

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 080**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**G01N 15/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2007 E 07757964 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **10.12.2008 EP 1998884**

54 Título: **Aparato inyector de flujo coaxial en voladizo y procedimiento de selección de partículas**

30 Prioridad:

**16.03.2006 US 377032**

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

**08.02.2013**

73 Titular/es:

**VISIONGATE, INC. (100.0%)  
1509 56TH AVENUE COURT NW  
GIG HARBOR, WA 98335, US**

72 Inventor/es:

**HAYENGA, JON W. y  
NELSON, ALAN C.**

74 Agente/Representante:

**URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio**

**ES 2 395 080 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Aparato inyector de flujo coaxial en voladizo y procedimiento de selección de partículas

## CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a la selección de partículas en un canal microfluídico de flujo laminar y más en particular, a la detección de células ópticas de difusión de luz, etiqueta fluorescente, o análisis de imágenes dirigida a ordenar células biológicas en un dispositivo microfluídico integrado mediante un canal activado de flujo coaxial en voladizo.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] El uso de las estructuras microfluídicas en citometría ha aumentado rápidamente con la llegada de muchas tecnologías de microfabricación capaces de producir redes de circuitos fluidicos. Muchas aplicaciones de citometría en microfluídica intentan diferenciar tipos de células o células con características específicas dentro de una población de células. Los detectores disponibles para seleccionar células van desde detección de difusión de luz, a marcador de fluorescencia, marcadores cromáticos y diferenciación morfológica de imagen y característica. La detección necesariamente precede a la selección y es seguida por un direccionamiento coordinado de una célula a uno u otro trayecto. Convencionalmente, gotas de alta velocidad de fluido de selección de células que contienen las células de interés son expulsadas y cargadas eléctricamente de manera que puedan ser desviadas electrostáticamente mediante un campo de alto voltaje para dirigir las gotas a recoger a uno o dos lugares para su posterior procesamiento.

15 [0003] La selección de células tiene muchos propósitos incluyendo el posterior estudio de poblaciones de células concentradas con características similares, como células madre o células con una característica genética o química particular que puedan ser marcadas con fluorescencia o tinción. Seleccionar es también un medio eficaz para validar un esquema de detección en el que una observación humana u otro instrumento de referencia pueden evaluar células con un mecanismo o marcador de esquema de detección determinado.

20 [0004] Una técnica de selección se encuentra en la patente U.S. 6.778.724, emitida el 17 de agosto de 2004, a Wang et al., de título "Conmutación y Selección Óptica de Muestras Biológicas Y Micropartículas Transportadas en un Dispositivo Microfluídico, que incluyen Dispositivos Biochip Integrados". Allí se revela un método de conmutación y selección de pequeñas partículas impulsadas con fuerzas de presión óptica, con luz láser, como se desprende del funcionamiento de VCSELs en modo Laguerre-Gaussian, en cruces ramificados en canales microfluídicos de forma que entran en ramas descendentes seleccionadas, realizando de ese modo conmutación y selección de partículas, incluso en paralelo.

25 [0005] Otra técnica de selección se encuentra en la patente U.S. 6.540.895, emitida el 1 de abril de 2003, a Spence et al., de título "Clasificador de Células Microfabricadas para Materiales Químicos y Biológicos". Allí se revela un método para seleccionar células en un adecuado canal ramificado basándose en la presencia o en la cantidad de una señal detectable, tal como una señal óptica, con o sin estimulación, tal como exposición a la luz a fin de fomentar fluorescencia. Un delgado voladizo puede incluirse dentro de un punto de ramificación, de modo que pueda ser desplazado hacia una o la otra pared del canal principal, normalmente por atracción electrostática, cerrando así un canal ramificado seleccionado.

30 [0006] La selección de partículas, como células, en un canal microfluídico aprovecha la capacidad de utilizar tamaños pequeños de muestras de líquidos de menos de 1  $\mu$ L y permite la detección y posterior separación de partículas de la muestra en una de una pluralidad de trayectos posibles. El mecanismo de selección permanece contenido y muy cerca del lugar de detección, eliminando así la necesidad de trayectos fluidicos largos que diluyan las muestras que requieren pasos de procesamiento adicionales para concentrar aún más la muestra para un análisis o detección posterior.

