沿って流体を流すステップにして、流体が少なくとも1つの物質の濃度勾配を備え、濃度勾配が流通の方向と実質的に直交しかつ実質的に流体の横方向全体に連続する、ステップと、物質の異なった濃度に露された面の一部の複数の箇所を差別的に処理するステップとを備える、方法を提供する。

【0011】

40

他の態様において、本発明は、流体希釈方法であって、第1入口に高濃度流体を供給するステップと、第2入口に低濃度流体を供給するステップと、第1入口からの流体及び第2入口からの流体を第1世代共通チャネル内へと流すステップと、共通チャネルの流体を少なくとも3つの第2世代チャネル内へと分割するステップと、少なくとも3つの第2世代チャネルからの流体を第2世代共通チャネル内へと再結合するステップと、第2世代共通チャネルの流体を複数の第3世代チャネル内へと分割するステップと、複数の第3世代チャネルの少なくとも1つから流体を集めるステップとを備える、方法を提供する。

【0012】

他の態様において、本発明は、2つの異なった濃度勾配プロファイルを示す流体の生成方法であって、少なくとも第1出発流体を第2出発流体と結合させて結合流を形成するステ

50

ップにして、第1出発流体が実質的に第2流体に存在しない第1物質を備える、ステップと、結合流を一連の第2ステージ流に分割するステップと、第2ステージ流の少なくとも2つを合流させて複合流を形成するステップにして、複合流が第1物質及び第2物質に関し異なった濃度勾配プロフィールを示す、ステップとを備える、方法を提供する。

【0013】

他の態様において、本発明は、一連の溶液の生成方法であって、物質の濃厚溶液と物質のより低濃度溶液とを接触させて結合流体を形成するステップと、結合流体を膜を使用せずに複数の別個の流れに分離するステップにして、別個の流れの少なくとも1つが別個の流れの別の流れにおける物質の濃度と実質的に異なる濃度で物質を含む、ステップとを備える、方法を提供する。

10

【0014】

本発明の他の利点、新規な特徴及び目的は、以下の発明の詳細な説明を添付図面と共に考慮することにより明らかとなる。添付図面は略図的なものであり、また一律の縮尺に従うものではない。図中、各同一又はほとんど同一の構成部品は単一の番号によって表した。簡明化のため、すべての構成部品にすべての図において符号を付することはせず、また図示が当業者が本発明を理解するため必要でない場合は本発明の各実施の形態のすべての構成部品を示すことはしていない。

【0015】

【詳細な説明】

本発明は液体を結合及び分配する装置及び方法を提供する。本発明は特に液体中に又は面上に勾配を生成するのに有用である。本発明の方法は、濃度勾配、トポロジー (topological) 勾配及び剪断勾配を含む多くの種類の勾配を生成する手だてとなる。本発明は、小規模の勾配、例えば全長が約10cm未満の勾配を生成するのに特に有用である。本方法及び装置は線状並びにより高次の勾配プロフィールを提供し、これらの勾配は薬学、生物学、組合せ化学、プロテオミクス (proteomics) 及びチップ生産等の分野に有用である。本方法は、各勾配が同一又は異なった機能を発揮する2つ以上の勾配を同時に提供することができる。加えて、本発明はまた複雑な形状がある時間にわたって維持できる勾配の発生を提供する。

20

【0016】

本発明は様々なプロフィールを示す勾配、例えば多項式方程式によってモデル化できる任意の勾配を提供する。伝統的な点状源又は線状源勾配生成技術は釣鐘形の勾配を提供できるのみであり、勾配は短期間で崩壊しやすい。層流流れを利用し、また層流流れ間の拡散を通じて流れの内容物を混合することにより、本発明はより安定した勾配を提供できる。

30

【0017】

層流は、一定の特徴 (低レイノルズ数) を有する2つ以上の流れがやはり低レイノルズ数を備えた単一の流れへと合流し、乱流混合せず互いに平行に流れるようにされたときに生じる。キャピラリ内の液体の流通はしばしば層流である。層流及びレイノルズ数の議論については、Kovacs, G. T. A., *Micromachined Transducers Sourcebook* (WCB/McGraw-Hill, ボストン, 1998)、Brody, J. P., Yager, P., Goldstein, R. E. 及び Austin, R. H., *Biotechnology at Low Reynolds Numbers*, *Biophys. J.*, 71, 3430-3441 (1996)、Vogel, S., *Life in Moving Fluids* (Princeton University, プリンストン, 1994)、及び Weigl, B. H. 及び Yager, P., *Microfluidic Diffusion-based Separation and Detection*, *Science* 283, 346-347 (1999) を参照されたい。

40

【0018】

本発明の勾配は、細胞表面相互作用、多数の細胞を使用するハイスループットスクリーニング (high-throughput screening) 等の勾配濃度に依存する

50

生物学的現象の研究、及び細胞系バイオセンサーに有用である。特に、化学走性、走化性運動 (haptotaxis) 及び移行性に関する研究にとって、本発明により達成できる比較的コンパクトで安定した勾配は有利である。走化性細胞は細胞の前部及び後部間のわずか2%ほどの濃度差に感応するので、単一の細胞(10-100µm、100µm当たり2-20%)のオーダーの解像度を備える勾配は有用である。本発明は、蛋白質、表面特性、並びに成長因子、毒素、酵素、薬剤及び他の種類の生物関連分子を含有する流体流れの勾配を発生させる能力を提供する。加えて、化学誘引(chemoattractant)又は化学反発(chemorepellent)特性を有する拡散性物質の勾配は生物パターン形成に重要な役割を演じることができ、脈管形成及び軸索開拓は勾配を使用できるプロセスの例である。本発明はまた、より高等な有機体を研究する際に異なった物質の(類似の又は非類似の)勾配の重畳を提供する。本発明の鋸歯状勾配は生物学的プロセスを研究する際にも使用できる。

10

【0019】

本発明の1つの態様において、気体又は液体等の2つ以上の流体を微量流体ネットワークを使用して合流、混合及び分割できる。微量流体ネットワークは流体を選択的に混合及び再分配して、多項式方程式で表すことができる濃度勾配を生成できる。得られた濃度勾配をその後、例えば化学物質又は生化学物質を送出し、面を処理し、又は化学物質又は生化学物質を面上に堆積させて静止勾配を生成するのに使用できる。いかなる混合も乱流を通じてでなく拡散を通じて生じるのが好ましく、流体ネットワークは流体流通を適用すべき速度での層流に制限するよう構成される。乱流混合に固有の変動を回避することにより、全ネットワークを通じて生じる混合を正確にモデル化することが可能であり、したがって得られる勾配のプロフィールを予測することが可能である。さらにまた、隣接する小さい大きさの層流間の物質拡散を正確に予測して、特定の空間勾配を生成する勾配発生器を設計する技術を提供できる。そのような予測可能性は、CADシステム等の設計プログラムとインターフェースさせて高度の勾配発生器を生産するときに特に有用である。

20

【0020】

1つの態様において、入口及び出口が一連のステージ(stage)又は世代(generation)によって接続された微粒流体ネットワークを使用できる。各世代はいくつかの流体チャネルを含むことができ、1つのステージの流体チャネルは共通チャネルを介して次のステージの流体チャネルと連通でき、該共通チャネルは1つのステージのチャネルから流体を受け、次のステージのチャネルに流体を送出する。共通チャネルは、2つの別個の流体流れの少なくとも一部が互いに接触するネットワーク中の任意の領域でよい。共通チャネルは任意の大きさ又は形状でよく、また図1及び2aに示すように例えば任意の隣り合う世代のチャネルと実質的に直交する別個のチャネルでよい。他の実施の形態において、共通チャネルは単に、図2b及び2cに示すように1つの流体流れの一部が異なる流体流れの一部と接触する2つの世代の接点の領域でもよい。図2bに示すのと同様な設計は、様々な流れを一連の内壁が分離する1つの大きなチャネルでネットワーク全体を形成しようとするときに好ましい。

30

【0021】

次の世代は前の世代より多くの流体チャネルを包含できる。そのような構成はピラミッド形又はクリスマスツリー形の設計をもたらし、流体流れはピラミッドの頂部から出発し、各世代が前の世代より多くの流体チャネルを含む一連の世代を滝のように落ちてピラミッドを下って行く。

40

【0022】

ネットワークの最終世代の個々の流体チャネルを合流させて複合流を形成し、各々のチャネルからの流体が複合流において層状に流れるようにすることができる。個々の流れを一つの平面上に存在させ、せいぜい各流れが2つの他の流れと接触するようにできる。あるいは、複合流はチャネル内の他の流れの上又は下を走る流れをも含んで、任意の流れがいくつかの隣接する流れと接触する3次元構成となるようにすることもできる。

【0023】

50

1つの態様において、ネットワークは、分割流を適切に合流させ、分割し、場合によっては複合流へと再結合させるのに役立つ任意の設計及び大きさのものでよい。ネットワークの形態は、特定の又は特定の等級の勾配を生成するよう適合させることができる。ネットワークは2以上の流体、例えば純水及び塩溶液を用い、これら溶液を結合し、これら溶液を分割し、これら溶液を再合流させて複合流体を形成することによって機能できる。異なった濃度の一つの物質を含有する2つの溶液が互いに接触すると、物質は濃度の高い溶液からより低い溶液中へと拡散する。例えば、塩溶液の塩は、塩溶液から隣接する水だけを含む溶液に移動する。したがって、互いに接触する2つの流体流れは、各流体流れにおける材料の相対的な濃度により材料を互いに交換できる。これは、2つの流体流れが結合して単一の均質な流れを形成する乱流混合とは明らかに異なる混合技術である。

10

【0024】

2つの以上の溶液であって、そのうちの少なくとも2つが一つの物質を異なった濃度で含有する溶液から出発して、本発明のネットワークは、各流体が該物質を異なった濃度で含有する様々な新しい流体を生成できる。各濃度はネットワークの構造及びネットワークを動作させる条件により予測可能である。例えば、2つの別個の流体を2つの入口を通じてネットワークに注入でき、2つの流体は共通チャネルにおいて互いに接触できる。もし接触が層流条件下で行われ、ほとんど又は全く乱流がないとすれば、2つの流体間に生じる混合は主として拡散を通じてのものである。したがって、共通チャネルでの接触時間が最小化されれば、接触する流れの間にほとんど又は全く移動は生じず、各流れはその特有の同一性及び組成を保持できる。

20

【0025】

さらにまた、各入口からの流体が“T”交差点で共通チャネルに合流すると、“T”交差点に進入する溶液の一部は左に流れ、溶液の一部は右に流れる。“T”で各方向に流れる各入口流体の成分は、下流へと流れる各方向において流体が受ける流れ抵抗の関数といえる。一たび共通チャネルに入ると、一方の入力流れから発生した流体流通の一部は他方の入力流れからの流体流通の一部と接触して、2つの隣接する層流の結合流通をもたらすことができる。共通チャネルがその後別の一連の新たな独立チャネルに通じていれば、2つの出発流体（各流体の割合は共通チャネルにおける特定の位置による）は、それぞれの新たな独立流体チャネルが示す相対的な流体抵抗に従って共通チャネルから新たな独立チャネル内に（別の“T”交差点で）送出される。したがって、ネットワークを配列して、第1入力からの流体流通の1/3が独立の第1チャネルに流れ込み、2/3が独立の第2チャネルへと流れるようにすることができる。独立の第1チャネルに流れ込む流体を異なった入口から発生した追加の流体と合流させることができる。これによって、独立のチャネルに、例えば第1入力流れからの50%の流体と、第2入力流れからの50%の流体とにより構成される結合流体を形成できる。2つの隣接する層流の流れから成る結合流体が独立チャネル内で拡散混合する十分な時間を与えられると、出てくる流体は均質な溶液となることができ、例えば各入力流れにおける原濃度の平均の濃度で物質を含有する。

30

【0026】

ネットワークは、任意の数の入口、各世代が1つ以上のチャネルを備えるいくつかの相互接続されたチャネル、及び1つ以上の出口を含むことができる。一般に、より多くの入口を用いると、より複雑な濃度又は濃度勾配が生成される。1つの実施の形態において、生成される勾配プロフィールは $(n-1)$ 次多項式によってモデル化できることが実験上わかっており、ここで n は流体ネットワークに供給する入口の数である。例えば、3乗の勾配が所望であれば、4つの入口を用いる勾配発生器を使用するのが好ましいといえる。線状勾配（1次多項式と考えることができる）は、例えば2つの入口で達成できる。本発明の装置は流体流れを分割、結合及び再結合する手だてとなるので、例えばネットワークの交点での分割比がネットワーク全体を通じて1:1のとき二項分配が得られる。分割比が1:1以外であれば、多項分配がもたらされる。一般に、分割交点からネットワークの対称軸までの距離が大きいほど、また分岐系が高次で、より多くの世代を含むほど、より多くの流体がネットワークの外側部分に送られる。

40

50

【0027】

1つの態様において、2つ以上のピラミッド形流体ネットワークを結合させることにより周期勾配（反復プロフィールを示す勾配）を生成できる。各ネットワークは入口を共有でき、平行に動作でき、各ネットワークの出力は別の単数又は複数のネットワークの出力と合流される。あるいは、多くの入口を備えた単一のネットワークにより周期勾配を発生させることもできる。

【0028】

本発明の1つの態様において、溶質等の、異なった濃度の一つの物質を含有する2つ以上の流体を結合、混合及び分割して多様な勾配タイプを生成できる。これは図1に示すような装置を使用して実行できる。図1は、3つの入口1, 2及び3と、4及び5等の一連の蛇行縦チャンネルとを含む系の略図を提供する。蛇行チャンネルは、例えば90°を超える多数の折り返しをなして曲進するチャンネルである。したがって、蛇行チャンネルは微量流体ネットワークにおけるような小さい領域内に比較的長い流路を設けるのに有用である。蛇行チャンネルは6及び7等の横共通チャンネルによって互いに連結させることができる。一列の蛇行チャンネルは世代と呼ばれる組、例えば8又は9に包含される。世代は、好ましくは蛇行形の一般に並行動作する少なくとも2つのチャンネルを含むことができる。各世代は図1に示すピラミッド形設計等任意の形状とすることができる。微量流体ネットワークはまたいくつかの分岐点10を、縦チャンネルが共通チャンネルと交差する位置に有する。ネットワークはまた複合チャンネル11を含み、該チャンネルは最終世代に包含された各縦チャンネルに接続できる。微量流体ネットワークに使用されるチャンネルは、任意のサイズでよいが、好ましくは直径1ミリ未満、最も好ましくは直径約100ミクロン未満、そして最も好ましくは直径50ミクロン未満である。チャンネルの高さは幅と等しいか又は異なってもよく、好ましくは高さ約100ミクロン未満である。

10

20

【0029】

動作時、異なった濃度の複数の物質を包含する流体を任意の数の入口に導入できる。ポンプ、例えばシリンジポンプを使用して流体を適切なフラックス、圧力及び速度とすることができる。各入口でのフラックスを変化させて異なった種類の勾配を生成でき、簡明化のため、図1のネットワークの使用は、3つの異なった流体が同一の圧力及び複数の速度で導入される場合について説明する。入口1, 2又は3に進入する流体は、共通チャンネル6に分配され、そして第1世代の蛇行チャンネル、例えば蛇行チャンネル4に供給される。この実施の形態における蛇行チャンネルはほぼ同一の形状及び長さであり、それ故同一の流れ抵抗を示す。3つの入口の夫々に等しい量の流体が導入され、全流体量がその後個々の4つの蛇行チャンネルに分配されるので、各蛇行チャンネル内の流量は各入口から受ける流量の3/4に等しい。同様に、流体は次の世代へと前進し、ステージ2の5つの蛇行チャンネルの組に流れ込むので、ステージ2の各蛇行チャンネルの流れ抵抗が等しいと仮定すると、ステージ2の各蛇行チャンネルにおける流量はステージ1の各蛇行チャンネルを流れる流量の4/5となる。

30

【0030】

微量流体ネットワークの出力を予測して、特定の単数又は複数の勾配を形成できるようにネットワークを製作することは有利である。任意のネットワークの出力は、ネットワーク内の各分岐点での分割比が正確にモデル化できればより容易に予測できる。ピラミッド形微量流体ネットワークを使用する場合、ネットワークの出力を予測する1つの方法は以下の手順を使用することである。

40

【0031】

図1を参照すると、世代例えば8又は9はn個の縦チャンネルを包含し、したがって第n次分岐系（ $B = n$ ）と呼ぶことができる。世代又は分岐系内の各縦チャンネルは $V = 0$, $V = 1$, $V = 2$. . . $V = B - 1$ と名づけることができる。系内の流体がたどることができる様々な流路は、系全体の様々なチャンネルの抵抗に部分的に依存する。

【0032】

図1に示すように微量流体ネットワークを生産した場合、4及び5等の縦チャンネルは6及

50

び7等の横流通チャンネルよりかなり大きな流れ抵抗を与える。そのようなネットワークに関する正確な流量予測は、横チャンネルの抵抗が縦チャンネルの抵抗に較べて無視できるものと仮定することによって行える。チャンネル内の抵抗は様々な要素、例えば長さ、幅及び形状を含むチャンネルの形態、チャンネルの壁部の構造、及び1つ以上のチャンネル内に弁又はその他の絞りを含ませることによって制御できる。寸法が等しいチャンネルに関し、流れ抵抗はポアズイユの流れによりチャンネルと長さと共に直線的に増大し、したがって横チャンネルが縦チャンネルよりかなり短ければ、例えば長さが1/20であれば、横チャンネルの流れ抵抗は縦チャンネルのそのほぼ1/20となる。図1に示す単純なケースにおいて、各縦チャンネルの抵抗はほぼ同一であり、したがって流量を決定するのに必要な計算を単純化する。一つの世代内の各縦チャンネルを流れる全量は等しく、そしてさらに分析を単純化することに、夫々の前の世代からの全流量は、さらに流量を追加又は削減することなく次の世代に流れ込む。図1に示すネットワークのように左右対称のネットワークにおいて、各分岐点での分割比は以下の比によって近似化できる。縦チャンネルからの流通が横チャンネルに入る分岐点において、左への流量は $[B - V] / [B + 1]$ と近似化でき、分岐点の右への流量は $[V + 1] / [B + 1]$ と定義できる。分割比を図2aに示すが、該図は前の世代の3つの縦チャンネルがなす次の世代の複数の縦チャンネルの2つに対する寄与率を示す。図2a中、 C_p 、 C_q 及び C_r はそれぞれ、ひとつの世代の隣接する3つの縦チャンネル50、51及び52を流れる流通を表す。したがって、 C_p から右へ流れる流通成分はと定義される。同様に、中央の分岐点で右に流れる C_q の流通成分はと定義される。 C_q で表される流通から左に流れる流通成分はと等しく、流通 C_r から左に流れる流通成分はと定義できる。この実施の形態において、縦チャンネル60に進入する流量は、右へ流れる C_p の流通成分と、左へ流れる C_q の流通成分との合計と定義できる。同様に、縦チャンネル61にもたらされる流量は、右へ流れる C_q の流通成分と、左に流れる C_r の流通成分との合計と定義できる。

10

20

【0033】

図3は2入口系の略図を提供し、特別なケース、すなわち二つの入口の夫々が第1ステージに等しい流量を与え、各縦チャンネルの抵抗が同等であり、かつ連続する各世代がその前の世代より1つ多い縦チャンネルを含むケースにおける各横及び縦チャンネルの実際の流量の内訳を提供する。各ステージ又は世代の全流量は図3に示す分数によって表すことができる。