35 [0007] Otra de las ventajas de un enfoque microfluídico es que la transferencia de la muestra puede ser completamente eliminada del hardware proporcionando trayectos fluidicos de sustitución de bajo coste para cada muestra procesada. La complejidad e incertidumbre de la limpieza fluidica entre procesamiento de muestras es un detalle del sistema, a menudo pasado por alto, que requiere con frecuencia lavar el líquido 5 a 20 veces a través de tubos para limpiarlo para procesar una muestra. La limpieza se complica más cuando se utilizan microcanales que fuerzan condiciones de flujo laminar que eliminan la posibilidad de crear fuerzas turbulentas de cizallamiento suficientemente fuertes para limpiar las paredes de los tubos. El único mecanismo de eliminación de la contaminación de las paredes de los tubos es la difusión de los contaminantes de la pared en una solución de lavado. La sustitución más que la limpieza de los trayectos de fluidos requiere menos líquido y mejora sustancialmente la certeza de eliminar la contaminación cruzada de la muestra. La principal fuente de fracaso en la instrumentación fluidica se encuentra en la fluidica básica. Tales modos de fallos fluidicos incluyen fugas, obstrucciones, fallos de sellado, crecimiento de biopelícula o contaminación acumulada. Limpiando la solución se produce un abrumador volumen de biorresiduos de instrumentos tales como citómetros de flujo.

40 [0008] Sin embargo, hasta la invención presente, nadie ha contemplado utilizar un canal de flujo laminar en un sistema de selección microfluídico que incluya un sistema de detección de partículas, control de selección y un inyector coaxial

en voladizo. El uso del inyector coaxial en voladizo permite, por primera vez, una capacidad para dirigir partículas, incluyendo células biológicas, a uno seleccionado de una pluralidad de estratos presentes en un canal de flujo laminar. Las partículas seleccionadas resultantes comprenden así una muestra enriquecida para facilitar el análisis de las condiciones de enfermedad, incluyendo varios tipos de cáncer, como el de pulmón, colon, próstata, mama, cáncer cervical y de ovario.

#### RESUMEN DE LA INVENCION

**[0009]** La presente invención proporciona un aparato y método para seleccionar partículas en un canal microfluídico de flujo laminar utilizando un elemento alargado en voladizo integrado en el dispositivo microfluídico. Un canal coaxial corre a través del elemento alargado en voladizo, donde el canal coaxial está dimensionado para que pasen partículas de un tamaño predeterminado. Un accionador se acopla al elemento alargado en voladizo, para accionar dicho elemento alargado en voladizo.

#### BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

##### **[0010]**

FIG. 1 muestra esquemáticamente un ejemplo de diagrama de bloques de un sistema de selección de partículas mediante un canal activado de flujo coaxial en voladizo contemplado por una realización de la presente invención.

FIG. 2 muestra esquemáticamente una ilustración de ejemplo de una vista lateral de un dispositivo microfluídico integrado para seleccionar partículas en un trayecto de flujo laminar según se contempla por una realización de la presente invención.

FIG. 3 muestra esquemáticamente una ilustración de ejemplo de una vista en sección extrema de un dispositivo microfluídico integrado en operación para seleccionar partículas en un trayecto de flujo laminar según se contempla por una realización de la presente invención.

FIG. 4 muestra esquemáticamente un diagrama de bloques de una realización de ejemplo de un sistema de selección según se contempla para uso en la presente invención.

FIG. 5 muestra esquemáticamente un diagrama de flujo de una realización de ejemplo de un método de selección según se contempla para uso en la presente invención.

FIG. 6 muestra esquemáticamente un diagrama de bloques de otra realización de ejemplo de un sistema de detección de partículas según se contempla para uso en la presente invención que emplea un sistema de detección de dispersión de luz.

#### DESCRIPCION DE LA REALIZACION PREFERIDA DE LA INVENCION

**[0011]** La siguiente descripción es del mejor modo actualmente contemplado para poner en práctica la invención. Esta descripción se realiza con el propósito de ilustrar los principios generales de la invención, y no debe ser tomada en un sentido limitador. El alcance de la invención se determina mejor por referencia a las reivindicaciones anexas.