30

【0034】

入口ステージ100からの流体流通が第1世代101に進むと、もとは2つの入口で等分された流通は第1世代101において3つの縦チャンネル間で3等分される(各縦チャンネルは等しい流れ抵抗)。したがって、第1世代101の各縦チャンネルは全流量の1/3を運ぶ。第1世代101の各チャンネルがステージ100の2つの入口のいずれより少ない流量を運ぶので、外側チャンネル80への全流量は縦チャンネル70から流出する流体によって供給され、外側縦チャンネル81への全流量は縦チャンネル71によって供給される。それ故、縦チャンネル70によって送出された流量の2/3がもっぱら縦チャンネル80によって受け取られ、縦チャンネル70から受ける流量の1/3(全流量の1/6)が縦チャンネル70から縦チャンネル82に流れる。縦チャンネル82の流量は縦チャンネル70及び71からの流量の二つの部分によって等しく供給され、それ故縦チャンネル71の全流量の1/3が縦チャンネル82に受け取られる。したがって、完全な混合の後、縦チャンネル82は縦チャンネル70を流れる流体の50%及び縦チャンネル71を流れる流体の50%を包含する。縦チャンネル81への全流量(全流量の1/3)は縦チャンネル71から流出する流量から得られるので、縦チャンネル81を流れる流体はもっぱら、前のステージで縦チャンネル71を流れた流体である。同様に、縦チャンネル80に供給されるすべての流体(全流量の1/3)はもっぱら縦チャンネル70から供給される。したがって、各外側縦チャンネル80及び81はそれぞれ縦チャンネル70及び71に見出されるのと等しい組成の流体を包含し、中央縦チャンネル82は縦チャンネル70及び71によって供給される2つの流体の50/50混合物(v/v)を包含する。流体が世代101から102へと流れて次の世代に流れ込むとき、世

40

50

代102の中央に位置する縦チャンネルにおいて追加の分割が生じるが、外側チャンネル90及び91は再びもっぱらチャンネル70又は71のいずれかによって供給された流体を包含する。このようにして、多数のステージを微量流体ネットワークに追加でき、連続する各ステージの縦チャンネルの数を1つ以上増加させても、各外側チャンネルはもっぱら最初の2つの入口の一方から引かれた流体を包含する。このようにして、組成が2つの出発流体と同等な終点を含む全濃度スペクトルを展開させることができる。

【0035】

図1に示すもの等の任意の微量流体ネットワークへの流れは、ネットワーク内の液体の流れを電子回路内の電気の流れになぞらえることによって正確にモデル化できる。図4は、各チャンネル内の流れに対する相対抵抗を反映する適当な抵抗器によってどのように各縦及び横チャンネルを表すことができるかを示す。その結果、電気回路を設計するのに使用される技術は本発明の流体ネットワークを設計するのにも有用である。例えば、電気回路の設計に適用可能なソフトウェアを本発明の流体ネットワークの設計に使用できる。

10

【0036】

流体ネットワークの様々な構成部品の形態は、中でも予定される流体ネットワークの容量によって大きく変化する。好ましくは、一つのステージ内のチャンネルの長さは、チャンネルに入る2つ以上の流体の90%を上回る混合をもたらすのに十分なものとし、最も好ましくは、流体が任意のチャンネルを離れる前に99%を上回る流体の混合をもたらすことができる長さとする。拡散混合は時間の関数であるので、隣接する流体流れの滞留時間はネットワークの構成部品の大きさを定める際に重要となりうる。任意のチャンネル内の滞留時間は、他の変数の中でもとりわけ流体速度の関数であり、チャンネル寸法は特定の用途のため予定される流速が決定された後に決定するのが好ましい。1乃至100mm/sの流速がよい結果をもたらすことが分かっている。

20

【0037】

1つの実施の形態において、流体混合チャンネルは長さ約1センチであり、他の実施の形態においては長さがほぼ1ミリである。長さが10センチ以上の流体チャンネルは、大量の流体を利用するネットワークに、又は例えば特に高速の流体流通が好ましいときに適用可能である。流体チャンネルの直径も変えることができ、好ましくは直径約1ミリ未満である。最も好ましくは、流体チャンネルは直径が約100ミクロンであり、他の実施の形態では直径が50ミクロン未満、また10ミクロン大きさであってもよい。直径の小さいチャンネルは高速の層流をもたらすことができるので、さらに小さい直径のチャンネルが望まれることもあり、大きさは生産技術が何を生産できるかによってのみ制限されうる。流体ネットワークの形態は特定の用途のため最適化でき、ネットワーク内の縦チャンネルを蛇行形又は渦巻き状として比較的長いチャンネルを小さい領域内に包含できるようにすることも好ましい。加えて、流体チャンネルを立体ループ状にし、流体ネットワークの占める全面積を最小化することもできる。

30

【0038】

流体チャンネルの断面は流体を運ぶのに適当な任意の形状とすることができる。例えば、流体チャンネルの断面は円形、正方形、楕円形又は長方形とすることができる。チャンネルの壁部は親水性（水性用途に関し）又は親油性（水不溶性用途に関し）材料でコーティング又は製作して境界効果を最小にすることができる。

40

【0039】

流体ネットワーク内のステージ又は世代の数は、流体ネットワークを配置する基板の大きさによってのみ制限される。世代の数が多ければ多いほど、得られる勾配プロフィールはそれだけ微細化されうる。3、9、10、20、又は50を上回る世代を含むネットワークは次第により精巧となる勾配を生成するのに使用できる。

【0040】

本発明の流体ネットワークは、成形及び機械加工を含むいくつかの方法で製作できる。加えて、一連のチューブ又は微小チューブを接合して所望の構成とすることによりネットワークを迅速に生産できる。加えて、流体ネットワークは、予め製作した異なった部品を接

50

合してネットワークを作るようにしてモジュール式に生産することができる。

【0041】

本発明の1つの態様において、微量流体ネットワークは、高速プロトタイプング及び軟リソグラフィを使用してポリ(ジメチルシロキサン)(PDMS)で製作できる。例えば、高解像度レーザプリンタを使用して、CADファイルから流体ネットワークを構成するチャンネルを表すマスクを発生させることができる。マスクは、フォトレジスト、例えばSU-8フォトレジスト(MicroChem社)と接触させてシリコンウェーハ上にフォトレジストのネガ型マスターを生産できる透明画でよい。PDMSのポジ型レプリカは、マスターによりPDMSを成形するという当業者に公知の技術により製作できる。流体ネットワークを完成させるため、平らな基板、例えばスライドガラス又はシリコンウェーハをPDMS面に当て、ファンデルワールス力によりそこで保持するか、又は接着剤を使用してPDMSに固定できる。ネットワークに流体を導入し、ネットワークから流体を受けることを考慮して、適当な大きさの針を使用してPDMSに孔(例えば直径1ミリ)を形成することができる。流体ネットワークを流体源と連通させるため、例えばポリエチレン製のチューブを孔と連通させた状態で封止し流体接続を形成できる。漏れを防止するため、接続箇所をエポキシ糊等のシーリング材又は接着剤で封止できる。

10

【0042】

図5は本発明の装置の実施の形態を示す。3つの入口220及び一つの出口230を含むPDMS製レプリカ210をシリコンウェーハ200と接触させて封止流体ネットワークを形成する。図6は図5の実施の形態の側部破断図であり、入口220、出口230、及び入口220を出口230に接続する流体ネットワーク240を示す。

20

【0043】

他の態様において、本発明は、距離との関係で流体内の物質の濃度に変化を示す濃度勾配を提供する。勾配は気体及び液体を含む任意の流体に形成でき、例えば流体に溶解又は懸濁される物質の濃度を表すことができる。濃度勾配は、流体内又は面上の様々な位置における特定の物質の濃度又は状態を示すプロファイルによって表すことができる。図7は、物質の濃度がどのように任意の点から距離とともに変化するかを示す濃度勾配プロファイルを図示する。1つの態様において、濃度勾配は流体の流通と直交する方向に生成される。そのような濃度勾配を安定させて、流体流れの横方向の任意の位置において一定又は比較的一定の濃度を実現することができ、例えば特定の勾配を流体流れ中に1秒、10秒又は1分間保つことができ、あるいは濃度勾配を時間とともに変化するよう動的なものとする事ができる。

30

【0044】

1つの態様において、濃度勾配は層流条件下で2つ以上の流体流れを合流させることによって形成することができる。隣り合う2つの流れが層流条件下で合流すると、2つの流れの間の主たる材料移動モードは拡散メカニズムを通じてのものである。したがって、2つの流れが合流すると、より濃度の高い流れの物質は正確に予測できる速度にてより濃度の低い流れの中に拡散する。例えば、一方がある物質を高濃度で含有し、他方が同一の物質を低濃度で含有する2つの層流が互いに流体接触すると、両方の隣接する流れにおける物質の濃度はついには等しくなる。しかしながら、濃度、流体速度、温度及び流体流れの大きさ等のパラメータを制御することにより、2つの隣接する流れの間の濃度勾配を流路に沿った任意の選択点において一定のプロファイルに保つことができる。したがって、非常に急な二段プロファイルを示す濃度勾配が2つの流体流れの接触直後に実現でき、そして濃度勾配プロファイルは、2つの隣接する流れが進行するにつれ徐々に滑らかにされ、ついには濃度勾配プロファイルが平坦化され、両方の流れの物質濃度が等しくなる点に到達できる。完全な平衡のために要する時間は、有限媒体における次元拡散方程式を、特定のケースに関する初期分配を考慮して解くことにより見積もることができる。この問題の分析解は式1によって与えられる。

40

【0045】

【数1】

50

$$C(t, x) = \frac{1}{2} C_0 \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left\{ \operatorname{erf} \frac{h+2nl-x}{2\sqrt{Dt}} + \operatorname{erf} \frac{h-2nl+x}{2\sqrt{Dt}} \right\} \quad (1)$$

ここで、 $C(t, x)$ は時間 t 及び点 x における濃度であり、 D は cm^2/s での拡散係数であり、 t は秒での時間、 l はチャンネルの幅、 h は初期分配の幅、及び C_0 はチャンネル内の初期濃度である。合計 ($n = -10 \sim +10$ 、 $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、幅 $50 \mu\text{m}$ 、初期分配幅 $25 \mu\text{m}$) における最初の 21 項 (term) を使用した数値評価は、97% の拡散混合が 1 秒後になされたことを示す。我々は幅 l のチャンネルの横方向の及び時間 t における混合パーセントを、

【0046】

【数2】

$$\text{混合\%}(t) = \left(1 - \frac{\int_0^l |C(t) - C(\infty)| dx}{\int_0^l |C(0) - C(\infty)| dx} \right) \times 100\% \quad (2)$$

と定義する。

【0047】

ここで、 $C(t)$ 、 $C(\infty)$ 及び $C(0)$ は、それぞれ時間 t 、 $t = \infty$ 及び $t = 0$ におけるチャンネルの幅方向の濃度プロファイルである。

所望のプロファイルを、全く拡散が生じていない点及び完全な相互混合が生じた点、における又は間のスペクトルの任意の点において選択できる。そのうえ、このプロファイルはこれらの同一の条件下で正確かつ確実に再現できる。任意の数の流体流れを合流でき、そしてより精密な濃度勾配を発生させようとするときは、より細い流体流れを使用することが好ましい。加えて、細い流体流れはそれだけ乱流となりにくく、したがってより細い流れはより安定した反復可能な勾配を提供できる。

【0048】

隣接する流れは、単一の位置で互いに合流させることもでき、又はずらして複合流の流通に沿った様々な点で複合流に合流させることもできる。このようにして、新たな物質、又は高又は低濃度の原物質を、複合流内で初期の拡散がすでに生じた後の複合流に導入できる。隣接する流体流れは、複合流を構成する他の流れと大きさが等しい必要はない。細い流れは、一般により滑らかな勾配が得られるので太い流れに比べ好ましい。加えて、細い流れは、断面積がより大きい等速の流体流れより乱流となりにくい (流体流通は約 2,000 以上のレイノルズ数で乱流と考えられる)。乱流混合を最小にして濃度勾配に生じうる変動を減らすことが好ましい。したがって、100 ミクロンの幅を有する流体流れは 1 ミリの幅を有する流体流れに比べ好ましく、同様に後者は 1 センチの幅を有する流体流れに比べ好ましいといえる。

【0049】

混合メカニズムを主として拡散に制限することにより、複合流の流通と直交する方向に比較的安定な濃度勾配を維持することが可能となる (式 2 参照)。したがって、隣接する流れの間の拡散を止めることはできないが、隣接する流れの動的な流通は流路に沿った任意の特定の点において一定の勾配を提供する。もちろん、所望により、任意の数のパラメータ、例えば流れの濃度、流れの流速及び各々の流れの組成を変えることにより濃度勾配を任意の特定の点で徐々に変更することができる。

【0050】

1 つの態様において、複数の濃度勾配を単一の複合流に形成できる。例えば、図 8 は複合流に沿った同一位置での 2 つの異なった物質の仮説濃度勾配プロファイルを提供する。プロファイル 300 及び 310 は 2 つの異なった物質に関する 2 つの異なった濃度勾配を表す。プロファイル 300 は、物質の濃度が流れの中央近くで最も集中し、両縁部に向かっ

10

20

30

40

50

て減少する濃度勾配を示す。プロフィール 310 は、濃度が一方の縁部でゼロであり、反対の縁部で高濃度に増加し、増加率が初期には相当高く、第 1 縁部からの距離が増加するにしたがって平らになる濃度勾配を示す。

【0051】

他の態様において、流体中又は面上の濃度勾配は、複合流の流速を調整することにより変化させることができる。例えば、2つ以上の流れを結合して層流とし、個々の流れの一方から隣接する流れへと少なくとも多少の拡散を生じさせ、その後複合流の流速を調整して特定の濃度勾配が実現される流れ沿いの位置を変更することにより勾配を動的に変更できる。図 9 は 3 つの異なった速度で流れる同一の流体流れの 3 つの異なった顕微鏡写真である。これらの顕微鏡写真は、複合流に結合された 9 つの個々の流れから構成された複合流を撮ったものである。顕微鏡写真を撮った位置は、上述の勾配発生器の図 1 に示す位置 11 と同じである。3 つの蛍光顕微鏡写真の夫々の頂部の白い点線は、各々のチャンネルの終端を表し、9 つの異なった個々の枝路が合併して複合流を形成する箇所を示す。図 9 に示す実施の形態において、9 つの枝路チャンネルの夫々はほぼ幅 50 ミクロン、高さ 100 ミクロンであり、枝路は結合されて幅 900 ミクロン、高さ 100 ミクロンのチャンネルにおける複合流を形成する。(原色顕微鏡写真は Noo Li Jeon, Stephan K. W. Dertinger, Daniel T. Chiu, Insung S. Choi, Abraham D. Strook 及び George M. Whitesides, Langmuir 2000, 16, 8311-8316 で見ることができる。) 様々な濃度のイソチオシアン酸フルオレセイン (FITC) を含有する溶液を 9 つの異なったチャンネルの夫々に流した。より高濃度の領域は蛍光顕微鏡写真においてより明るい、より緑がかった領域として現れた (提供した白黒のフォトコピーにおいてより明るい、中央よりの領域)。出口チャンネルにおける流速は、各図 9 a、b 及び c においてそれぞれ毎秒 1 mm/s、毎秒 1.0 mm/s、毎秒 10.0 mm/s と変化させた。9 つの個々の流れは、図 1 に示す勾配発生器を用い、5 重量% FITC 水溶液を入口番号 2 に導入し、純水を両入口 1 及び 3 に導入して生成した。各顕微鏡写真の底部近くの白い水平の点線は、9 つの独立の流れの接点から 500 ミクロン下流の点に対応する。溶液の蛍光強度は出発溶液について正規化され、濃度によって表された。

【0052】

図 9 の各顕微鏡写真の下に示すグラフは、接点から 500 ミクロン下流の点 (白い水平の点線) でのチャンネルの横方向の蛍光強度を提供する。各グラフの黒い点は、各枝路チャンネルで完全な混合が生じたとしたら各枝路チャンネルに存在すると計算された濃度を表す。これらの値は、上述のように得られた、流通における初期 FITC 濃度を使用し分割比を使用して得られた。

【0053】

図 9 a 及び 9 b を見ると、最大の FITC 濃度は複合チャンネルの中央に見出され、その領域で 57% の FITC を示す。同じチャンネルの外側領域は 0% の FITC、又は基本的に入口 1 及び 3 (図 1 参照) に加えたままの純水を示す。添付の他の図面におけると同様、観察された蛍光 (黒い線) 及び計算上の蛍光 (黒い点) の両方をグラフに示す。図 9 a も 9 b も、計算値とよく一致する濃度を示す蛍光を表し、したがって各々のチャンネルで流れの完全な混合が生じたことを示す。図 9 a において、9 つの別個の流れが合流する点の 500 ミクロン内でかなりの拡散が生じた。この拡散は、9 つの個々の層流の夫々の間の境界がぼやけていることから明らかである。

【0054】

しかしながら、図 9 b (毎秒 1.0 mm/s の流速) はぼやけがずっと少なく、図 9 a の滑らかな勾配に対し段階的な勾配を提供する。したがって、毎秒 1.0 mm/s の流通 (図 9 b) では、完全な混合 (99% を上回る) は勾配発生器の各々の混合チャンネルにおいては明らかに生じているが、この流速では、500 ミクロンは、十分な拡散が生じて図 9 a のグラフに見られる段階的な勾配を滑らかにするのに十分な長さ又は滞留時間を提供するものではない。

10

20

30

40

50

【0055】

しかしながら、図9cは10.0mm/sの速度での同じ実験の結果を示す。この顕微鏡写真は、不完全な拡散が複合チャンネルにおいて生じたのみでなく、不完全な拡散が勾配発生器の少なくともいくつかの混合チャンネルにおいても生じたことを示す。したがって、この比較的速い流速では、勾配発生器の様々な枝路の蛇行チャンネルの長さはこれら溶液を完全に混合させるには十分でなかった。

【0056】

図10は、本発明を使用して勾配を動的に変化させることができる実施の形態を示す。例えば、動的勾配は、流体ネットワークの1つ以上の入力流速を独立に調整することによって生成できる。一つの入力の流通を増加又は減少させると、入力フラックスの変化により、得られる勾配形状に対する個々の入力の影響が増加又は減少し得られる勾配が動的に変わりうる。図9におけると同様、図10の顕微鏡写真は、微量流体ネットワークを流れるFITC溶液及び水の個々の流れから形成された複合流から得られた。図9におけると同様、3つの入口が使用され、左の入口は純水を運び、中央の入口は5% (w/w) FITC溶液を運び、右の入口は純水を運んだ。図10に示す出力を生成するのに使用したネットワークは、図9の装置で使用された9つの枝路チャンネルではなく、合計15の枝路チャンネルを有した。各チャンネルはほぼ幅50ミクロン、高さ100ミクロンであった。

10

【0057】

図10bにおいて、3つの入口の夫々は1mm/sの定速度でネットワークに流通を供給した。はっきりとした連続的な勾配が図10bに明らかであり、この勾配は、最高濃度領域が中央部にあり、より低い濃度領域が両側に明らかなので図9aに示す勾配と類似する。

20

【0058】

図10aの顕微鏡写真は、左の入口の流通を0に減らし、中央及び右手の入口の流通を共に毎秒1ミリに維持したときに形成されたFITCの勾配を撮ったものである。その結果、蛍光性FITC溶液の左への移動が明らかであり、1つの入口の流通を調整することにより勾配を変えられることを示す。

【0059】

図10cの顕微鏡写真は、左の入口の流速を3mm/sに増加し、一方中央及び右手の入口の流通を1mm/sに維持したときの結果を示す。最大蛍光が勾配の右側に移動したことは明らかであり、おそらく左の入口からの流通が増加した結果である。したがって、ただ1つの入口の流通を変えることにより勾配を左又は右に移動させることができる。複数の入口の流通を変えることにより、様々な勾配プロファイルを得ることができる。