**[0012]** El sistema de la presente invención aprovecha las condiciones de flujo laminar impuestas por la naturaleza del flujo de fluido con números de Reynolds bajos. El flujo laminar se define como un flujo con números de Reynolds por debajo de 2000, pero para la mayoría de las aplicaciones microfluídicas, especialmente las que utilizan fluidos con viscosidad superior al agua, se alcanzan casi siempre números de Reynolds por debajo de 20. Un número de Reynolds bajo asegura corrientes de flujo laminar o en capas en canales. Para flujos con números de Reynolds bajos, el movimiento de fluidos ortogonal a la dirección del flujo sólo se produce cuando es conducido por fuerzas distintas de las fuerzas generadas por el flujo. Algunas de las posibles fuerzas perturbadoras incluyen difusión provocada por temperatura y peso molecular de los fluidos, la sedimentación/flotabilidad que es una función del peso o densidad de la materia en la corriente de flujo, fuerzas de Bernoulli que incluyen presiones diferenciales creadas por un flujo desigual en diferentes lados de un objeto, y fuerzas mecánicas o electromagnéticas. Normalmente, una partícula que fluye por una capa de la corriente de flujo tenderá a mantenerse en esa capa hasta que se ha actuado sobre ella por una fuerza externa.

**[0013]** En una realización ejemplar, la presente invención utiliza un dispositivo inyector de flujo coaxial en voladizo que se puede doblar a voluntad para entregar partículas en un estrato particular de una corriente de flujo laminar dentro de un canal. El flujo laminar conservará la ubicación de la corriente de flujo con partícula inyectada hasta una división en el trayecto del flujo. El trayecto de flujo puede dividirse en dos o más trayectos con dimensiones de canal y propiedades de materiales simétricas de tal manera que se produzca una casi igual división de el trayecto de flujo. Es a menudo ventajoso evacuar los trayectos de aire para evitar que pequeños atrapamientos de aire afecten a la simetría de la división del flujo laminar.

5 [0014] En operación, accionar o doblar el tubo de inyección de flujo centrado en voladizo en un trayecto de flujo laminar unida coaxialmente puede dirigir una célula dirigida a uno de dos o más canales. La velocidad límite de actuación dependerá de las fuerzas aplicadas al voladizo y de la constante natural de muelle del material utilizado en la fabricación, de la amortiguación viscosa del fluido en el canal, y de la distancia a la que debe viajar el accionador. En un canal microfluídico típico la deflexión requerida será de menos de 100 micras.

10 [0015] El uso de una solución tixotrópica o de adelgazamiento por cizalla, como un gel óptico, en un dispositivo microfluídico construido de acuerdo con la presente invención permite que el flujo en un trayecto líquida de selección o detección se ralentice o detenga sin una sedimentación gravitacional de partículas dentro del fluido. Tales soluciones además amplían el uso de un clasificador para una operación muy lenta, como, por ejemplo la selección de partículas durante un número de horas, sin sedimentación gravitacional como limitación. Geles ópticos tixotrópicos listos para usar se seleccionan por sus propiedades ópticas y geles ópticos que tienen claridad e índices de refracción adecuada están comercialmente disponibles.

15 [0016] En referencia ahora a la FIG. 1, esquemáticamente se muestra un ejemplo de diagrama de bloque de un sistema de selección de partículas en un canal microfluídico según lo previsto por una realización de la presente invención. Un sistema de selección 100 incluye un sistema de control fluídico 10 configurado para proporcionar una señal de control de selección 19, una señal de control de bomba 20 y una señal de control de vacío 22. Un sistema de detección de partículas 12 está acoplado electrónicamente para transmitir información de imagen al sistema de control fluídico 10. Un sistema de conducción de flujo de fluidos 5 recibe información de control de la señal de control de bomba 20 y de la señal de control de vacío 22. Un colector de interfaz 15 puede también acoplarse al sistema de conducción de flujo de fluidos 5. Un dispositivo microfluídico integrado 101 puede ser montado en el colector de interfaz 15. Como será apreciado por los expertos en la materia, el colector de interfaz no es necesario para cada aplicación de diseño de la invención, pero puede ser útil para algunas aplicaciones.