30

【0060】

図10はまた、流体が流れるチャンネルの形態を変えることによりどのように勾配プロファイルを圧縮又は拡大できるかを示す。各図10a、b及びcにおいて(及び他の提供図において)、流通の方向は頂部から底部である。750ミクロンの断面寸法を、出口チャンネルの幅を変化させることによって50%減らし375ミクロンとした。したがって、各々の流れは勾配に対し最初約50ミクロンの幅だけ寄与するが、原幅の50%に絞った後は、各々の流れは幅に対し約25ミクロン寄与する。したがって、複合流の流通を絞ることによってよりコンパクトな勾配を得ることができる。全体のフラックスは一定のままであるので、流通が絞られると速度は必然的に増加する。同様に、チャンネルを拡大して勾配を広げることができ、多数の絞り及び拡大を任意のチャンネルに使用することができる。加えて、これらの絞り及び拡大のオプションを3次元微量流体ネットワークと結合させることにより、追加の制御レベルが提供されてユーザがより多様な勾配を作成するのを可能とする。

40

【0061】

図11a、b及びcに示す各勾配は、各ネットワークが2つの入口及び8つの出口を有する3つの微量流体ネットワークの出力を結合して得られたものである。各図11a、b及びcの頂部の百分率は、各々のネットワークの各入口に供給される各溶液中のFITC濃

50

度を示す。100%は5%FITC水溶液を表す。各図11a、b及びcの点 L_1 は、個々の流れが合流して複合流を形成する点の直下のチャンネルの点である。 L_2 は L_1 から800ミクロン下流の点を表す。各図において、 L_1 に濃度プロファイルの個々の段が顕微鏡写真から直接観察でき、各図の底部のグラフにも明らかである。この得られる段階的な勾配は、拡散混合が隣接する個々の流れの境界を横切ってほとんど又は全く生じなかったときに生じる。対照的に、 L_2 （毎秒514ミクロンの流速で800ミクロン下流、合流後1.56秒）にかなりの量の拡散が生じ、勾配プロファイルを滑らかにしている。段はもはや顕微鏡写真を見ても、又は各顕微鏡写真の下に示すグラフによっても明らかではない。 $D = 2.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ の値を拡散係数（構造的にFITCに類似し、同等の分子量を備えるローダミン6Gの拡散係数）として使用すると、プロファイルが90ミクロンの周期を有し、約1.5秒後に崩壊すると予測される。このことは顕微鏡写真で実験的に確認される。図11aは、ピーク振幅も各々の線状勾配の傾斜も左から右に減少する鋸歯状勾配を示す。図11aにおいて、周期勾配は、3つのネットワークの夫々の入口の1に純水を、及び左から右の順に各々のネットワークに100%、75%及び25%FITC水溶液を流すことによって発生した。図11bは、100%及び50%、75%及び25%、及び50%及び0%の溶液を3つのネットワークの夫々に入力すると得られる周期勾配を示す。図11cは、ネガ型及びポジ型両方の傾斜線状勾配を使用して形成できる周期勾配を示す。そのような勾配は、100%及び50%、0%及び50%、及び100%及び50%の濃度のものを3つのネットワークのそれぞれに入力して得られた。各グラフは、各々の流れがチャンネルの幅方向の様々な点で表す濃度パーセントを示す。x軸は、左から右へチャンネル内で各読み取りが行われた点を提供する。位置は複合チャンネルの左側からミクロンで表される。

10

20

【0062】

図12は、3つのネットワークを結合して勾配を生成したときに得られた実験結果を示し、各ネットワークは3つの入口を有する。3つの入口を使用して、放物線状勾配プロファイル（二次多項式）を構成でき、図12aにどのように3つの放物線状勾配を接合して独特な複合勾配を形成できるかを示す例を図示する。図12bは、2つの線状勾配を放物線状勾配と結合させて線状及び二次の両プロファイルから成る複合勾配を発生させた例を示す。両図12a及び12bに、流れ収束点（ L_1 ）及び点（ L_1 ）から800ミクロン下流（ L_2 ）で予想され、かつ検出された蛍光量を示す。図11におけると同様、より大量の拡散が点 L_2 で生じ、段階的な勾配を滑らかにして連続的な勾配としている。

30

【0063】

図13は、3つの入口及び9つの出口を有する微量流体ネットワークによって得られるいくつかのプロファイルを示す。各図13a、b及びcは、pH8.3の100mMNaHCO₃緩衝液中に100%、50%及び0%のフルオレセイン（正規化された）を含む3つの異なった溶液の順序を入口で入れ替えて得られたものである。各々の入口に入力された溶液を各図a、b及びcの頂部に示す。発生した各プロファイルは二次多項式で説明できる。各図の底部のグラフの暗線は計算上の勾配プロファイルを示す。下側の各グラフの灰色の線及び点は各々の入口からのフルオレセイン寄与率を示す。図13aは、同じ流体内の2つの二次勾配を重畳することにより線状勾配が得られる興味あるケースを示す。

40

【0064】

他の態様において、本発明は面トポグラフィ（topography）を形成するのに使用できる。本発明により提供される勾配は、面に対し材料を除去又は追加することにより面を形成するのに使用できる。例えば、面上を流れる流体中の材料又は関連材料の濃度に比例して面に該材料を堆積させることができる。あるいは、面上を流れる流体が面から材料を除去する物質を含有し、それが流体中の該物質の濃度に比例して材料を除去することができる。それ故、面を横切って流れる流体に勾配を発生させることができれば、流体中の濃度勾配に応じて又はこれを反映してその面のトポグラフィを変更できる。面を増大させるのに使用できる材料には、例えば金属、ポリマー、塩、リガンド及び生物材料が含まれる。面を部分的に除去するのに使用できる材料には、例えば酸、塩基、エッ

50

チング剤及び生物材料が含まれる。

【0065】

図14は、シリコンウェーハ上に配置されたシリコンダイオード層に弗化水素酸溶液を流すことによってどのようにトポロジー勾配を形成できるかを示す。図14aはHF溶液を分配するのに使用された微量流体ネットワークを示す。図14bは、図14aに示すネットワークの部分拡大図であり、2つの別個の流れが共通チャンネルで合流し、次の世代の個々の混合チャンネルに供給される分岐点を示す。ネットワーク内の各蛇行チャンネルは長さ約10ミリであり、各チャンネル内の流体がもっぱら拡散のメカニズムを通じて混合するのに十分な滞留時間を与える。ネットワークの各微量流体チャンネルは幅約50 μ m、高さ約100 μ mである。左から右に向かって、水を含む溶液を第1入口に注入し、5%HP水溶液を第2入口に注入し、水を右の入口に注入した。各入口流れの流通は毎秒0.1ミリメートルに保たれた。HP溶液はSiO₂をエッチングすることが知られており、高濃度のHPはより大量のSiO₂をより迅速にエッチングする。図14bの顕微鏡写真は、微量流体ネットワークに刻まれた異なる深さを示す。図14bの左上よりのチャンネルは、鮮明な青色（フォトコピーのチャンネルの最暗部として出現）を示し、シリコン基板上に厚さ約310nmのシリコンダイオードを表す。右上方のチャンネルは、オレンジ色（フォトコピーのより明るい領域として出現）を示し、シリコンダイオード層の約450nmの厚さを示す。図14bの下半分の蛇行チャンネルで結合されると、チャンネルは薄緑色となり（フォトコピーのより明るい領域）、結合流体を包含するチャンネルにおける約340nmの深さを示す。したがって、強及び弱溶液の結合により、個々の強及び弱溶液によってなされる割合の中間の割合でもって材料が除去された。図14cは拡大図であり、9つの出口流れと接触する面の様々な位置から除去された材料の量を視覚的に示す。下のグラフに示す各チャンネルの深さは、表面プロフィルメータスキャンの結果を示し、該スキャンは、9つの個々のチャンネルを単一の複合チャンネルに結合する点の直前でそれらのチャンネルを横切るように行った。したがって、エッチングされたチャンネルの色（青、オレンジ又は緑）から推測できるSiO₂層の厚みは表面プロフィルメータのデータと一致する。これらの結果は、微量流体ネットワークを予測設計して所望のトポロジー勾配を生成できることを示している。

10

20

【0066】

他の態様において、異なった形状を同時に生成して単一の結合流に複数の勾配を生成できる。図15は、夫々2つの入口及び9つの出口を有する2つのネットワークの出力をどのように使用して2つの鋸歯状勾配を結合できるかを示す。各ネットワークの各入口対には同じ対の溶液を供給した。左の入口には100%FITC（緑）エタノール溶液を供給し、右の入口には100%テトラメチローダミンエチルエステル（tetramethylrhodamine ethylester）、TMRE（赤）を含むエタノール溶液を供給した。したがって、各寄与ネットワークは各蛍光染料の線状勾配（左から右へ緑から赤）を提供し、一方の染料の勾配は他方の勾配の鏡像となっている。これらのミラーリング線状勾配を次に図15に示すように結合し、得られる勾配に追加の複雑さのレベルを与えることができる。

30

【0067】

図16はカラー顕微鏡写真の白黒フォトコピーであり、3つの入口及び9つの出口を有する本発明の微量流体ネットワークの拡大図を示し、9つの出口は合流して複合チャンネルを形成している。シリンジポンプを使用して、緑の染料（FITC）を左の入口に注入し、赤の染料（TMRE）を右の入口に注入し、両染料の1/1の混合物を中央の入口に注入した。各溶液を毎秒1.2ミリメートルの流速の同一の速度及びフラックスで入力した。染料の流れがネットワークを下るにつれて、流れは交点で分割され、隣り合う流れと様々な比で結合し、その後蛇行チャンネルにおいて拡散により混合したことが顕微鏡写真から明らかである。ネットワーク内のすべての流通は層流であった。各世代の最外チャンネルは、左と右の入力チャンネルに入力された流体の鮮やかな色（左側に緑、右側に赤）を保持し、したがって得られた勾配は左側の100%FITCを含む溶液から右側の100%TMRE

40

50

Eに及んだ。9つの個々の出口を合流させて複合流を形成した後、拡散により段階的な勾配はぼやけ、図16の底部に示すようなより滑らかな勾配となった。フォトコピー中、複合流の右よりの明るい領域は赤であり、左よりの中密度の領域は緑であり、暗い中央部分は赤と緑の結合であった。

【0068】

図17aは、拡散のメカニズムを通じてチャンネルの下流の3つの異なる位置の濃度プロフィールに沿って生じるぼやけを示す。拡散による崩壊は一次元拡散方程式、 $c/t = D(\partial^2 c / \partial x^2)$ によって説明でき、ここでDは拡散係数であり、cは物質の濃度であり、xは流体流通の方向と直交する座標である。フルオレセインの拡散係数を $2.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 / \text{s}$ と仮定し、チャンネル内の流体の流速を考慮すれば、濃度プロフィールはFTCS(Forward Time Centered Space)差分方式を使用して計算できる。理論上の計算値は実験的に観察されたプロフィールとよく一致する。計算結果を図17bに掲げる。プロフィール内のぼやけ率は、例えば勾配の形状に依存し、一般に最も大きな変化は勾配の曲率が最も大きな領域で生じる。図17に示す例で、この最も大きなぼやけはプロフィールの線状及び放物線状部分の接点で生じている。形状の鋭さがより少ない領域はより長い時間プロフィールの形状を保持できる。

10

【0069】

他の態様において、本発明は異なった剪断値の流体流れを生成する方法及び装置を提供できる。例えば、一つの流体又は流体群を図1に示すような微量流体ネットワークに入力でき、ネットワーク内の異なったチャンネルが異なった流れ抵抗を有するようにできる。それ故、出口の任意の1つを流れる流体の速度はその特定の全流路で受ける抵抗によって変化する。このようにして、弁又は他の絞りを使用してネットワーク内のチャンネルの抵抗を変えて、流体を供給する単一のポンプを備えた単一のネットワークにより異なった速度、したがって異なった剪断値の複数の流体流れを実現できる。

20

【0070】

他の態様において、本発明は流体溶液を作成、分配又は希釈するのに使用できる。例えば、図18を参照すると、3つの異なった溶液を流体ネットワークの3つの入口に入力でき、5つの出口が別個の受け容器に別々に供給できる。そのような系を使用して、一つの濃厚溶液を1つ以上の入口にポンプ送りし、一つの希薄溶液を1つ以上の他の入口にポンプ送りできる。各入口に関し適切なネットワーク形態及びフラックス速度を選択することにより、5つの出口の夫々において異なったかつ予測可能な溶液が生成される。したがって、任意の溶液を、連続的に希釈液を作成する多数のステップを通じてでなく、単に異なった濃度の物質を含有する2つの溶液を結合させることによって作成することができる。この方法によれば、物質は最低量ですみ、したがって高価な化学物質及び試薬を節約でき、ムダを減らすことができる。加えて、異なった濃度の各溶液を正確かつ同時に等量で生成できる。

30

【0071】

さらにまた、例えば入口の数を増やすことにより、追加の物質をネットワークに導入でき、2つ以上の物質を異なった、けれども予測可能な量で含有する溶液をもたらすことができる。したがって、2つ以上の物質を異なった、けれども厳密な量で含有する微量の溶液を連続ベースで生成できる。例えば、試薬を含有する溶液を1つの入口に、緩衝剤を含有する溶液を第2入口に、そして酸を含有する溶液を第3入口にポンプ送りできる。このようにして、様々なpHで様々な濃度の試薬を含有する個々の流体流れを生成できる。各流れの出力は、微量流体ネットワークの構造によって、及び各入口で採用するフラックス速度によって予測できる。

40

【0072】

他の実施の形態において、同一の装置を使用して滴定流体を供給し、流体の1つ以上の特性を各出口間に変えることができる。例えば、それぞれ異なる量の滴定剤を含有する様々な溶液に対し一つの物質を同時に滴定できる。あるいは、溶液中の成分の1つを各出力溶液に関し一定に保ちながら他の成分を変えることができる。もちろん、多数のネットワー

50

クを並行に使用して、各ネットワークからの異なった出力を合流させ特有の複数の溶液を生成することもできる。そのような系を改良して、時間、材料及び労働集約型の連続的な希釈技術によってしか作られないような任意の組合せの溶液を生成することもできる。加えて、例えば、ネットワーク内に弁又は入口に可変速ポンプを用いて出力を動的に変えることができる。

【0073】

他の態様において、材料を面上に堆積させて静止勾配を形成できる。例えば、図1に示すような勾配発生器を使用して流体中に化学物質又は生化学物質の勾配を形成し、化学物質又は生化学物質を堆積させる面上にこの溶液を流すことができる。これにより、変化の規模が非常に小さい複数の濃度で様々な化合物を面に固着させることが可能となる。この技術を使用して流体中に懸濁又は溶解できる任意の物で面を誘導体化できる。流体をその後図1に示すような装置に供給し、所望の濃度勾配を生成できる。面を濃度勾配と接触させ、面が流体に含まれた材料に対し親和力を有すれば、材料は接触点におけるその溶液中の濃度に比例して面に堆積される。さらにまた、2以上の成分を含有する溶液を操作して、各成分が異なった濃度勾配の面を提供できる。例えば、1つの成分を左から右に増加する線状勾配で堆積させ、一方第2成分を面に放物線状に適用することができる。さらにまた、2つの物質を同じ流体を使用して面に同時に適用できる。面に適用できる材料の例には、ペプチド及びリガンド、ポリマー及びプレポリマー、及び特定の反応性基を示す化合物等の生化学物質及び化学物質が含まれる。例えば、混合SAMを所望の勾配で面に堆積できる。面には、例えばガラス、シリコン、金等の金属及びゲルが含まれる。加えて、これらの成分のいずれも、線状勾配はもちろん二次又はより高次の勾配で面に施すことができる。関連の態様において、面に付着した材料は、面に付着した材料に対し親和力のある物質の勾配を含む流体を流すことにより優先的に除去できる。

10

20

【0074】

当業者であれば、ここに列記したすべてのパラメータが代表的なものであり、実際のパラメータが本発明の方法及び装置を使用する特定の用途に依存するものであることは容易に認識するであろう。それ故、上述の実施の形態は例示としてのみ提示されたものであり、添付の特許請求の範囲及びその均等の範囲内で、本発明を詳細に説明したのとは別様に実施しうることは理解されるべきである。

【図面の簡単な説明】

30

【図1】

3つの入口と、9つの出口と、一連の蛇行チャネルを含む流体ネットワークの略図である。

【図2】

図2aは、図1の流体ネットワークの分岐点でどのように流通が分配されるかを示す略図であり、図2bは、他の実施の形態においてどのように流通が分配されるかを示す略図であり、図2cはさらに他の実施の形態においてどのように流通が分配されるかを示す略図である。

【図3】

2つの入口と、連続的な各世代に1つの追加の縦チャネルを有する対称的な流体ネットワークにおいてどのように全流量が分配されるかを示す略図である。

40

【図4】

電気抵抗を使用して流体流通に対する抵抗を表すことによってネットワークをモデル化できることを示す流体ネットワークの説明図である。

【図5】

勾配発生器の上面図である。

【図6】

図5の勾配発生器の側部破断図である。

【図7】

理論上の濃度勾配をグラフで示す図である。

50

【図 8】

重畳された 2 つの濃度勾配をグラフで示す図である。

【図 9】

図 9 a、9 a 及び 9 c は、複合流体流れにおける蛍光濃度勾配を、蛍光顕微鏡写真の白黒フォトコピーと共にグラフで示す図である。

【図 10】

図 10 a、10 b 及び 10 c は、異なった条件下で同一の装置により発生した 3 つの異なった濃度勾配を、蛍光顕微鏡写真の白黒フォトコピーと共に示す図である。

【図 11】

図 11 a、11 b 及び 11 c は、各ネットワークが 2 つの入口と 8 つの出口とを有する 3 つの流体ネットワークの出力を結合して発生した周期濃度勾配を、蛍光顕微鏡写真の白黒フォトコピーと共にグラフで示す図である。 10

【図 12】

図 12 a 及び 12 b は、各ネットワークが 3 つの入口と 8 つの出口とを有する 3 つの流体ネットワークの出力を結合して発生した周期濃度勾配を、蛍光顕微鏡写真の白黒フォトコピーと共にグラフで示す図である。

【図 13】

図 13 a、13 b 及び 13 c は、3 つの入口と 9 つの出口とを有する個々の流体ネットワークによって発生した単一の成分の濃度勾配を、蛍光顕微鏡写真の白黒フォトコピーと共にグラフで示す図である。 20

【図 14】

図 14 a、14 b 及び 14 c は、ネットワーク及び SiO_2 面にエッチング剤を分配したトポロジー結果を示す略図、グラフ図及び光学顕微鏡写真の白黒フォトコピーである。

【図 15】

2 つの化学物質勾配を結合して形成された複合勾配であって、各勾配が、2 つの入口及び 9 つの出口を有するネットワークと、各ネットワークの異なった入口に供給した 2 つの異なった蛍光溶液とによって発生した、複合勾配を示す蛍光顕微鏡写真の白黒フォトコピーである。

【図 16】

3 つの入口、6 つの世代及び 9 つの出口を有するネットワークの左右の入口に 2 つの異なった溶液を流し、中央の入口に結合溶液を流したときに生じる拡散混合の光学顕微鏡写真の白黒フォトコピーである。 30

【図 17】

図 17 a 及び 17 b は、FITC を含有する複数の流体から形成された複合勾配の流路に沿った様々な点での拡散混合のため生じるぼやけをグラフで示す図と、光学顕微鏡写真の白黒フォトコピーである。

【図 18】

3 つの入口、5 つの出口の微量流体ネットワークを示し、層流における隣接する流体流れの間に生じるぼやけを示し、複合流を形成する前に個々の流れをサンプリングできる点 (A) を示す略図である。 40

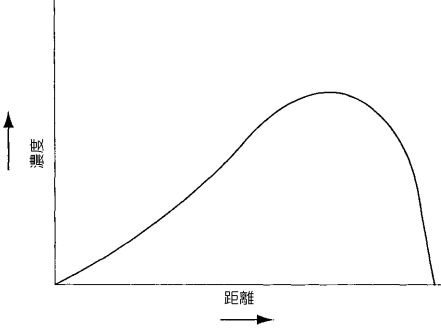
【符号の説明】

| | |
|------------|-----------|
| 1 入口 | 2 入口 |
| 3 入口 | 4 縦チャンネル |
| 5 縦チャンネル | 6 共通チャンネル |
| 7 共通チャンネル | 8 世代 |
| 9 世代 | 10 分岐点 |
| 11 複合チャンネル | 50 縦チャンネル |
| 51 縦チャンネル | 52 縦チャンネル |
| 70 縦チャンネル | 71 縦チャンネル |
| 80 縦チャンネル | 81 縦チャンネル |

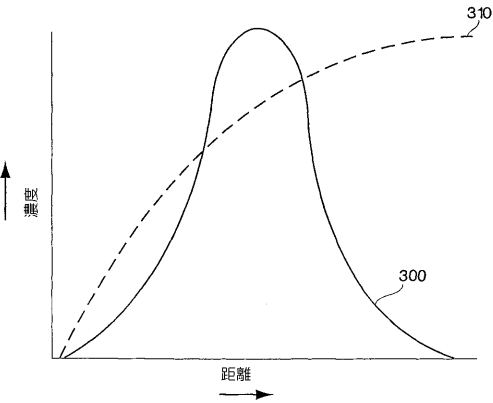
- 8 2 縦チャンネル
- 9 1 外側チャンネル
- 1 0 1 第 1 世代
- 2 0 0 シリコンウェーハ
- 2 2 0 入口
- 2 4 0 流体ネットワーク
- 3 1 0 プロフィール

- 9 0 外側チャンネル
- 1 0 0 入口ステージ
- 1 0 2 世代
- 2 1 0 P D M S 製レプリカ
- 2 3 0 出口
- 3 0 0 プロフィール

【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

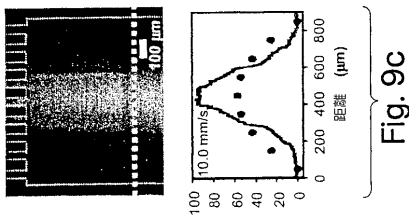


Fig. 9c

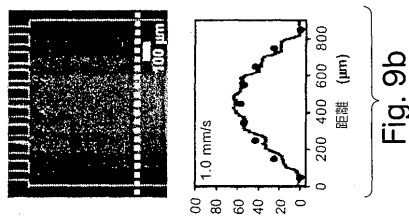


Fig. 9b

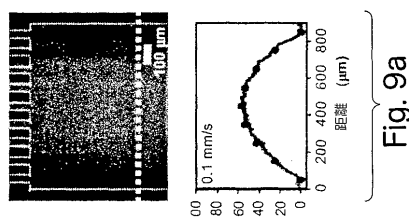


Fig. 9a

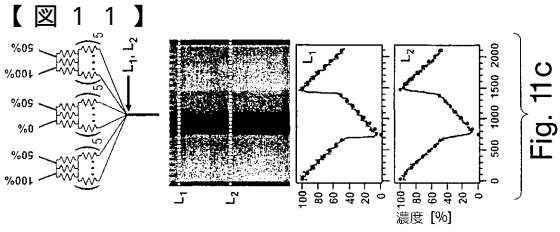


Fig. 11c

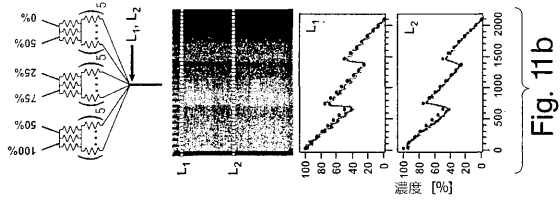


Fig. 11b

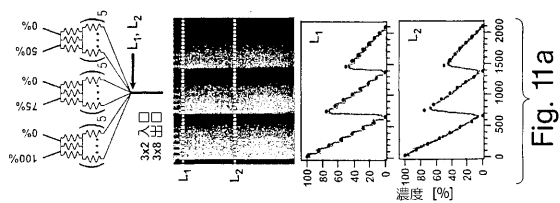


Fig. 11a

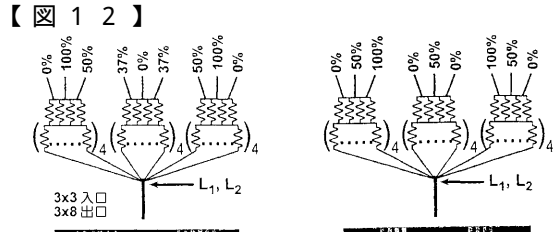


Fig. 12a

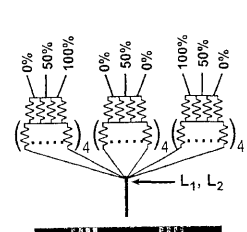


Fig. 12b

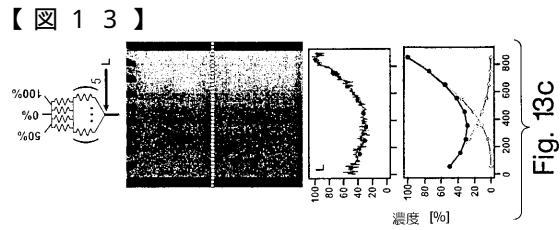


Fig. 13c

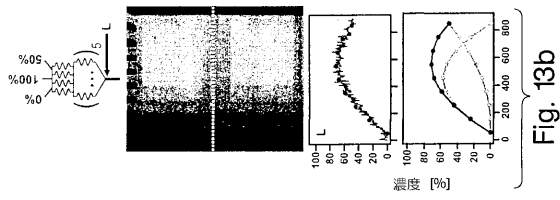


Fig. 13b

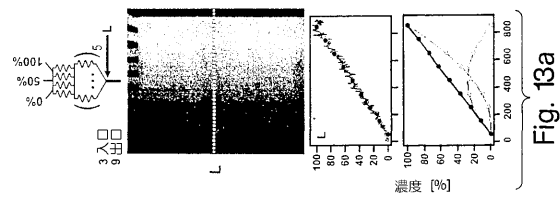


Fig. 13a

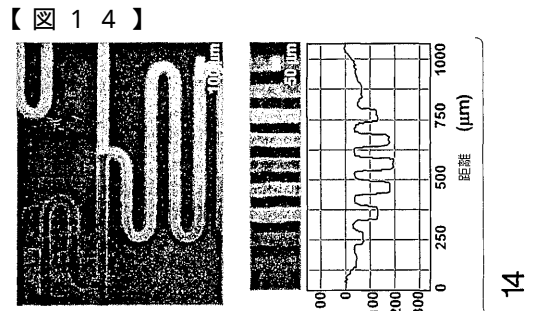
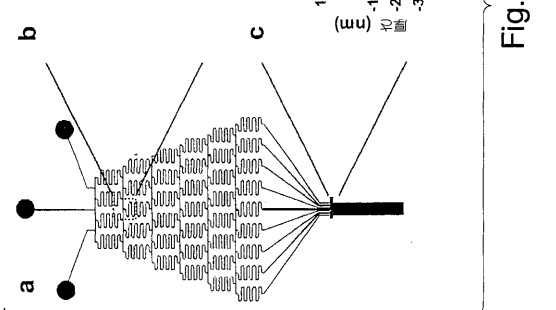
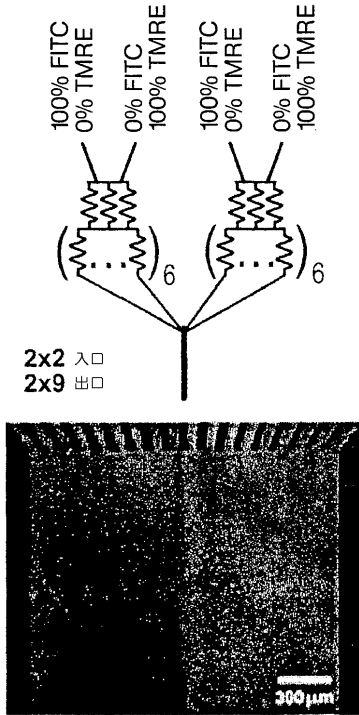


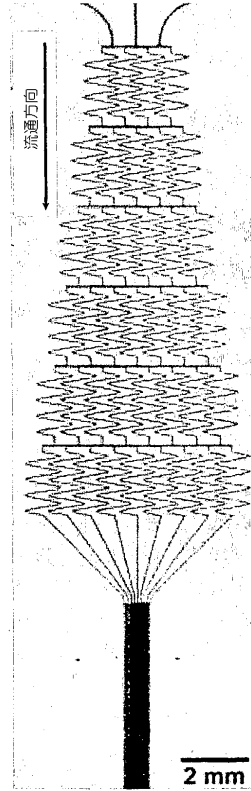
Fig. 14



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

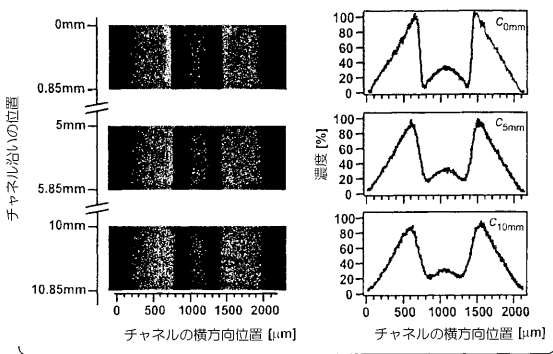


Fig. 17a

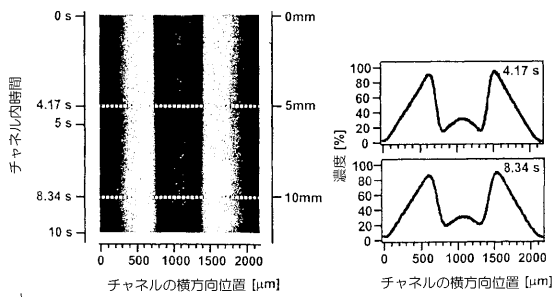
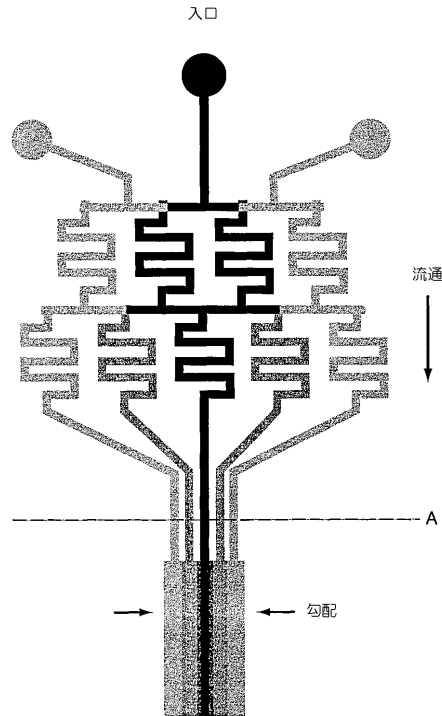


Fig. 17b

【 図 1 8 】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/22264 A2

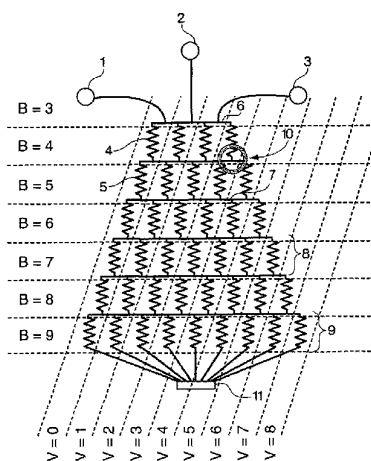
- (51) International Patent Classification: **B01L**
- (21) International Application Number: PCT/US01/42195
- (22) International Filing Date: 18 September 2001 (18.09.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/233,142 18 September 2000 (18.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE** [US/US]; Holyoke Center-Suite 727, Cambridge, MA 02138 (US).
- (72) Inventors: and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **JEON, Noo, Li** [KR/US]; Apartment 317, 29 Garden Street, Cambridge, MA 02138 (US). **DERTINGER, Stephan, K., W.** [DE/US]; Apartment 308, 2 Ware Street, Cambridge, MA 02138 (US). **CHIU, Daniel, T.** [CA/US]; 7009 40th Avenue NE, Seattle, WA 98115 (US). **CHOI, Insung, S.** [KR/US]; 808 Memorial Drive #209, Cambridge, MA 02139 (US). **WHITESIDES, George, M.** [US/US]; 124 Grasmere Street, Newton, MA 02158 (US).
- (74) Agent: **OYER, Timothy, J.**; Wolf, Greenfield & Sacks, P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,

[Continued on next page]

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR GRADIENT GENERATION



WO 02/22264 A2



(57) Abstract: A method and apparatus for treating a fluid. A method for treating a fluid may include combining two or more separate streams into a common stream and then splitting the common stream into a new set of separate streams wherein the same streams may possess different properties. The separate streams may be combined to produce a gradient, such as a concentration gradient or shear gradient. The apparatus of the invention may provide a network of fluidic channels that may be used to manipulate a fluid to produce, for example, a gradient or a series of solutions containing a substance at varying concentrations.

WO 02/22264 A2



MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU,
ZA, ZW.

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

(84) **Designated States (regional):** ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD,
TG).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 1 -

METHOD AND APPARATUS FOR GRADIENT GENERATIONFIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a method and apparatus for manipulating the composition of a fluid or fluids, and more particularly, to a method and apparatus for producing fluid gradients.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Delivery of fluids for industrial, chemical and biological applications has evolved to a point where extremely small, or very large, quantities of fluid can be accurately delivered using a variety of pumping and pipetting techniques. In addition, techniques have been developed for eroding surfaces and for applying chemicals to surfaces in very precise quantities and at specific locations. These techniques may be used to apply solutions and suspensions accurately and evenly over a surface to provide consistent surface chemical densities. However, applications may exist where it is not desirable to introduce or deposit solutions or chemicals evenly, but rather as a gradient where the density of an applied material is greater at one part of a surface than it is at another part of the surface.

Traditionally, linear concentration gradients exhibiting a variation in concentration in relation to distance may be formed by allowing solutes to diffuse from a point of high concentration into a material containing the substance at low concentration. After the substance has been allowed to diffuse for a period of time, a concentration gradient may develop extending away from the point source. The fluid may be sampled at various distances from the point source and progressively lower concentrations will generally be detected as the distance from the point source increases. Unfortunately, because materials in solution continue to diffuse to areas of lesser concentration, the concentration of the substance at any one point changes with time, as does the gradient between any two points. It is therefore difficult to proceed with experiments or processes that require a stable gradient. This problem is compounded when steep gradients are required, as steep gradients generally may decay faster than those that are less sloped.

Gradients on surfaces have been produced by methods using self-assembled monolayers (SAMs) including cross-diffusion, photo-immobilization and

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 3 -

biochemical gradient disposed on the portion of the surface and a third chemical or biochemical gradient disposed on a portion of the surface, wherein each of the gradients is different.

In another aspect, the invention provides for a method of treating a surface comprising passing a fluid along a portion of a surface under conditions of substantially laminar flow wherein the fluid comprises a concentration gradient of at least one substance, the concentration gradient being substantially perpendicular to the direction of flow and substantially continuous across a fluid, and treating differentially a plurality of sections of the portion of the surface exposed to different concentrations of the substance.

In another aspect, the invention provides for a method of diluting a fluid comprising feeding a high concentration fluid to a first inlet, feeding a low concentration fluid to a second inlet, passing the fluid from the first inlet and the fluid from the second inlet into a first generation channel, splitting the fluid in the common channel into at least three second generation channels, recombining the fluids from the at least three second generation channels into a second generation common channel, splitting the fluid in the second generation common channel into a plurality of third generation channels, and collecting fluid from at least one of the plurality of third generation channels.

In another aspect, the invention provides for a method of producing a fluid exhibiting two different concentration gradient profiles comprising combining at least a first starting fluid with a second starting fluid to form a combined stream, the first starting fluid comprising a first substance that is substantially absent from the second fluid, dividing the combined stream into a series of second stage streams, and joining at least two of the second stage streams to form a composite stream wherein the composite stream exhibits a different concentration gradient profile for the first substance and a second substance.

In another aspect, the invention provides for a method of producing a series of solutions comprising contacting a concentrated solution of a substance and a less concentrated solution of a substance to form a combined fluid and separating the combined fluid, without using a membrane, into a plurality of separate streams wherein at least one of the separate streams comprises a substance at a concentration that is

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 4 -

substantially different than the concentration of the substance in another of the separate streams.

Other advantages, novel features, and objects of the invention will become apparent from the following detailed description of the invention when considered in conjunction with the accompanying drawings, which are schematic and which are not intended to be drawn to scale. In the figures, each identical or nearly identical component that is illustrated in various figures is represented by a single numeral. For purposes of clarity, not every component is labeled in every figure, nor is every component of each embodiment of the invention shown where illustration is not necessary to allow those of ordinary skill in the art to understand the invention.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- FIG. 1 illustrates schematically a fluidic network including three inlets, nine outlets and a series of serpentine channels.
- FIG. 2a illustrates schematically how flow is distributed at a branching point of the fluid network of FIG. 1.
- FIG. 2b illustrates schematically how flow is distributed in another embodiment.
- FIG. 2c illustrates schematically how flow is distributed in yet another embodiment.
- FIG. 3 illustrates schematically how total flow is distributed in a symmetrical fluidic network having two inlets and one additional vertical channel in each successive generation.
- FIG. 4 provides a representational view of a fluidic network illustrating that the network may be modeled by using electrical resistance to represent resistance to fluid flow.
- FIG. 5 illustrates a top view of a gradient generator.
- FIG. 6 illustrates a cutaway side view of the gradient generator of FIG. 5.
- FIG. 7 illustrates graphically a theoretical concentration gradient.
- FIG. 8 illustrates graphically two superimposed concentration gradients.
- FIGS. 9a, 9a, and 9c illustrate graphically, and with black and white photocopies of fluorescent micrographs, a fluorescent concentration gradient in a composite fluid stream.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 5 -

FIGS. 10a, 10b, and 10c illustrate, with black and white photocopies of fluorescent micrographs, 3 different concentration gradients generated under different conditions with the same device.

5 FIGS. 11a, 11b, and 11c illustrate graphically, and with black and white photocopies of fluorescent micrographs, periodic concentration gradients generated by combining the output of three fluid networks, each network having 2 inlets and 8 outlets.

FIGS. 12a and 12b illustrate graphically, and with black and white photocopies of fluorescent micrographs, periodic concentration gradients generated by combining the output of three fluid networks, each network having 3 inlets and 8 outlets.

10 FIGS. 13a, 13b, and 13c illustrate graphically, and with black and white photocopies of fluorescent micrographs, single component concentration gradients generated by individual fluid networks having 3 inlets and 9 outlets.

FIGS. 14a, 14b, and 14c illustrate schematically, graphically, and via a black and white photocopy of an optical micrograph, the topological results of distributing an etchant across a network and surface of SiO₂.

15 FIG. 15 illustrates via a black and white photocopy of a fluorescent micrograph, a composite gradient formed from combining two chemical gradients, each of the gradients generated by a network having 2 inlets and 9 outlets, and two different fluorescent solutions being supplied to different inlets of each network.

20 FIG. 16 illustrates via a black and white photocopy of an optical micrograph the diffusional mixing that occurs in a network having 3 inlets, 6 generations and 9 outlets when two different solutions are passed through the left and right inlets and a combined solution is passed through the central inlet.