25 [0017] El dispositivo microfluídico integrado 101 incluye ventajosamente un canal de soporte de muestra 30, una célula de foco hidrodinámico 37, una zona de inspección 32 en comunicación con un canal de selección 36 que incluye un inyector de flujo coaxial en voladizo 35 (como se muestra en detalle, por ejemplo en la FIG. 2) aguas abajo del canal de soporte de muestra 30. A través del canal de selección 36, unas partículas, incluyendo células biológicas, se clasifican en al menos dos canales de salida, incluyendo un canal de residuos 38 y un canal de células recolectadas 40. La zona de inspección 32 se sitúa para pasar partículas en posición para ser detectadas por el sistema de detección de partículas 12. Donde el sistema de detección de partículas 12 incluye un microscopio, por ejemplo, la zona de inspección 32 se situaría en el campo de visión de la óptica del microscopio. En una realización útil de la invención un accionador de clasificación 34 se encuentra próximo al inyector de flujo coaxial en voladizo 35, y acoplado para recibir la señal de control de selección 19 desde el sistema de control fluídico 10.

35 [0018] El sistema de detección de partículas 12 puede ser cualquier sistema de detección adecuado para detectar características distintivas inherentes a o impartidos a partículas que están siendo procesadas. Por ejemplo, el sistema de detección de partículas 12 puede ser un sistema eléctrico de zona de detección, un sistema de detección de difusión de luz, un sistema basado en detección de fluorescencia, un sistema óptico de captura y procesamiento de imagen, un sistema de microscopía, un sistema de tomografía óptica o equivalentes. El sistema de detección puede ser externo al dispositivo microfluídico, integrado en el dispositivo microfluídico o parcialmente integrado en el dispositivo microfluídico.

40 [0019] El sistema de accionamiento de flujo fluido 5 puede incluir ventajosamente al menos un depósito de fluido 26, al menos una bomba de fluido 24 acoplada al al menos un depósito de líquido 26, y al menos una bomba de vacío 28 acoplada a la al menos una bomba de fluido 24. Los especialistas en la materia que tengan el beneficio de esta revelación reconocerán que el depósito, la bomba de vacío y la bomba de fluido pueden ser de configuraciones, tamaños y cantidades diferentes dependiendo de la aplicación siempre y cuando estén adecuadamente configuradas para transmitir presión de accionamiento de fluido y presión de vacío para proporcionar condiciones de flujo laminar a través del colector de interfaz al dispositivo microfluídico integrado. El sistema de accionamiento de flujo fluido puede transmitir ventajosamente fluido utilizando desplazamiento positivo o presión y/o presión de vacío para proporcionar condiciones de flujo laminar. En una realización de un ejemplo las condiciones de flujo laminar comprenden una circulación a tapón.

50 [0020] En un ejemplo de realización útil, el canal de soporte de muestra 30 contiene una muestra de células biológicas. Así, en el caso donde las partículas estén siendo clasificadas en células de interés y otras partículas, las células de interés pueden ser dirigidas por operación del accionador de clasificación del canal de recolección de células 40 mientras que otras partículas son dirigidas al canal de residuos 38. En algunas aplicaciones puede ser deseable procesar adicionalmente las células no recolectadas en todavía otros tipos de partículas o células. En tales casos puede conectarse una pluralidad de sistemas de selección de la invención para continuar la selección en base a criterios diferentes o pueden emplearse más de dos canales de selección. De esta manera el aparato y el método de la invención proporcionan un medio para enriquecer una muestra biológica a fin de facilitar el análisis aguas abajo de las condiciones de enfermedades tales como el cáncer.

55 [0021] Dependiendo de la información recibida desde el sistema de detección, el sistema de control fluídico 10 proporciona una señal de respuesta de control de selección 19 al accionador de clasificación 34 que a su vez opera

para accionar el inyector de flujo coaxial en voladizo 35 para seleccionar células biológicas en uno seleccionado de los al menos dos canales de salida. Por ejemplo, en el caso donde estén siendo recolectadas células biológicas, el inyector de flujo coaxial en voladizo 35 será accionado para doblarse para entregar células de interés en un estrato seleccionado de una corriente de flujo laminar que conduce al canal de recolección de células.