25 FIG. 17 illustrates graphically and via black and white photocopies of optical micrographs the blurring that occurs due to diffusional mixing at various points along a flow path of a composite gradient that has been formed from fluids containing FITC.

30 FIG. 18 illustrates schematically a three inlet, five outlet, microfluidic network and illustrates the blurring that occurs between adjacent fluid streams in laminar flow and provides a point (A) where individual streams may be sampled prior to forming a composite stream.

DETAILED DESCRIPTION

The present invention provides an apparatus and method for combining and distributing fluids. It may be useful for producing a gradient, particularly in a fluid or on a surface. The method of the invention provides for producing gradients of many types, including concentration gradients, topological gradients and shear gradients. The invention may be particularly useful for producing gradients on a small scale, e.g., gradients covering a span of less than about 10 cm. The method and apparatus provide for linear as well as higher order gradient profiles and these gradients may prove useful in fields such as pharmacology, biology, combinatorial chemistry, proteomics and chip production. The method may be able to provide two or more gradients simultaneously, with each gradient exhibiting the same or a different function. In addition, the invention also provides for the generation of gradients of complex shapes which may be maintained over a period of time.

The present invention provides for gradients exhibiting a variety of profiles, for example, any gradient that may be modeled by a polynomial equation. Traditional point source or line source gradient production techniques may only be capable of providing bell-shaped gradients, and the gradients may decay over a short period of time. By utilizing laminar flow streams and by mixing the contents of the streams through diffusion between the flow streams, the present invention may provide gradients that are more stable.

Laminar flow occurs when two or more streams having a certain characteristic (low Reynolds number) are joined into a single stream, also with low Reynolds number, and are made to flow parallel to each other without turbulent mixing. The flow of liquids in capillaries often is laminar. For a discussion of laminar flow and Reynolds number, see Kovacs, G.T.A., *Micromachined Transducers Sourcebook* (WCB/McGraw-Hill, Boston, 1998); Brody, J.P., Yager, P., Goldstein, R.E. and Austin, R.H., *Biotechnology at Low Reynolds Numbers*, *Biophys. J.*, 71, 3430-3441 (1996); Vogel, S., *Life in Moving Fluids* (Princeton University, Princeton, 1994); and Weigl, B.H. and Yager, P., *Microfluidic Diffusion-based Separation and Detection*, *Science* 283, 346-347 (1999).

Gradients of the present invention are useful in studying biological phenomena that depend on gradient concentration, such as cell-surface interactions, high-throughput screening using arrays of cells, and in cell-based biosensors. In particular, studies

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 7 -

involving chemotaxis, haptotaxis and migration take advantage of the relatively compact and stable gradients achievable by the present invention. As chemotactic cells may be sensitive to concentration differences as small as 2% between the front and back of the cell, gradients with a resolution on the order of a single cell (10-100 μm , 2-20% per 100 μm) can be useful. The invention provides the ability to generate gradients of proteins, surface properties, and fluid streams containing growth factors, toxins, enzymes, drugs, and other types of biologically relevant molecules. In addition, gradients of diffusible substances having chemoattractant or chemorepellent properties can play an important role in biological pattern formation, and angiogenesis and axon pathfinding provide examples of processes that can make use of gradients. The invention also provides the superimposition of gradients (similar or dissimilar) of different substances in studying higher organisms. The sawtooth gradients of the present invention can also be used in investigating biological processes.

In one aspect of the invention, two or more fluids, such as gases or liquids, may be joined, mixed and split using a microfluidic network. The microfluidic network may selectively mix and redistribute the fluids to produce a concentration gradient that can be represented by a polynomial equation. The resulting concentration gradient may then be used, for example, to deliver chemicals or biochemicals, treat a surface, or to deposit chemicals or biochemicals on a surface to produce a stationary gradient. It may be preferred that any mixing occur through diffusion rather than through turbulent flow, and the fluidic network may be configured to limit fluid flow to laminar flow at the velocities that are to be applied. By avoiding variations inherent with turbulent mixing, it may be possible to accurately model the mixing that occurs throughout the network and thus possible to predict the profile of the resulting gradient. Furthermore, diffusion of substances between adjacent laminar streams of small size can be accurately predicted, thus providing a technique for designing gradient generators to produce specific spatial gradients. Such predictability may be particularly useful when interfaced with design programs, such as CAD systems, to produce sophisticated gradient generators.

In one aspect, a microfluidic network having inlets and outlets connected by a series of stages, or generations, may be used. Each generation may include a number of fluidic channels and the fluidic channels in one stage may communicate with the fluidic channels of a subsequent stage by way of a common channel that receives fluid from the

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 8 -

channels of one stage and delivers fluid to the channels of a subsequent stage. The common channel may be any area in the network where at least a portion of two distinct fluid streams may come into contact with each other. The common channel may be any size or shape and may be, for example, a distinct channel that is substantially perpendicular to the channels of any adjoining generations, as shown in FIGS. 1 and 2a. In another embodiment, the common channel may simply be an area at the junction of two generations where a portion of one fluid stream may contact a portion of a different fluid stream, as shown in FIGS. 2b and 2c. A design similar to that shown in FIG. 2b may be preferred when the network is to be formed entirely in one large channel, with a series of internal walls separating the various streams.

Subsequent generations may contain a greater number of fluidic channels than previous generations. Such a configuration results in a pyramidal, or "Christmas tree" design, where fluid flow may start at the top of the pyramid and continue down the pyramid, cascading through a series of generations, each generation including a greater number of fluidic channels than a previous generation.

The individual fluidic channels of a final generation of a network may be joined so that a composite stream is formed with fluid from each individual channel flowing lamina in the composite stream. The individual streams may be in a plane so that, at most, each stream is in contact with two other streams. Alternatively, the composite stream may also include streams that run above or below other streams in the channel, thus providing a three dimensional configuration wherein a given stream may be in contact with a number of adjacent streams.

In one aspect, the network may be of any design and size that serves to adequately join, split and, in some cases, recombine the split flows into a composite flow. The geometry of the network may be tailored to produce a specific gradient or class of gradients. The network may function by taking two or more fluids, for instance, pure water and a salt solution, and combining the solutions, splitting the solutions and rejoining the solutions to form a composite fluid. When two solutions containing different concentrations of a substance come into contact with each other, the substance will diffuse from the solution of greater concentration into the solution of lesser concentration. For example, salt from a salt solution will be transferred from the salt solution to an adjacent solution containing only water. Thus, two fluid streams in

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 9 -

contact with each other may exchange materials back and forth depending on the relative concentrations of the materials in each of the fluid streams. This is clearly a different mixing technique from turbulent mixing where two fluid streams are combined to form a single, homogeneous stream.

5 By starting with two or more solutions, at least two of which may contain a substance at different concentrations, the network of the present invention may produce a variety of new fluids, each containing the substance at a different concentration. Each concentration may be predictable due to the structure of the network and the conditions under which it is operated. For example, two separate fluids may be injected into a
10 network through two inlets and the two fluids may contact each other in a common channel. If the contact is made under conditions of laminar flow, if there is little or no turbulence, any mixing that occurs between the two may be primarily through diffusion. Thus, if contact time in the common channel is minimized, little or no transfer will occur between the contacting streams and each stream may retain its unique identity and
15 composition.

Furthermore, if fluid from each of the inlets joins a common channel at a "T" intersection, a portion of the solution entering the "T" intersection will pass to the left and a portion of the solution will pass to the right. The component of each of the inlet fluids that passes in each direction at the "T" may be a function of the resistance to flow
20 that the fluid is subjected to in each of the directions passing downstream. Once in the common channel, a portion of the fluid flow originating from one input stream may be contacted with a portion of fluid flow from another input stream resulting in a combined flow of two adjacent laminar streams. If the common channel subsequently leads to another series of new, independent channels, the two starting fluids (the proportion of
25 each depending on the specific location in the common channel) may be fed from the common channel into the new independent channels (at another "T" intersection) according to the relative fluid resistance exhibited by each of the new independent fluid channels. Thus, a network may be arranged so that 1/3 of the fluid flow from a first input passes into a first individual channel and 2/3 of the fluid flow passes to a second
30 individual channel. Fluid passing into the first individual channel may be joined by additional fluid that originated from a different inlet. This may form a combined fluid in the individual channel that is made up of, for example, 50% fluid from the first input

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 10 -

stream and 50% fluid from the second input stream. If the combined fluid, consisting of two adjacent streams in laminar flow, is given adequate time to diffusively mix in the independent channel, the exiting fluid may represent a homogeneous solution that contains, for example, substances at a concentration that is an average of the original concentration in each of the input streams.

5 A network may include any number of inlets, a number of connected generations with one or more channels in each generation, and one or more outlets. In general, if a greater number of inlets are employed, a greater complexity of resulting concentrations or concentration gradients may be produced. In one embodiment, it has been empirically
10 determined that the gradient profiles produced may be modeled by a $(n-1)^{\text{th}}$ order polynomial where n is the number of inlets feeding the fluid network. For example, if a gradient of the third power is desired, it may be preferable to use a gradient generator that employs four inlets. A linear gradient (which may be considered a first order
15 polynomial), for example, may be achievable with two inlets. As the apparatus of the invention may provide for splitting, combining and recombining fluid streams, a binomial distribution may be obtained, for example, when the splitting ratios at the nodes of the network are 1:1 throughout the network. If splitting ratios are other than 1:1, a polynomial distribution may result. In general, a greater amount of fluid may be
20 channeled to the outer portions of the network when the distance from the splitting nodes to the network's axis of symmetry is greater and when the branched system is of a higher order, containing a greater number of generations.

In one aspect, periodic gradients (gradients exhibiting a repeating profile) may be produced by combining together the output from two or more pyramidal fluidic
networks. Each of the networks may share inlets and may operate in parallel, with the
25 output of each network being joined with the output of another network or networks. Alternatively, a periodic gradient may be generated by a single network with a greater number of inlets.

In one aspect of the invention, two or more fluids containing different concentrations of a substance, such as a solute, may be combined, mixed and split to
30 produce a wide variety of gradient types. This may be performed by using an apparatus such as that illustrated in Fig. 1. Fig. 1 provides a schematic representation of a system that includes three inlets, 1, 2, and 3, and a series of serpentine vertical channels, such as

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 11 -

4 and 5. Serpentine channels are channels that take an indirect route, for instance, by making multiple turns back and forth of greater than 90°. Thus, serpentine channels may be useful to fit a relatively long flow path into a small area, such as in a microfluidic network. The serpentine channels may be joined by horizontal common channels such as 6 and 7. A row of serpentine channels may be contained in a set referred to as a generation, for example, 8 or 9. The microfluidic network may include any number of inlets, common channels, vertical channels and generations. A generation may include at least two channels, preferably serpentine, generally operating in parallel. Each generation may be any shape, such as the pyramidal design shown in Fig. 1. The microfluidic network also has a number of branching points, 10, at locations where vertical channels intersect common channels. The network may also include a composite channel, 11, which may be connected to each of the vertical channels contained in the final generation. The channels used in the microfluidic network may be of any size and are preferably less than one millimeter in diameter, and most preferably are less than about 100 microns in diameter and most preferably less than 50 microns in diameter. The height of the channel may be equal or different from the width and is preferably less than about 100 microns high.

In operation, fluids containing substances at different concentrations may be introduced into any number of inlets. A pump, for example, a syringe pump, may be used to provide fluid at an adequate flux, pressure and velocity. The flux at each of the inlets may be varied to produce different types of gradients, and, for simplicity, the use of the network in Fig. 1 will be described using three different fluids being introduced at the same pressure and velocities. Fluid entering through inlets 1, 2 or 3 is distributed in common channel 6 and is fed to the serpentine channels in the first generation, for example serpentine channel 4. The serpentine channels in this embodiment are of approximately the same shape and length and therefore exhibit the same resistance to flow. As equal volumes of fluid are being introduced through each of the three inlets and the total volume of fluid is then distributed through four individual serpentine channels, the flow through each of the serpentine channels will be equivalent to $\frac{1}{4}$ of the flow that is being received from each of the inlets. Likewise, as the fluid advances to the next generation and passes into a set of five serpentine channels in stage 2, the flow in each of the serpentine channels in stage 2 will be $\frac{1}{5}$ of the flow through each of the serpentine

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 12 -

channels in stage 1, assuming that each of the serpentine channels in stage 2 is of equivalent resistance to flow.

It may be advantageous to predict the output of a microfluidic network so that a network may be fabricated in order to form a specific gradient or gradients. The output of any network can be more easily predicted if the splitting ratio at each branching point within the network can be accurately modeled. If a pyramidal microfluidic network is used, one way of predicting the output of the network is by using the procedure below.

Referring to Fig. 1, a generation, for example 8 or 9, may contain "n" vertical channels and may thus be referred to as an n^{th} ordered branched system ($B=n$). Each vertical channel within a generation or branch system may be designated as $V=0, V=1, V=2 \dots V=B-1$. The various flow paths that fluids within the system may take may be dependant, in part, on the resistance of the various channels throughout the system.

If the microfluidic network is produced as illustrated in Fig. 1, vertical channels such as 4 and 5 may provide significantly greater resistance to flow than do horizontal flow channels such as 6 and 7. Accurate flow predictions for such a network may be made by assuming that the resistance in the horizontal channels is negligible when compared to the resistance in the vertical channels. Resistance within a channel may be controlled by a variety of factors, for example, the geometry of the channel including length, width and shape, the structure of the walls of the channel, and the possible inclusion of valves or other constrictions within one or more channels. For equally dimensioned channels, resistance to flow scales linearly with the length of the channel, in Poiseuille flow, and thus if the horizontal channels are much shorter than the vertical channels, for example, 1/20th of the length, the resistance to flow in the horizontal channels will be approximately 1/20th of that of the vertical channels. In a simple case, illustrated in Fig. 1, the resistance in each vertical channel is approximately the same, thus simplifying the calculations required to determine the flow. The total volume passing through each vertical channel within a generation is equal and to further simplify the analysis, the entire flow from each preceding generation passes into the subsequent generation without further addition or subtraction of flow volume. In a network that is symmetrical left to right as is the network illustrated in Fig. 1, the splitting ratio at each branching point may be approximated by the following ratios. At a branch point where the flow from a vertical channel enters a horizontal channel, the flow to the left may be

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 13 -

approximated as $[B-V]/[B+1]$ and the flow to the right of the branch point may be defined as $[V+1]/[B+1]$. The splitting ratios are illustrated in Fig. 2a which shows the contribution to two of several vertical channels in a subsequent generation that are made by three vertical channels in a preceding generation. In Fig. 2a, C_p , C_q and C_r each represent the flow passing through three adjacent vertical channels 50, 51 and 52 in a generation. Thus the flow component passing to the right from C_p is defined as $\frac{V_p+1}{B}$. Likewise the flow component of C_q that passes to the right at the central branching point is defined as $\frac{V_q+1}{B}$. The flow component passing to the left from the flow represented by C_q is equal to $\frac{B-V_q}{B}$ and the flow component passing to the left from flow C_r may be defined as $\frac{B-V_r}{B}$. In this embodiment, the flow entering into vertical channel 60 may be defined as the sum of the flow component of C_p that passes to the right and the flow component of C_q that passes to the left. Likewise, the flow contributed to vertical channel 61 may be defined as the sum of the flow component of C_q that passes to the right and the flow component of C_r that passes to the left.

Fig. 3 provides a schematic illustration of a two inlet system and provides the actual breakdown of the flow in each of the horizontal and vertical channels in a special case where each of the two inlets provides equal flow to the first stage, each of the vertical channels is of equivalent resistance, and each successive generation includes one more vertical channel than does the preceding generation. The total flow through each stage, or generation, may be represented by the fractions shown in Fig. 3.

As the fluid flow from inlet stage 100 advances to first generation 101, the flow that was originally divided into half in the two inlets is divided into thirds equally (each vertical channel is equally flow resistant) between the three vertical channels at the first generation 101. Thus each vertical channel in the first generation 101 carries 1/3 of the total flow. As each channel in the first generation 101 carries less flow than either of the two inlets at stage 100, the entire flow to exterior channel 80 is supplied by fluid emanating from vertical channel 70 and the entire flow to exterior vertical channel 81 is supplied by vertical channel 71. Therefore, 2/3 of the flow delivered by vertical channel 70 is received exclusively by vertical channel 80 and 1/3 of the flow received from

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 14 -

vertical channel 70 (1/6 of the total flow) passes from vertical channel 70 to vertical channel 82. The flow in vertical channel 82 is supplied equally in two parts by the flow from vertical channel 70 and 71 therefore 1/3 of the total flow of vertical channel 71 is received into vertical channel 82. Thus, after complete mixing, vertical channel 82 contains 50% of the fluid passing through vertical channel 70 and 50% of the fluid passing through vertical channel 71. As the entire flow to vertical channel 81 (1/3 of the total flow) is obtained from flow emanating from vertical channel 71, the fluid passing through vertical channel 81 is exclusively that which has passed through vertical channel 71 in the previous stage. Likewise, all of the fluid supplied to vertical channel 80 (1/3 of the total flow) is supplied exclusively from vertical channel 70. Thus, each of the exterior vertical channels 80 and 81 contain fluid of composition equal to that found in vertical channels 70 and 71, respectively, and central vertical channel 82 contains a 50/50 mixture (v/v) of the two fluids supplied by vertical channel 70 and 71. As fluid passes into the succeeding generation, flowing from generation 101 to 102, additional splitting occurs in the centrally located vertical channels of generation 102 but the exterior channels 90 and 91 again contain fluid that has been exclusively supplied by either channel 70 or 71. In this manner, multiple stages may be added to the microfluidic network, and if the number of vertical channels in each successive stage increases by one or more, the outer channels may each contain fluid that has been exclusively derived from one of the first two inlets. In this manner, an entire spectrum of concentrations may be developed including endpoints that are equivalent in composition to the two starting fluids.

The flow to any microfluidic network such as that shown in Fig. 1 may be accurately modeled by analogizing the flow of liquid through the network with the flow of electricity through an electronic circuit. Fig. 4 illustrates how each vertical and horizontal channel may be represented by an appropriate resistor that reflects the relative resistance to flow through each of the channels. As a result, techniques used to design electrical circuits may also be helpful in designing fluid networks of the present invention. For example, software applicable to the design of electrical circuits may be used to design fluid networks of the present invention.

The geometry of the various components of a fluid network may vary greatly depending upon, among other things, the anticipated capacity of the fluidic network.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 15 -

- Preferably, channels within a stage are of a length adequate to provide greater than 90% mixing of two or more fluids that enter the channel and most preferably are capable of providing greater than 99% mixing of fluids prior to the fluids leaving a given channel. As diffusive mixing is a function of time, the residence time of adjacent fluid streams
- 5 may be important in sizing the components of a network. Residence time within a given channel is a function of, among other variables, fluid velocity, and channel dimensions may be preferably determined after the flow rates anticipated for a particular application have been determined. Flow rates of from 1 to 100 mm/s have been found to provide good results.
- 10 In one embodiment, fluid mixing channels are about a centimeter long and in another embodiment are approximately one millimeter in length. Fluid channels as long as 10 centimeters, or longer, may be applicable for networks utilizing large fluid volumes or, for example, when particularly fast rates of fluid flow are preferred. The diameter of fluid channels may also vary and preferably is less than about 1 millimeter in diameter.
- 15 Most preferably the fluid channels are about 100 microns in diameter and in another embodiment may be smaller than 50 microns and even as small as 10 microns in diameter. As smaller diameter channels may provide for laminar flow at high flow velocities, much smaller diameter channels may be desired and sizes may be limited only by what production techniques are capable of producing. The geometry of the fluid
- 20 network may be optimized for specific applications and it may be preferable that vertical channels within the network are serpentine or convoluted so that channels of relatively long length may be contained within a small area. In addition, fluid channels may loop back on themselves at different levels in order to minimize the total area occupied by the fluidic network.
- 25 The fluid channels, in cross section, may be of any shape suitable for carrying a fluid. For example, the fluid channels, in cross-section, may be circular, square, oval or rectangular. Channel walls may be coated with, or made of, hydrophilic (for water-based applications) or lipophilic (for water insoluble applications) material to minimize boundary effects.
- 30 The number of stages, or generations, within a fluidic network is limited only by the size of the substrate on which the fluidic network is disposed. The greater the number of generations, the more refined may be the resultant gradient profile. Networks

including 3, 9, 10, 20 or more than 50 generations may be used to produce progressively finer gradients.

The fluidic networks of the present invention may be made in a number of ways, including molding and machining. In addition, a network may be quickly produced by joining a series of tubes or micro-tubes together to arrive at the desired configuration. In addition, fluidic networks may be produced in a modular fashion, with different pre-made pieces being joined together to build a network.

In one aspect of the invention, a microfluidic network may be fabricated in poly(dimethylsiloxane) (PDMS) using rapid prototyping and soft lithography. For example, a high resolution laser printer may be used to generate a mask from a CAD file that represents the channels that make up the fluidic network. The mask may be a transparency that may be contacted with a photoresist, for example, SU-8 photoresist (MicroChem), to produce a negative master of the photoresist on a silicon wafer. A positive replica of PDMS may be made by molding the PDMS against the master, a technique known to those skilled in the art. To complete the fluidic network, a flat substrate, for example, a glass slide or silicon wafer, may be placed against the PDMS surface and may be held in place by van der Waals forces, or may be fixed to the PDMS using an adhesive. To allow for the introduction and receiving of fluids to and from the network, holes (for example 1 millimeter in diameter) may be formed in the PDMS by using an appropriately sized needle. To allow the fluidic network to communicate with a fluid source, tubing, for example of polyethylene, may be sealed in communication with the holes to form a fluidic connection. To prevent leakage, the connection may be sealed with a sealant or adhesive such as epoxy glue.

Fig. 5 illustrates an embodiment of the apparatus of the present invention. A PDMS replica 210 including three inlets 220 and an outlet 230 is contacted with silicon wafer 200 to form a sealed fluidic network. Fig. 6 provides a cut-a-way side view of the embodiment of Fig. 5 showing inlet 220, outlet 230 and fluid network 240 connecting inlet 220 to outlet 230.

In another aspect, the present invention provides a concentration gradient exhibiting a variation in concentration of a substance in a fluid in relation to distance. The gradients may be formed in any fluid, including gases and liquids, and may represent the concentration of a substance that is, for example, dissolved or suspended in

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 17 -

a fluid. A concentration gradient may be represented by a profile that illustrates the concentration of a particular substance or condition at various positions within a fluid or on a surface. Figure 7 illustrates a concentration gradient profile showing how the concentration of a substance may vary with distance from a given point. In one aspect, a concentration gradient is produced in a direction perpendicular to the flow of a fluid. Such a concentration gradient may be stabilized to provide a constant or relatively constant concentration at any position across a fluid stream, for example, a specific gradient may be maintained in a fluid stream for a second, 10 seconds or a minute, or, alternatively, the concentration gradient may be dynamic so that it changes with time.

In one aspect, a concentration gradient may be formed by joining two or more fluid streams under laminar flow conditions. When two adjoining streams come together under laminar flow conditions, the primary mode of transfer of material between the two streams is through the mechanism of diffusion. Thus, as two streams are joined together, substances in a higher concentration stream will diffuse into the lower concentration stream at a rate that can be accurately predicted. For example, if two laminar flowing streams, one containing a substance at a high concentration and the other containing the same substance at a low concentration, are in fluid contact with each other, eventually the concentration of the substance in both of the adjacent streams will be equalized. However, by controlling parameters such as concentration, fluid velocity, temperature, and fluid stream size, a concentration gradient between the two adjacent streams may be maintained at a constant profile at any chosen point along the path of flow. Thus, a concentration gradient showing a very sharp, two-step profile may be realized immediately after the two fluid streams are in contact, and the concentration gradient profile may be gradually smoothed as the flow of the two adjacent streams progresses until the concentration gradient profile may reach a point where it is flattened and the concentration of the substance in both streams has been equalized. The time required for complete equilibration can be estimated by solving the diffusion equation in one dimension in finite media taking into account the initial distribution for a particular case. An analytical solution for this problem is given by (Eq 1)

$$C(t, x) = \frac{1}{2} C_0 \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left\{ \operatorname{erf} \frac{h + 2nl - x}{2\sqrt{Dt}} + \operatorname{erf} \frac{h - 2nl + x}{2\sqrt{Dt}} \right\} \quad (1)$$

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 18 -

where $C(t, x)$ is the concentration at time t and at point x , D is diffusion coefficient in cm^2/s , t the time in s, l the width of the channel, h the width of the initial distribution, and C_0 the initial concentration in the channel. A numerical evaluation using the first 21 terms in the sum ($n = -10$ to $+10$, $D = 5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$, width $50 \mu\text{m}$, width of initial distribution $25 \mu\text{m}$) shows that 97% diffusive mixing is reached after 1 s. We define percent mixing across a channel of width l and at time t as:

$$\%mixing(t) = \left(1 - \frac{\int_0^l |C(t) - C(\infty)| dx}{\int_0^l |C(0) - C(\infty)| dx} \right) \times 100\% \quad (2)$$

where $C(t)$, $C(\infty)$, and $C(0)$ are the concentration profiles across the width of the channel at times t , $t=\infty$, and $t=0$, respectively.

A desired profile may be chosen at any point in the spectrum at or between the point where no diffusion has occurred and the point where complete co-mixing has occurred. Moreover, this profile may be accurately and reliably replicated under these same conditions. Any number of fluid streams may be joined together, and when more precise concentration gradients are to be generated, it may be preferred that narrower fluid streams be used. In addition, narrower fluid streams may be less prone to turbulence, and thus the narrower streams may provide for a more stable, repeatable gradient.

Adjacent streams may be joined at a single location or may be staggered to join a composite stream at various points along the flow of the composite stream. In this manner, new substances or higher or lower concentrations of original substances may be introduced to a composite stream after an initial amount of diffusion within the composite stream has already occurred. The adjacent fluid streams need not be equal in

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 19 -

size to the other streams that make up the composite stream. Narrower streams are preferred over thicker ones as a smoother gradient will generally be obtained. In addition, a narrower stream may be less turbulent (fluid flow is considered to be turbulent at a Reynolds number of about 2,000 or greater) than is a fluid stream of equal velocity that has a greater cross-sectional area. It is preferred that turbulent mixing be minimized to reduce any variation that may occur in a concentration gradient. Thus, a fluid stream having a width of 100 microns may be preferred over a fluid stream having a width of 1 mm which, in turn, may be preferred over a fluid stream having a width of 1 cm.

By limiting the mixing mechanism to predominantly diffusion, it may be possible (see Equation 2) to maintain a relatively stable concentration gradient in a direction perpendicular to the flow of a composite stream. Thus, although diffusion between adjacent streams may not be stopped, the dynamic flow of adjacent streams may provide for a constant gradient at any specific point along the path of flow. Of course, if desired, the concentration gradient may be altered over time at any specific point by changing any number of parameters, for example, stream concentrations, stream flow rates and the composition of each individual stream.

In one aspect, more than one concentration gradient may be formed in a single composite stream. For example, Figure 8 provides a hypothetical concentration gradient profile for two different substances at the same location along a composite stream. Profiles 300 and 310 represent two different concentration gradients for the two different substances. Profile 300 illustrates a concentration gradient wherein the concentration of the substance is most concentrated near the middle of the stream and decreases towards either edge. Profile 310 illustrates a concentration gradient where the concentration at one edge is zero and increases to a high concentration at the opposite edge with the rate of increase being initially quite high and leveling off as distance from the first edge increases.

In another aspect, concentration gradients in a fluid or on a surface may be varied by adjusting the flow speed of the composite stream. For example, a gradient may be dynamically altered by combining two or more streams in laminar flow, allowing at least some diffusion to occur from one of the individual streams into an adjacent stream, and then adjusting the flow rate of the composite stream to alter the position along the stream

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 20 -

where a particular concentration gradient is realized. Fig. 9 provides three different micrographs of an identical fluid stream flowing at three different velocities. The micrographs were taken of a composite stream composed of nine individual streams that were combined into a composite stream. The position where the micrographs were taken is equivalent to position 11 as shown in Fig. 1 of the gradient generator described above. The white dotted lines at the top of each of the three fluorescent micrographs represent the terminus of each of the individual channels, indicating where the nine different individual branches merged to form the composite stream. In the embodiment illustrated in Fig. 9, each of the nine branch channels was approximately 50 microns wide and 100 microns high, and the branches were combined to form a composite stream in a channel that was 900 microns wide and 100 microns high. (Original color micrographs can be viewed in Noo Li Jeon, Stephan K. W. Dertinger, Daniel T. Chiu, Insung S. Choi, Abraham D. Stroock, and George M. Whitesides, *Langmuir* 2000, 16, 8311-8316.) A solution containing various concentrations of fluorescein isothiocyanate (FITC) was passed through each of the nine different channels. Areas of higher concentration appeared as brighter, greener areas in the fluorescent micrographs (lighter, more centrally located, areas in the black and white photocopy provided). The rate of flow in the outlet channel was varied from .1 mm/s per second to 1.0 mm/s per second to 10.0 mm/s per second in each of Figs. 9a, b and c, respectively. The nine individual streams were produced from the gradient generator shown in Fig. 1 by introducing a 5% solution of FITC in water, by weight, into inlet number 2 and introducing pure water into both inlets 1 and 3. The horizontal white dotted line near the bottom of each of the micrographs corresponds to a point that was 500 microns downstream from the junction of the nine independent streams. The fluorescence intensity of the solution was normalized with respect to the starting solution and was expressed in terms of concentration.

The graphs shown below each of the micrographs in Fig. 9 provide the fluorescent intensity across the channel at a point that is 500 microns downstream from the junction point (horizontal white dotted line). The black dots in each of the graphs represent the concentration that was calculated to be in each branch channel if complete mixing in each of the branch channels had occurred. These values were obtained by

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 21 -

using the initial concentration of FITC in the flow and using the splitting ratios, obtained as described above.

Looking to Figs. 9a and 9b, the maximum concentration of FITC is found at the center of the composite channel and shows 57% FITC in that region. The outer regions of the same channel indicate 0% FITC or, essentially pure water, as was provided at inlets 1 and 3 (see Fig. 1). As in the other figures provided, both observed fluorescence (black line) and calculated fluorescence (black dots) are illustrated in the graphs. Both Figs. 9a and 9b exhibit a fluorescence that indicates a concentration that agrees well with the calculated values, and thus indicates that complete mixing of the streams in each of the individual channels has occurred. In Fig. 9a, considerable diffusion has occurred within 500 microns of the point where the nine separate streams were joined. This diffusion is evident in that the borders between each of the nine individual laminar flowing streams have been blurred.

Fig. 9b, however, (a flow rate of 1.0 mm/s per second) shows much less blurring and provides a step-wise gradient as opposed to the smooth gradient of Fig. 9a. Thus, at a flow of 1.0 mm/s per second (FIG. 9a), complete mixing (greater than 99%) has apparently occurred in each individual mixing channel of the gradient generator, however, at this flow rate 500 microns does not provide enough length, or residence time, for enough diffusion to occur to smooth out the stepwise gradient that is seen in the graph of Fig. 9a.

Fig. 9c, however, shows results of the same experiment at a speed of 10.0 mm/s. This micrograph shows that not only has incomplete diffusion occurred in the composite channel, but incomplete diffusion has occurred in at least some of the mixing channels of the gradient generator. Thus, at this relatively faster flow rate, the length of the serpentine channels in the various branches of the gradient generator was not adequate to provide complete mixing of these solutions.

Fig. 10 illustrates an embodiment in which the invention may be used to dynamically vary a gradient. For example, a dynamic gradient may be produced by independently adjusting the flow rate of one or more of the inputs of a fluidic network. If the flow through one of the inputs is either increased or decreased, the change in input flux may dynamically alter the resulting gradient by either increasing or decreasing the effect of the individual input upon the shape of the resulting gradient. As in Fig. 9, the

micrographs in Fig. 10 were obtained from a composite stream formed from individual streams of solutions of FITC and water passing through a microfluidic network. As in Fig. 9, three inlets were used, the left inlet carrying pure water, the central inlet carrying a 5% (w/w) FITC solution and the right inlet carrying pure water. The network used to produce the output shown in Fig. 10 had a total of fifteen (15) branch channels rather than the nine (9) branch channels that were used in the device of Fig. 9. Each of the channels was approximately 50 microns wide and 100 microns high.

In Fig. 10b, each of the three (3) inlets provided flow to the network at a constant rate of 1 mm/s. A well defined, continuous gradient is evident in Fig. 10b and resembles that shown in Fig. 9a as the area of highest concentration is in the central portion, and areas of lower concentration are evident on either side.

Fig. 10a shows a micrograph taken of a gradient of FITC that is formed when the flow in the left inlet is reduced to 0 and the flow in the middle and right hand inlets are both maintained at 1 millimeter per second. As a result, a shift to the left of the fluorescent FITC solution is clearly evident indicating that the gradient may be altered by adjusting the flow of one of the inlets.

Fig. 10c shows a micrograph illustrating the results when the flow rate in the left inlet has been increased to 3 mm/s while the flow in the middle and right hand inlets were maintained at 1 mm/s. The result in shift in the maximum fluorescence to the right side of the gradient is clearly evident and is likely the result of the increased flow from the left inlet. Thus by altering the flow of just one of the inlets, the gradient may be shifted left or right. By altering the flow of more than one of the inlets, a variety of gradient profiles may be obtained.

Fig. 10 also illustrates how a gradient profile may be compressed or expanded by altering the geometry of the channel through which the gradient flows. In each of Figs. 10a, b and c (and in the other figures provided) the direction of flow is from the top to the bottom. A cross-sectional dimension of 750 microns was reduced by 50% down to 375 microns by changing the width of the outlet channel. Thus, each individual stream first contributes about 50 microns of width to the gradient and after the constriction to 50% of the original width, each individual stream contributes about 25 microns to the width. Thus, a more compact gradient may be obtained by constricting the flow of the composite stream. As total flux remains constant, the velocity must necessarily increase

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 23 -

when the flow is constricted. Likewise, the channel may be expanded to result in a broadening of the gradient and multiple constrictions and expansions may be used in any given channel. In addition, by combining these constriction and expansion options with three dimensional microfluidic networks, an additional level of control is provided to allow the user to create a greater variety of gradients.

Each of the gradients shown in Figs. 11a, b and c were obtained by combining the output of three microfluidic networks each of the networks having two inlets and eight outlets. The percentages at the top of each of figures 11a, b and c indicate the concentration of FITC in each solution that is being supplied to each inlet for each individual network. 100% represents a 5% solution of FITC in water. Point L_1 in each of Figs. 11a, b and c is a point in the channel immediately following the point where individual streams are joined to form a composite stream. L_2 represents a point 800 microns downstream from L_1 . In each of the figures, at L_1 the individual steps in the concentration profile can be observed directly from the micrograph and are also evident in the graphs at the bottom of each of the figures. This resulting step-wise gradient occurs when little or no diffusive mixing has occurred across the boundaries between adjacent individual streams. In contrast, at L_2 (800 microns downstream at a flow rate of 514 microns per second, 1.56 seconds after joining) a significant amount of diffusion has occurred, thus smoothing the gradient profile. The steps are no longer evident either visually from the micrographs or graphically in the graphs shown below each micrograph. Using a value of $D=2.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2$ as a diffusive coefficient, (the diffusive coefficient of Rhodamin 6G which is structurally similar to FITC and with comparable molecular weight) it is predicted that the profile should have a periodicity of 90 microns and should decay after a time of about 1.5 seconds. This is confirmed empirically in the micrographs. Fig. 11a illustrates a saw tooth gradient where both the amplitude of the peak and the slope of each individual linear gradient decreases from left to right. In Fig. 11a, the periodic gradient was generated by passing pure water through 1 of the inlets in each of three networks and a solution containing 100%, 75% and 50% FITC in water and each of the respective networks passing from left to right. Fig. 11b illustrates a periodic gradient that may be obtained when solutions of 100% and 50%, 75% and 25%, and 50% and 0% are input into each of the three networks, respectively. Fig. 11c illustrates a periodic gradient that may be formed using both negatively and positively sloped linear

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 24 -

gradients. Such a gradient was obtained by inputting concentrations of 100% and 50%, 0% and 50%, and 100% and 50% in each of three networks, respectively. Each graph shows the concentration percent represented by each individual stream at various points across the channel width. The x axis provides the point from left to right at which each of the readings were taken within the channel. Positions are given in microns from the left side of the composite channel.

Fig. 12 illustrates experimental results achieved when three networks were combined to produce a gradient, each of the networks having three inlets. Using three inlets, a parabolic gradient profile (second order polynomial) may be constructed, and an example is illustrated in Fig. 12a showing how three (3) parabolic gradients may be joined together to form a unique composite gradient. Fig. 12b illustrates an example where two linear gradients have been combined with a parabolic gradient to generate a composite gradient consisting of both linear and second order profiles. In both Figs. 12a and 12b fluorescence expected and detected at the point of stream convergence (L_1) and at 800 microns downstream from point L_1 (L_2) is given. As in Fig. 11, a greater amount of diffusion has occurred at point L_2 , thus smoothing the stepwise gradient into a continuous gradient.

Fig. 13 illustrates some of the profiles that may be obtained from a microfluidic network having three (3) inputs and nine (9) outlets. Each of Figs. 13a, b and c were obtained by permuting the order at the inlets of three different solutions containing 100%, 50% and 0% fluorescein (normalized) in 100 mM NaHCO_3 buffer at pH 8.3. The solution input at each individual inlet is provided at the top of each of Figs. a, b and c. Each of the profiles generated can be described by a second order polynomial. The dark line in the bottom graph of each of the figures shows the calculated gradient profile. The gray lines and dots in each of the lower graphs illustrate the fluorescein contribution from each of the individual inlets. Fig. 13a illustrates the interesting case where a linear gradient is obtained by superimposing two second order gradients in the same fluid.

In another aspect, the invention may be used to shape the topography of a surface. The gradients provided by the invention may be used to shape a surface by either removing or adding material to the surface. For example, material may be deposited on a surface in proportion to the concentration of the material, or a related material, in a fluid that is passing over the surface. Alternatively, the fluid passing over

- 25 -

the surface may contain a substance that removes material from the surface and it may do so in proportion to the concentration of the substance in the fluid. Therefore, if a gradient can be generated in a fluid flowing across a surface, the topography of that surface may be altered in a way that matches, or mirrors, a concentration gradient in the fluid. Materials that may be used to augment a surface include, for example, metals, polymers, salts, ligands and biological materials. Materials that may be used to remove parts of a surface include, for example, acids, bases, etchants and biological materials.

Fig. 14 illustrates how a topological gradient may be formed by passing a solution of hydrofluoric acid over a silicon dioxide layer disposed on a silicon wafer.