5 **[0022]** El dispositivo microfluídico integrado 101 puede constar de una pluralidad de laminaciones típicas en la construcción de dispositivos microfluídicos. Diversos procesos son conocidos por producir sistemas microfluídicos complejos incluyendo ataque químico húmedo, corte láser, corte laminado láser, micromoldeado, fotopolimerización y métodos y combinaciones de métodos equivalentes. El proceso de laminado polimérico utilizando una multiplicidad de capas permite el cruce de canales así como la posibilidad de utilizar diferentes materiales para diferentes capas.  
10 Algunos materiales útiles para la fabricación de dispositivos microfluídicos integrados contienen silicio, vidrio, películas poliméricas, elastómeros de silicona, materiales fotoresist, hidrogeles, termoplásticos y materiales conocidos equivalentes.

**[0023]** En referencia ahora a la FIG. 2, se muestra esquemáticamente una ilustración de un ejemplo de una vista lateral de un dispositivo microfluídico integrado para clasificar partículas en un trayecto de flujo laminar según lo previsto por una realización de la presente invención. Un canal de flujo coaxial en voladizo 200 incorporado en el inyector de flujo coaxial en voladizo 35 permite la inyección de partículas o células a un fluido de vaina de flujo laminar que se divide en flujo como corriente de flujo 'A', que continúa hacia abajo del canal 40 y corriente de flujo 'B', que sigue hacia abajo del canal 38. El canal central 200 está en voladizo y suspendido en la vaina de flujo que entra en los canales 218 y 209 desde la izquierda. Un objeto, como una célula biológica 237, circula por el canal central en voladizo justo antes de que se expulse a un área de flujo combinado denominado canal de selección 36. Un recubrimiento ferroso 235 o material ferroso embebido como un alambre de níquel puede ser embebido en o aplicado de otro modo a las paredes del canal 200. Alternativamente el material 235 puede ser un curvador bimetálico o un material piezo curvador para mover el canal en voladizo hacia arriba en el flujo de corriente 'A' o hacia abajo en el flujo de corriente 'B'. Fuera de los canales  
15 20 25  
fluidicos puede haber accionadores electromagnéticos 34 y 341 que cuando son activados empujan el voladizo hacia el accionador. También pueden emplearse otros sistemas equivalentes de accionamiento.

**[0024]** En un ejemplo, el inyector de flujo coaxial en voladizo en el que el canal coaxial puede tener un diámetro en el intervalo de 100 micras a 1 mm. En otro ejemplo de realización el inyector de flujo coaxial en voladizo ventajosamente puede tener un diámetro en el rango de 50 micras a 1 mm.

**[0025]** En referencia ahora a la FIG. 3, se muestra esquemáticamente una ilustración de un ejemplo de una vista lateral de un dispositivo microfluídico integrado para ordenar partículas en un trayecto de flujo laminar en un estado accionado según lo previsto por una realización de la presente invención. En el estado de accionamiento mostrado, una señal de control en respuesta al reconocimiento de un objeto de interés, como una célula biológica 237, provoca que el primer accionador 34 sea activado por una señal eléctrica en la bobina 208. En respuesta, el primer accionador de selección 34, aquí un electroimán, estira el canal en voladizo 200 ligeramente hacia arriba en el canal unas 20-100 micras. La leve flexión hacia arriba es suficiente para inyectar la célula 237 en la corriente de flujo laminar 'A' que entra en el canal de células recolectadas 40 desde el que más tarde podrán recolectarse células. Ya que el flujo es continuo, la siguiente célula 203 en el canal central 200 tendrá entonces que ser dirigida hacia un canal seleccionado según lo determinado por el sistema de detección de partículas 12 (FIG. 1) antes de la selección por el inyector de flujo coaxial en voladizo 35. La dirección de la siguiente célula 203 se producirá mediante la activación del primer accionador 34 o del segundo activador 341 con bobina 258 después de que la célula 237 ha sido expulsada, pero antes de que la siguiente célula 203 alcance el punto de eyección. Nótese que si no se identifica un objeto de interés en la zona de inspección el segundo activador de clasificación 341 se activaría provocando el doblado del inyector de flujo coaxial en voladizo 35 en la dirección opuesta dirigiendo así el objeto que no interesa al canal de residuos 38.  
30 35 40