Fig. 14a illustrates the microfluidic network that was used to distribute the HF solution. Fig. 14b provides an expanded view of a portion of the network shown in 14a showing a branch point where two separate streams were joined in a common channel and fed to an individual mixing channel in a subsequent generation. Each of the serpentine channels in the network is about 10 millimeters in length, providing an adequate residence time for the fluid in each of these channels to mix exclusively through the mechanism of diffusion. Each of the microfluidic channels in the network is about 50 μm wide and about 100 μm high. Proceeding from left to right, a solution containing water was injected into the first inlet, a 5% solution of HF and water was injected into the second inlet, and water was injected into the right inlet. The flow of each inlet stream was kept at 0.1 millimeters per second. HF solutions are known to etch SiO_2 and higher concentrations of HF will etch a greater amount of SiO_2 and do so more rapidly. The micrograph of Fig. 14b shows the different depths that were carved into the microfluidic network. The channel to the upper left in Fig. 14b revealed a distinct blue color (that appears as the darkest part of the channel in the photocopy) representing a thickness of about 310 nm of silicon dioxide on the silicon substrate. The upper right channel, revealed orange (that appears as a lighter area in the photocopy) indicating a silicon dioxide layer thickness of about 450 nm. When combined in the serpentine channel in the bottom half of Fig. 14b the channel was a light green color (lighter area in photocopy) indicating a depth of about 340 nm in the channel containing the combined fluid. Thus, the combination of the stronger and weaker solutions removed material at a rate in between the rate produced individually by the strong and weak solutions. Fig. 14c provides an expanded view illustrating visually the amount of material that was removed

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 26 -

from the surface at various locations in contact with nine outlet streams. The depth of each channel indicated in the underlying graph shows the results of a surface profilometer scan that was made across the nine individual channels immediately before the point where they were combined into a single composite channel. Thus, the thickness of the SiO₂ layer that can be inferred from the color (blue, orange, or green) of the etched channels agrees with the surface profilometer data. These results indicate that a microfluidic network may be predictively designed to produce a chosen topological gradient.

In another aspect, different shapes may be produced simultaneously to produce several gradients in a single combined stream. Fig. 15 illustrates how the output from two networks, each having two inlets and nine outlets, may be used to combine two sawtooth gradients. Each pair of the inlets for each of the networks was supplied with the same pair of solutions. The inlet on the left was supplied with an ethanol solution of 100% FITC (green) and the inlet on the right was provided with a solution containing 100% tetramethylrhodamine ethylester, TMRE (red), in ethanol. Thus, each of the contributing networks provides a linear gradient (green to red from left to right) of each of the fluorescent dyes, the gradient of one dye being the mirror image of the gradient of the other dye. These mirroring linear gradients may then be combined as shown in the Fig. 15 to provide an additional level of complexity to the gradients that may be obtained.

Fig. 16 provides a black and white photocopy of a color micrograph showing an expanded view of a microfluidic network of the present invention having three inlets and nine outlets, the nine outlets being joined to form a composite channel. Using syringe pumps, a green dye (FITC) was injected in the left inlet, a red dye (TMRE) was injected in the right inlet and a 1/1 mixture of both dyes was injected into the central inlet. Each solution was input at the same velocity and flux, representing a flow rate of 1.2 millimeters per second. It is apparent from the micrograph that as the streams of dye traveled down through the network, the streams were split at the nodes, combined with neighboring streams in various ratios and then allowed to mix in the serpentine channels by diffusion. All flow throughout the network was laminar. The outermost channel of each generation retained the vivid color of the fluids input to the left and right input channels (green on left, red on right) and thus the resulting gradient extended from a

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 27 -

solution including 100% FITC on the left to 100% TMRE on the right. After the nine individual outlets were joined to form a composite stream, diffusion blurred the stepwise gradient into a more continuous gradient as shown at the bottom of the Fig. 16. In the photocopy, the lighter area to the right of the composite stream was red, the medium density area to the left was green and the dark central portion was a combination of red and green.

Fig. 17a illustrates the blurring that may occur through the mechanism of diffusion along the concentration profile at three different positions downstream in a channel. Diffusional decay may be described by the diffusion equation in one dimension, $\delta c/\delta t = D(\delta^2 c/\delta x^2)$ where D is the diffusion co-efficient, c is the concentration of substance and x is the coordinate perpendicular to the direction of the fluid flow. If we assume a co-efficient of diffusion for fluorescein of $2.6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ and take into account the flow rate of the fluid through the channel, the concentration profile may be calculated using a Forward Time Centered Space (FTCS) differencing scheme. The theoretical calculations agree well with the experimentally observed profiles. The calculated results are provided in Fig. 17b. The rate of blurring within a profile depends, for example, on the shape of the gradient and in general, the greatest changes occur in areas where the curvature of the gradient is the largest. In the example shown in Fig. 17, this greatest blurring occurs at the junction between the linear and the parabolic parts of the profile. Less sharply shaped areas may retain profile shape for a greater period of time.

In another aspect, the invention may provide a method and apparatus for producing fluid streams of different shear values. For example, a fluid or group of fluids may be input into a microfluidic network such as that shown in Fig. 1, and different channels within the network may possess different resistances to flow. Therefore, the velocity of fluid passing through any one of the outlets will vary with the resistance encountered over that particular path of flow. In this manner, using valves or other constrictions to alter the resistance of channels within the network, fluid streams at different velocities, and therefore at different shear values, may be achieved from a single network with a single pump supplying the fluid.

In another aspect, the invention may be used to prepare, distribute or dilute fluid solutions. For example, referring to Fig. 18, three different solutions may be input into

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 28 -

the three inlets of the fluidic network and the five outlets may separately feed different receiving vessels. Using such a system, a concentrated solution may be pumped into one or more of the inlets and a dilute solution may be pumped into one or more of the other inlets. By choosing the proper network geometry and flux rates for each of the inlets, different and predictable solutions will be produced at each of the five outlets. Thus, any solution that could be made through the multiple steps of preparing a serial dilution may instead be made by simply combining two solutions containing the substance at different concentrations. In this manner, minimal quantities of the substance may be required, thus saving on expensive chemicals and reagents and reducing waste. In addition, each solution of a different concentration may be produced in equivalent quantities accurately and simultaneously.

Furthermore, by increasing, for example, the number of inlets, additional substances may be introduced into the network, resulting in solutions containing different, but predictable, quantities of two or more substances. Thus, micro-quantities of solutions containing varying, but precise, quantities of two or more substances may be produced on a continuous basis. For example, a solution containing a reagent may be pumped into one inlet, a solution containing a buffer into a second inlet and a solution containing an acid into a third inlet. In this manner, individual fluid streams may be produced containing various concentrations of the reagent at a variety of pHs. The output of each stream may be predicted by the structure of the microfluidic network and by the flux rates employed at each of the inlets.

In another embodiment, the same device may be used to supply titrating fluid with one or more properties of the fluid varying between each of the outlets. For example, a substance may be simultaneously titrated against a variety of solutions each containing a different amount of a titrating agent. Alternatively, one of the components in the solution may be kept constant for each of the output solutions while varying another of the components. Of course, multiple networks may be used in parallel with different outputs from each of the networks being joined together to produce unique solutions. Such a system may be engineered to produce any combination of solutions that could alternatively be made by time, material and labor intensive serial dilution techniques. In addition, the output may be dynamically altered, for example, by employing valves in the network or variable speed pumps at the inlets.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 29 -

In another aspect, materials may be deposited on a surface to form a stationary gradient. For example, a gradient of a chemical or biochemical may be formed in a fluid by, for example, using a gradient generator such as that shown in Fig. 1, and the solution may be passed over a surface on which the chemical or biochemical may be deposited.

5 This may allow various compounds to be fixed to a surface at concentrations that vary over a very small scale. A surface may be derivatized using this technique with anything that could be suspended or dissolved in a fluid. The fluid may then be fed to a device such as that shown in Fig. 1 and a desired concentration gradient produced. If the surface is placed in contact with the concentration gradient and has an affinity for the

10 material contained in the fluid, the material may be deposited on the surface proportionally to its concentration in the solution at the point of contact. Furthermore, a solution containing two or more components may be manipulated to provide the surface with each component at a different concentration gradient. For instance, one component may be deposited in a linear gradient increasing from left to right while a second

15 component may be applied to the surface parabolically. Furthermore, the two substances may be applied to the surface simultaneously using the same fluid. Examples of materials that may be applied to a surface include biochemicals and chemicals such as peptides and ligands, polymers and pre-polymers, and compounds exhibiting specific reactive groups. For example, a mixed SAM may be deposited in a desired gradient on a

20 surface. Surfaces may include, for example, glass, silicon, metals such as gold, and gels. In addition, any of these components may be applied to a surface in a second order or higher gradient as well as in a linear gradient. In a related aspect, materials that have been attached to a surface may be preferentially removed by passing a fluid containing a gradient of a substance having an affinity for the material that has been attached to the

25 surface.

Those skilled in the art would readily appreciate that all parameters listed herein are meant to be exemplary and that actual parameters will depend upon the specific application for which the methods and apparatus of the present invention are used. It is, therefore, to be understood that the foregoing embodiments are presented by way of

30 example only and that, within the scope of the appended claims and equivalents thereto, the invention may be practiced otherwise than as specifically described.

What is claimed is:

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 30 -

CLAIMS

1. An apparatus comprising:
a first generation comprising at least two first generation channels;
5 a common channel providing communication between each of the at least two first generation channels; and
a second generation comprising at least three second generation channels, each second generation channel having a first end and a second end, the first end of each being in communication with the common channel.
10
2. The apparatus of claim 1 wherein all channels within a generation can provide approximately equal resistance to fluid flow.
3. The apparatus of claim 1 wherein at least one of the channels is in
15 communication with a valve.
4. The apparatus of claim 1 wherein at least a portion of a first generation channel is less than about 1 mm wide.
- 20 5. The apparatus of claim 4 wherein at least a portion of a first generation channel is less than about 100 μm wide.
6. The apparatus of claim 5 wherein at least a portion of a first generation channel is less than about 50 μm wide.
25
7. The apparatus of claim 1 wherein all of the channels are less than 1 mm wide.
8. The apparatus of claim 1 wherein the second generation comprises at least
30 one channel more than the first generation.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 31 -

9. The apparatus of claim 1 further comprising a third generation, the third generation comprising at least one channel more than the second generation, each third generation channel having a first end and a second end, the first end of each being in communication with the second end of each of the second generation channels.
- 5
10. The apparatus of claim 1 wherein the second end of each second generation channel is in communication with the other second generation channels.
11. The apparatus of claim 9 further comprising additional generations wherein each successive generation comprises one more channel than does an immediately preceding generation.
- 10
12. The apparatus of claim 1 wherein the first ends of each of two adjacent second generation channels are about equidistant from one of the first generation channels.
- 15
13. The apparatus of claim 1 wherein the second generation channels are convoluted.
- 20
14. The apparatus of claim 1 wherein the common channel can provide less resistance to flow than can the first and second generation channels.
15. The apparatus of claim 1 wherein at least two of the second generation channels are in fluid communication with separate receiving vessels.
- 25
16. The apparatus of claim 15 wherein all of the second generation channels are in fluid communication with separate receiving vessels.
- 30
17. The apparatus of claim 1 comprising a second common channel, the second common channel in fluid communication with the second end of at least one of the second generation channels.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 32 -

18. The apparatus of claim 17 wherein the width of the second common channel varies over at least a portion of a length of the second common channel.
- 5 19. The apparatus of claim 9 comprising a composite channel, the composite channel being in fluid communication with the second end of at least one of the third generation channels.
20. The apparatus of claim 11 comprising a composite channel, the composite channel being in fluid communication with the second end of at least one of a final generation channel.
- 10 21. The apparatus of claim 20 wherein all of the final generation channels are in fluid communication with the composite channel.
- 15 22. A network comprising two or more of the apparatus of claim a1.
23. A method of forming a gradient comprising:
passing a first fluid through a first channel;
20 passing a second fluid through a second channel;
joining the first fluid and the second fluid in a common channel;
passing fluid from the common channel into at least three additional channels; and
recombining the fluid from the three additional channels into a single
25 channel under conditions of substantially laminar flow to produce a composite fluid.
24. The method of 23 wherein the fluid is a liquid.
25. The method of claim 23 wherein the fluid is a gas.
- 30 26. The method of claim 23 further comprising passing at least the first fluid through additional channels in additional stages.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 33 -

27. The method of claim 23 further comprising the step of dividing the recombined fluid into four additional channels.
- 5 28. The method of claim 23 further comprising passing a third fluid through a third channel and joining the third fluid with the first and second fluids in the common channel.
- 10 29. The method of claim 23 further comprising the step of adjusting the rate of flow of at least the first fluid.
30. The method of claim 23 further comprising the step of smoothing the gradient profile in the recombined fluid.
- 15 31. The method of claim 30 further comprising the step of allowing substantial diffusion to occur between laminary flowing streams in the recombined fluid.
- 20 32. The method of claim 31 further comprising the step of altering the amount of diffusion by altering the velocity of the flow of at least the first fluid.
33. A fluid stream comprising:
a first substance that varies in concentration in a direction substantially perpendicular to the direction of flow of the fluid;
25 a second substance that varies in concentration in a direction substantially perpendicular to the direction of flow of the fluid; and
a concentration gradient of the first substance being of a different profile than a concentration gradient of the second substance.
- 30 34. The fluid stream of claim 33 wherein the fluid is a liquid.
35. The fluid stream of claim 33 wherein the fluid is a gas.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 34 -

36. The fluid stream of claim 33 wherein a profile representing the concentration gradient of the first substance can be represented by a second order or higher polynomial.
- 5
37. The fluid stream of claim 33 further comprising a third substance, the concentration of the third substance varying in concentration in a direction substantially perpendicular to the direction of flow.
- 10
38. The fluid stream of claim 34 wherein the substance is a biochemical.
39. The fluid stream of claim 38 wherein the biochemical is a peptide.
40. An nth order polynomial concentration gradient wherein n is greater than
- 15 or equal to 2.
41. The concentration gradient of claim 40 wherein the width across the gradient is less than 1 cm.
- 20
42. The concentration gradient of claim 41 wherein the width across the gradient is less than 1 mm.
43. The concentration gradient of claim of claim 40 wherein the gradient is in a fluid and is stable for at least about 10 seconds.
- 25
44. The concentration gradient of claim 40 wherein the gradient is on a surface.
- 30
45. The concentration gradient of claim 44 wherein the gradient is a chemical or biochemical gradient.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 35 -

46. The concentration gradient of claim 45 wherein the gradient is less than about 1 cm in width.
47. The concentration gradient of claim 46 wherein the gradient is less than
5 about 1 mm in width.
48. The surface of claim 46 wherein the surface is a protein chip.
49. A surface comprising:
10 a first chemical or biochemical gradient disposed on a portion of the surface;
a second chemical or biochemical gradient disposed on the portion of the surface; and
15 a third chemical or biochemical gradient disposed on the portion of the surface, wherein each gradient is different.
50. The surface of claim 49 wherein the width of at least one of the gradients is less than about 1 mm.
- 20 51. The surface of claim 49 wherein the surface is a protein chip and at least one of the chemical or biochemical is a peptide.
52. The surface of claim 49 wherein at least the first chemical or biochemical is embedded in a matrix.
25
53. The surface of claim 51 wherein the matrix is a gel.
54. A method of treating a surface comprising:
30 passing a fluid along a portion of a surface under conditions of substantially laminar flow wherein the fluid comprises a concentration gradient of at least one substance, the concentration gradient being substantially perpendicular to the direction of flow and being substantially continuous across the fluid; and

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 36 -

treating differentially a plurality of sections of the portion of the surface exposed to different concentrations of the substance.

55. The method of claim 54 wherein the portion of the surface is less than 10
5 cm wide.
56. The method of claim 55 wherein the portion of the surface is less than 1
cm wide.
- 10 57. The method of claim 56 wherein the portion of the surface is less than 1
mm wide.
58. The method of claim 54 wherein the substance is a catalyst.
- 15 59. The method of claim 54 wherein the treatment comprises hardening the
surface.
60. The method of claim 54 wherein the treating comprises depositing the
substance on the surface.
- 20 61. The method of claim 60 wherein the portion of the surface is less than 1
cm in width.
62. The method of claim 54 wherein the treating comprises forming a
25 topological gradient on the surface.
63. The method of claim 62 wherein the treating comprises removing material
from the surface.
- 30 64. The method of claim 63 wherein the portion of the surface is less than 1
cm in width.

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 37 -

65. A method of diluting a fluid comprising:
feeding a high concentration fluid to a first inlet;
feeding a low concentration fluid to a second inlet;
passing the fluid from the first inlet and the fluid from the second inlet
5 into a first generation common channel;
splitting the fluid in the common channel into at least three second
generation channels;
recombining the fluids from the at least three second generation channels
into a second generation common channel;
10 splitting the fluid in the second generation common channel into a
plurality of third generation channels; and
collecting fluid from at least one of the plurality of third generation
channels.
- 15
66. A method of producing a fluid exhibiting two different concentration
gradient profiles, the method comprising:
combining at least a first starting fluid with a second starting fluid to form
a combined stream, the first starting fluid comprising a first substance that is
20 substantially absent from the second fluid;
dividing the combined stream into a series of second stage streams; and
joining at least two of the second stage streams to form a composite
stream wherein the composite stream exhibits a different concentration gradient profile
for the first substance and a second substance.
- 25
67. A method of producing a series of solutions comprising:
contacting a concentrated solution of a substance and a less concentrated
solution of the substance to form a combined fluid; and
30 separating the combined fluid, without using a membrane, into a plurality
of separate streams wherein at least one of the separate streams comprises the substance

WO 02/22264

PCT/US01/42195

- 38 -

at a concentration that is substantially different than the concentration of the substance in another of the separate streams.

5 68. The method of claim 67 wherein the concentration of the substance in one of the separate streams is about equal to the concentration of the substance in either the concentrated solution or the less concentrated solution.

10 69. The method of claim 67 further comprising the step of contacting a third solution comprising a second substance with the combined fluid.

15 70. The method of claim 69 wherein at least one of the separate streams contains concentrations of the first substance and the second substance at a ratio that is different than the ratio of the first substance and the second substance in at least one other of the separate streams.