**[0026]** En referencia ahora a la FIG. 4, se muestra una realización de ejemplo de un sistema de detección de partículas 12 previsto para su uso en la presente invención. El sistema de detección de partículas 12 ventajosamente puede constar de óptica de microscopio 42 acoplada para enviar información de imagen a una cámara 50. La cámara 50 ventajosamente puede comprender cualquier cámara convencional, una cámara digital, o un sensor de imagen equivalente como uno que utilice dispositivos de carga acoplados, color, infrarrojos, sensores ultravioleta y otros similares que dependen de la aplicación y de la frecuencia espectral de la imagen que está siendo creada. La cámara 50 transmite información de generación de imágenes a un sistema de procesamiento de imágenes 51. El sistema de procesamiento de imagen 51 ventajosamente puede constar de un sistema de caracterización de célula, un programa de software de reconocimiento de objetivo, un programa de software de reconstrucción individual o multidimensional de imagen o equivalente que se ejecuta en un ordenador personal, circuito integrado específico de aplicación o en un procesador equivalente. Dicho software es capaz de distinguir rasgos y características de las partículas con imagen generada. El sistema de procesamiento de imágenes hace una determinación de selección basada en la información de imagen y transmite la determinación al sistema de control fluidoico 10 que genera señales de control de selección en respuesta a las imágenes procesadas en el programa de software. El sistema de control fluidoico ventajosamente puede incorporar un generador de retardo de tiempo 11 para determinar el retardo entre el momento en que la partícula es detectada en la zona de inspección y el momento en que alcanza la punta 39. El mecanismo de temporización puede ser un temporizador incorporado en el control fluidoico, o el dispositivo microfluídico integrado 101, o añadido como un  
45 50 55 60

conjunto separado de sensores. Alternativamente, el retardo de tiempo puede calcularse utilizando parámetros de sistema conocidos y el tiempo de detección de una partícula o equivalentes.

**[0027]** El dispositivo microfluídico integrado 101 está posicionado para situar la zona de inspección 32 dentro del campo de visión de la óptica de microscopio 42. A medida que el procesador de imágenes 51 identifica partículas y células de las imágenes de la cámara en la zona de inspección envía información al control fluídico 10. El control fluídico 10, envía como respuesta una señal de control de selección 19 a uno de los accionadores de selección 34, 341 (341 no mostrado aquí). Se entenderá que la señal de control 19 puede representar una pluralidad de líneas analógicas o digitales construidas de conformidad con principios de ingeniería aceptados. Es decir, si el procesamiento de imagen reconoce una célula biológica, por ejemplo, la correspondiente señal de control de selección accionará los accionadores de selección para desviar la punta del eyector en voladizo 39 para enviar la célula al canal de células recolectadas. De lo contrario, la partícula será dirigida al canal de residuos al desviar el voladizo en la dirección opuesta.

**[0028]** En una realización, el sistema como se contempla en la presente invención puede utilizar tomografía óptica para el sistema de detección. Algunos ejemplos de sistemas útiles basados en tomografía óptica incluyendo algoritmos de reconstrucción se describen en la patente US 6,522,775, de fecha 18 de febrero de 2003 a Nelson y titulada, "Apparatus and Method for Imaging Small Objects in a Flow Stream Using Optical Tomography". La divulgación completa de la patente US 6,522,775, se incorpora aquí por referencia.

**[0029]** En referencia ahora a la FIG. 5, se muestra esquemáticamente un diagrama de bloque de un ejemplo de realización de un método de selección en un trayecto de flujo laminar microfluídico según lo según se prevé para uso en la presente invención. El método de selección 300 incluye los pasos de:

transportar partículas en un trayecto de flujo laminar dentro de un dispositivo microfluídico integrado en el paso 302,

detectar características de al menos una parte de la pluralidad de partículas en el trayecto de flujo laminar en el paso 303,

detectar la velocidad de dichas partículas con imágenes sucesivas o detecciones en el paso 304,

generar información de detección en respuesta a las características detectadas en el paso 305,

hacer una determinación de selección para una partícula seleccionada en base a las características detectadas en el paso 306,

retardar hasta que la partícula está en la punta del expulsor en el paso 307, y

dirigir la partícula seleccionada a un estrato seleccionado de el trayecto de flujo laminar en el paso 308.

**[0030]** En una realización útil el paso 302 de transportar partículas en un trayecto de flujo laminar puede ventajosamente llevarse a cabo operando el sistema de control fluídico para proporcionar, una señal de control de bomba y una señal de control de vacío y conduciendo el flujo de fluido a través de un colector de interfaz opcional en respuesta a la señal de control de la bomba y la señal de control de vacío. En la realización que utiliza un sistema de detección óptica, el paso 303 de detectar características de partículas en el trayecto de flujo laminar puede ventajosamente llevarse a cabo mediante captura de imágenes con la cámara acoplada electrónicamente al sistema de control fluídico. La optica de microscopio puede acoplarse para enviar imágenes a la cámara cuando las muestras de un canal de soporte de muestras son hidrodinámicamente enfocadas y transportadas a través del campo de visión de la óptica de microscopio y dentro de la profundidad de campo de la óptica. El paso 304 de dirigir la partícula seleccionada puede ventajosamente llevarse a cabo por el inyector de flujo coaxial en voladizo aguas abajo del canal de soporte de muestra y del canal de visualización óptica. El sistema de control fluídico es operado para proporcionar señales de control de selección al accionador de selección que actúa en el inyector de flujo coaxial en voladizo para dirigir un objeto a un trayecto de flujo laminar, que se divide en uno de al menos dos canales de salida. El paso 307 de retardar hasta que la partícula esté en la punta eyectora puede ventajosamente ser según un retardo temporizado determinado por medición o predeterminación de la velocidad de una partícula o célula en la corriente de flujo y la distancia entre la punta eyectora y la zona de inspección. Por lo tanto, la detección de una partícula en la zona de inspección desencadena el retardo de tiempo. Alternativamente, el retraso de tiempo se puede establecer en otras partes de los sistemas de detección o de procesamiento de imagen o combinaciones de los mismos.

**[0031]** En referencia ahora a la FIG. 6, se muestra esquemáticamente otra realización de ejemplo de un sistema de detección de partículas 12A previsto para su uso en la presente invención. El sistema de detección de partículas 12A puede ventajosamente constar de un sistema de detección de dispersión de luz en donde la luz puede transmitirse de una fuente de luz 142 a través de la óptica 144 para incidir en una célula 1 en la zona de inspección 32. La luz dispersada 155 del objeto es transmitida a través de la óptica de retorno 154 sobre un sensor de luz 151. Las señales de detección del sensor de luz se procesan por un detector de rasgos 160 el cual hace una determinación de selección basada en la intensidad de la luz dispersada dentro de un determinado ángulo de recogida de luz. El detector de características envía información de selección al control del interruptor fluídico que en respuesta acciona el mecanismo

5 de selección sustancialmente como se ha descrito con referencia a las FIGS.1 a 6. Mediante la sustitución de los sensores y las fuentes de luz como conocen los expertos en la materia que tengan el beneficio de esta revelación, puede utilizarse un sistema de detección similar para detectar fluorescencia o señales espectralmente codificadas del objeto donde el color o presencia de un marcador espectralmente codificado se introduce en la decisión para dirigir una partícula o célula a un canal u otro, en este ejemplo, la célula 1.