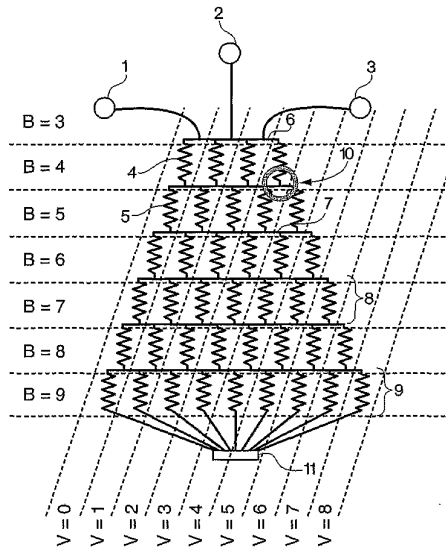


Fig. 1

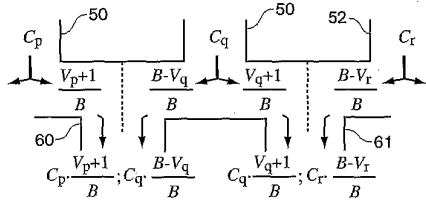


Fig. 2a

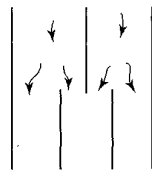


Fig. 2b

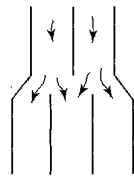


Fig. 2c

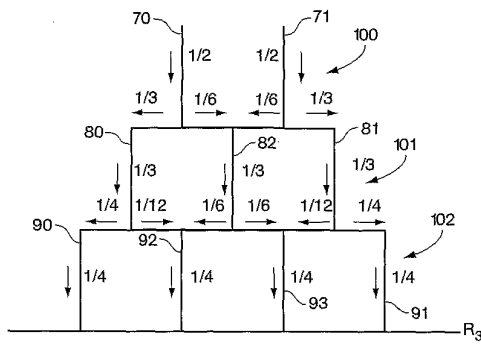


Fig. 3

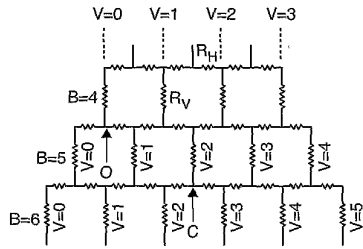


Fig. 4

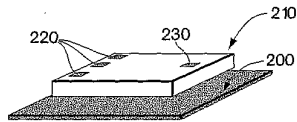


Fig. 5

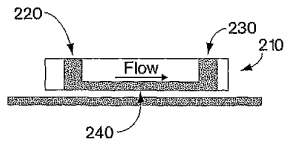
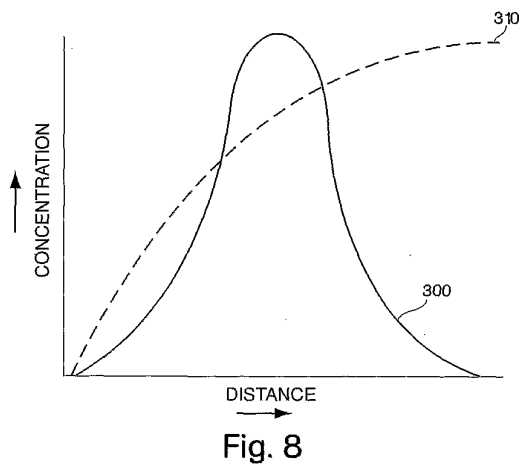
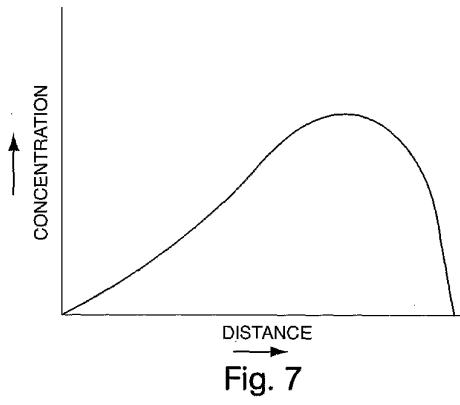
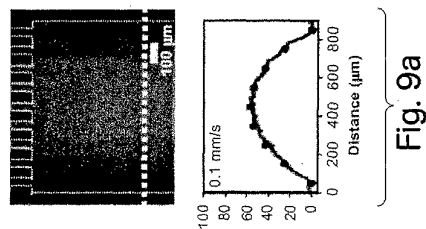
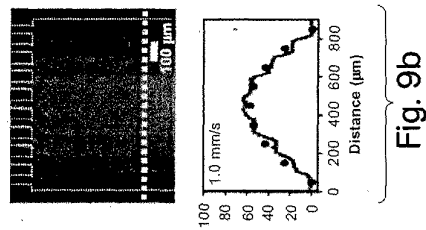
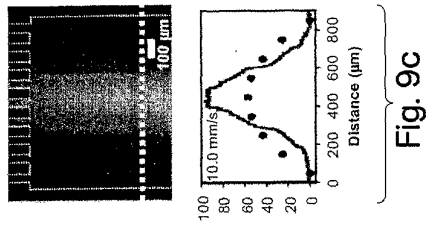


Fig. 6

5/15





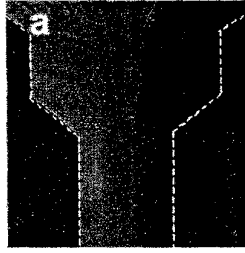


Fig. 10a

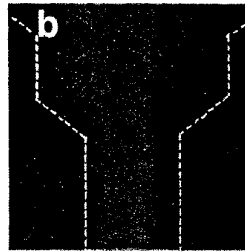


Fig. 10b

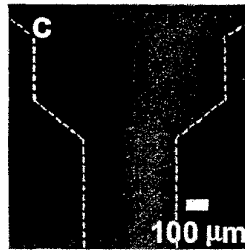


Fig. 10c

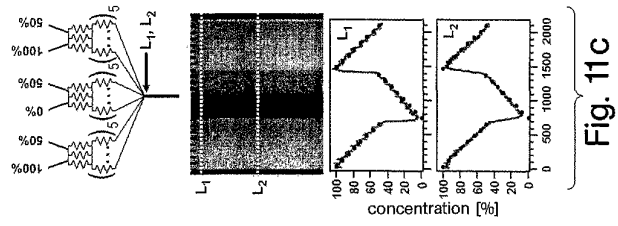


Fig. 11c

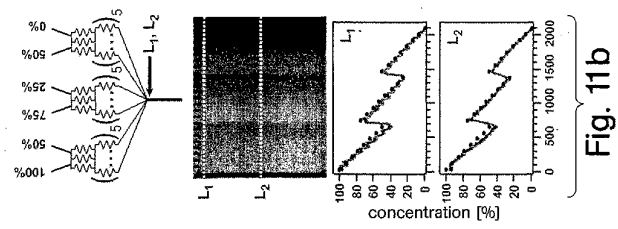


Fig. 11b

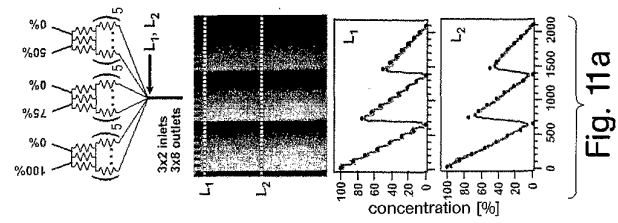
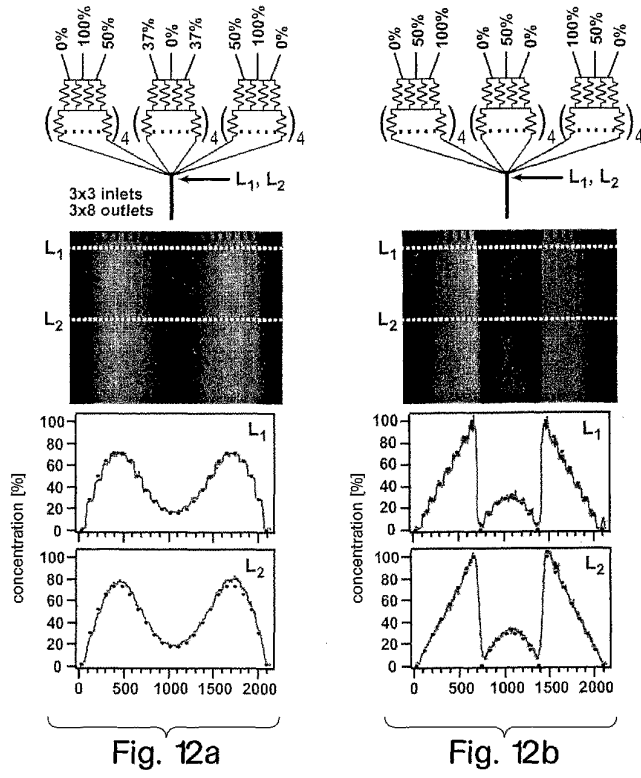


Fig. 11a



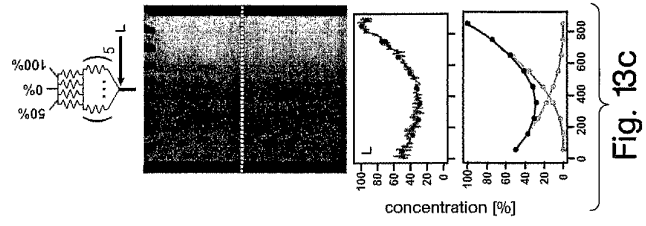


Fig. 13c

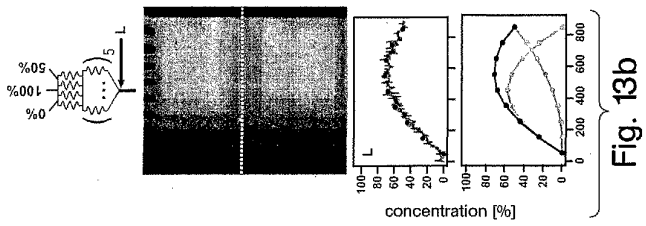


Fig. 13b

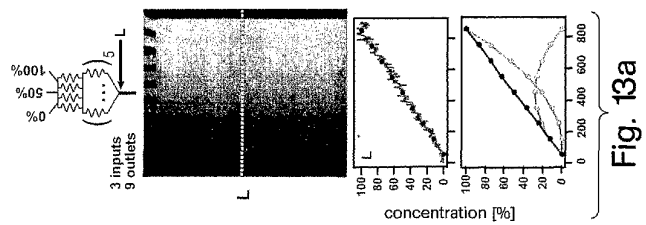


Fig. 13a

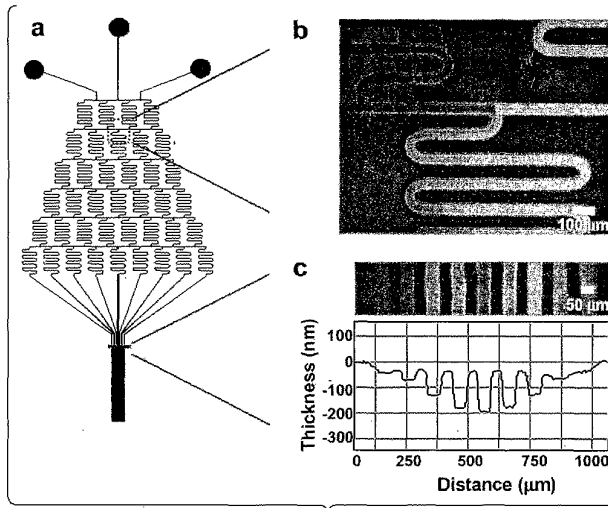


Fig. 14

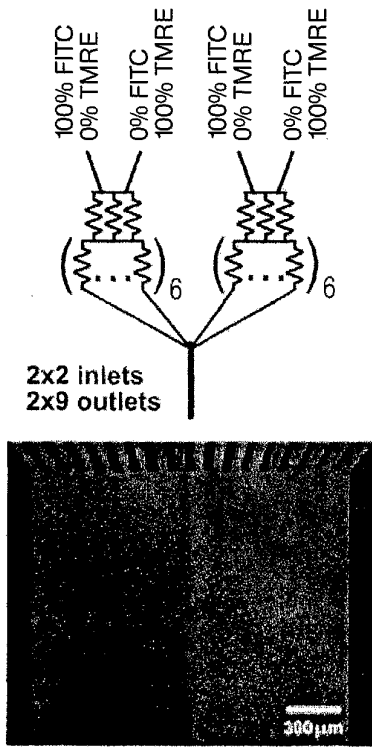


Fig. 15

13/15

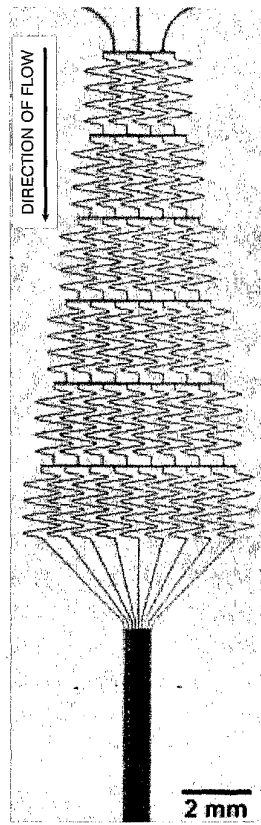


Fig. 16

WO 02/22264

PCT/US01/42195

14/15

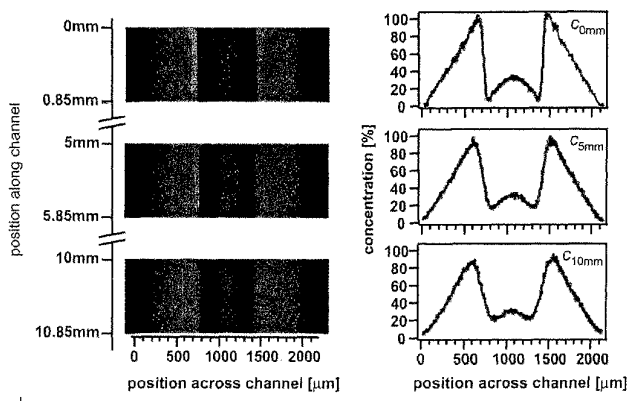


Fig. 17a

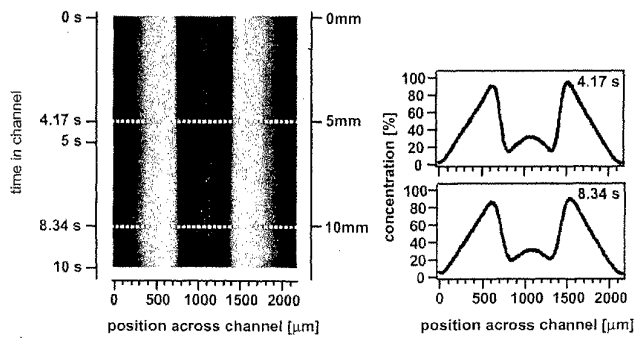


Fig. 17b

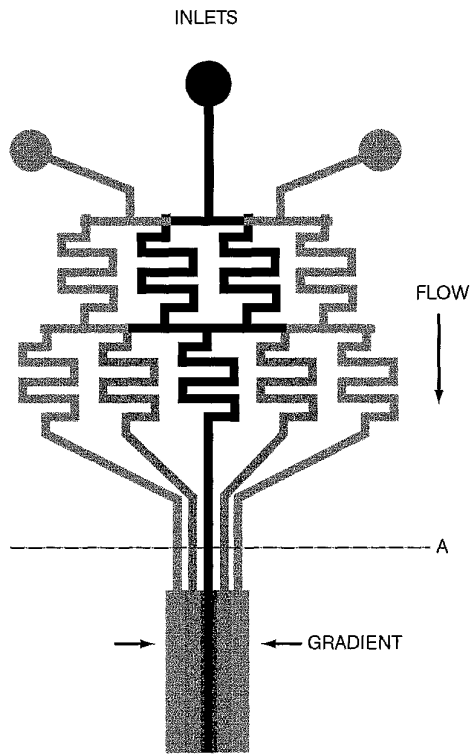


Fig. 18

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

REVISED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
21 March 2002 (21.03.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/022264 A2

- (51) International Patent Classification: B01F 4/13/00, B01D 3/00, B01J 19/00, 19/24, G01N 33/543, 33/543 (74) Agent: OYER, Timothy, J.; Wolf, Greenfield & Sacks, P.C., 600 Atlantic Avenue, Boston, MA 02210 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/42195 (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 18 September 2001 (18.09.2001) (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/233,142 18 September 2000 (18.09.2000) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE [US/US]; Holyoke Center-Suite 727, Cambridge, MA 02138 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): JEON, Noo, Li [KR/US]; Apartment 317, 29 Garden Street, Cambridge, MA 02138 (US). DERTINGER, Stephan, K., W. [DE/US]; Apartment 308, 2 Ware Street, Cambridge, MA 02138 (US). CHIU, Daniel, T. [CA/US]; 7009 40th Avenue NE, Seattle, WA 98115 (US). CHOI, Insung, S. [KR/US]; 808 Memorial Drive #209, Cambridge, MA 02139 (US). WHITESIDES, George, M. [US/US]; 124 Gasmere Street, Newton, MA 02458 (US).
- Published: with declaration under Article 17(2)(a); without abstract; title not checked by the International Searching Authority
- (48) Date of publication of this revised version: 18 July 2002
- (15) Information about Correction: see PCT Gazette No. 29/2002 of 18 July 2002, Section II
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/022264 A2

(54) Title: METHOD AND APPARATUS FOR GRADIENT GENERATION

(57) Abstract:

PATENT COOPERATION TREATY

PCT


DECLARATION OF NON-ESTABLISHMENT OF INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 17(2)(a), Rules 13ter.1(c) and Rule 39)

| | | |
|---|---|---|
| Applicant's or agent's file reference H0498/7158W0 | IMPORTANT DECLARATION | Date of mailing(day/month/year) 17/04/2002 |
| International application No. PCT/US 01/42195 | International filing date(day/month/year) 18/09/2001 | (Earliest) Priority date(day/month/year) 18/09/2000 |
| International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC | | B01F04--B01F13/00--B01D3/00--B01J19/00-- B01J19/24--G01N33/543--G01N33/543-- |
| Applicant PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE | | |

This International Searching Authority hereby declares, according to Article 17(2)(a), that **no international search report will be established** on the international application for the reasons indicated below

1. The subject matter of the international application relates to:
- a. scientific theories.
 - b. mathematical theories
 - c. plant varieties.
 - d. animal varieties.
 - e. essentially biological processes for the production of plants and animals, other than microbiological processes and the products of such processes.
 - f. schemes, rules or methods of doing business.
 - g. schemes, rules or methods of performing purely mental acts.
 - h. schemes, rules or methods of playing games.
 - i. methods for treatment of the human body by surgery or therapy.
 - j. methods for treatment of the animal body by surgery or therapy.
 - k. diagnostic methods practised on the human or animal body.
 - l. mere presentations of information.
 - m. computer programs for which this International Searching Authority is not equipped to search prior art.
2. The failure of the following parts of the international application to comply with prescribed requirements prevents a meaningful search from being carried out:
- the description
 - the claims
 - the drawings
3. The failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions prevents a meaningful search from being carried out:
- the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
 - the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.
4. Further comments: IPC Classes: //B01L2/00--H01L21/00

| | |
|--|-------------------------------------|
|  Name and mailing address of the International Searching Authority European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Irene Sardjoe |
|--|-------------------------------------|

International Application No. PCT/US 01/42195

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 203

In view of the large number and also the wording of the claims presently on file (70 claims where 9 are independent ones), which render it difficult, if not impossible, to determine the matter for which protection is sought, the present application fails to comply with the clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (see also Rule 6.1(a) PCT) to such an extent that a meaningful search is impossible. In the present case and at first sight the claimed subject matters are so numerous and different that they simply preclude the detailed analysis necessary to come to a firm conclusion regarding the essential technical features of the invention and also the unity of the present application.

The subject matter varies from:

- apparatus with a certain way to split and combine streams of fluids (claims 1 to 21); to
- methods relating the formation of gradients in general (which would lead to multiple possibilities -i.e. concentration gradients, topological gradients, shear gradients- according to what is stated in the description, on page 6, lines 4-5) (claims 23 to 32), the treatment of surfaces (claims 54 to 64), or the production of fluids with different concentrations and which could be failing clarity and conciseness requirements of Article 6 PCT (claim 65) or unity of the invention (claims 66 and claims 67 to 70); or to
- products claimed as stream (claims 33 to 39), as a surface composed of different products having different properties (claims 49 to 53, leading to a huge amount of possibilities), or as a general property of any substance (claims 40 to 48).

Consequently, no search report can be established for the present application.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PH,PL,PT,R0,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100096013

弁理士 富田 博行

(74)代理人 100093089

弁理士 佐久間 滋

(72)発明者 ジェオン,ヌー・リ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138,ケンブリッジ,ガーデン・ストリート 29,アパートメント 317

(72)発明者 ダーティンガー,ステファン・ケイ・ダブリュー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02138,ケンブリッジ,ウェア・ストリート 2,アパートメント 308

(72)発明者 チュー,ダニエル・ティー

アメリカ合衆国ワシントン州98115,シアトル,フォーティス・アベニュー・ノースイースト 7009

(72)発明者 チョイ,インスン・エス

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02139,ケンブリッジ,メモリアル・ドライブ 808,ナンバー 209

(72)発明者 ホワイトサイズ,ジョージ・エム

アメリカ合衆国マサチューセッツ州02158,ニュートン,グラスミア・ストリート 124

Fターム(参考) 4B029 AA07 FA04