**REIVINDICACIONES**

1. Un inyector de flujo coaxial en voladizo en un dispositivo microfluídico de flujo laminar (100) que comprende:
  - un elemento alargado en voladizo (35) integrado en dicho dispositivo microfluídico de flujo laminar (100);
  - un canal coaxial (200) que corre a través de dicho elemento alargado en voladizo (35), dicho canal coaxial (200) estando dimensionado para pasar partículas (237) de un tamaño predeterminado; y
  - un accionador (34), acoplado a dicho elemento alargado en voladizo (35), para accionar dicho elemento alargado en voladizo (35).
2. El inyector de flujo coaxial en voladizo de la reivindicación 1 en donde dicho elemento de accionamiento comprende un accionador (34) seleccionado del grupo que consiste de un dispositivo de flexión piezoeléctrico, un generador de campo magnético, un elemento electromagnético y un dispositivo de atracción electrostática.
3. El inyector de flujo coaxial en voladizo de la reivindicación 1 en donde el elemento alargado en voladizo (35), incorpora al menos uno de un alambre, un recubrimiento ferroso, material ferroso embebido y un alambre de níquel.
4. El inyector de flujo coaxial en voladizo de la reivindicación 1 en donde el canal coaxial (200) está dimensionado para pasar células biológicas (1) en un flujo laminar.
5. El inyector de flujo coaxial en voladizo de la reivindicación 1 en donde el elemento alargado en voladizo (35) está adaptado para ser accionado para dispensar partículas (237) en una pluralidad de estratos de flujo laminar en el dispositivo microfluídico (100).
6. El inyector de flujo coaxial en voladizo de la reivindicación 1 en donde el canal coaxial (200) tiene un diámetro en el intervalo de 100 micras a 1 mm.
7. El inyector de flujo coaxial en voladizo de la reivindicación 1 en donde el canal coaxial (200) tiene un diámetro en el intervalo de 50 micras a 1 mm.
8. Un método para seleccionar partículas (237) en un trayecto microfluídico de flujo laminar, el método de selección comprendiendo los pasos de:
  - transportar una pluralidad de partículas en un trayecto de flujo laminar (302) dentro de un dispositivo microfluídico integrado (100);
  - detectar características de la pluralidad de partículas (303) en el trayecto de flujo laminar;
  - generar información de detección (305) en respuesta a las características detectadas;
  - hacer una determinación de selección (306) para una partícula seleccionada en base a la información de detección;
  - inyectar la partícula seleccionada en un inyector de flujo coaxial en voladizo (35) aguas abajo del canal de soporte de muestra; y
  - proporcionar señales de control de selección en respuesta a la determinación de selección a un accionador de selección (34) que actúa sobre el inyector de flujo coaxial en voladizo (35) a fin de dirigir la partícula seleccionada a un estrato seleccionado (308) de la trayectoria de flujo laminar a través de uno de al menos dos canales de salida (38, 40).
9. El método de la reivindicación 8 en donde el paso de transportar incluye además enfocar hidrodinámicamente la pluralidad de partículas (237) en el trayecto de flujo laminar.
10. El método de la reivindicación 8 en donde el paso de detectar características (303) comprende operar al menos uno de un sistema de detección de dispersión de luz para detectar características que incluye propiedades de dispersión, un sistema de detección de fluorescencia para detectar características que incluye propiedades de fluorescencia, un sistema de microscopía para detectar características que incluye propiedades de generación de imágenes, y una captura óptica de imagen, un sistema de tomografía óptica para detectar características que incluye propiedades de generación de imágenes, y un sistema de procesamiento para detección de características que incluye propiedades de generación de imágenes.
11. El método de la reivindicación 10 en donde el paso de operar un sistema de captura óptica de imagen y de procesamiento comprende el paso de capturar imágenes de partículas (237) en el trayecto de flujo laminar con una cámara (151).

- 5
12. El método de la reivindicación 10 en donde sistema de captura óptica de imagen y de procesamiento comprende además un programa de software de reconocimiento de objetivo para hacer la determinación de selección
  13. El método de la reivindicación 8 en donde el accionador de selección (34) es seleccionado del grupo que consta de un dispositivo de flexión piezoeléctrico, un generador de campo magnético, un electroimán y un dispositivo de atracción electrostática.
  14. El método de la reivindicación 8 en donde el inyector de flujo coaxial en voladizo (35) incorpora al menos uno de un alambre, un recubrimiento ferroso, material ferroso embebido y un alambre de níquel.
  15. El método de la reivindicación 8 en donde las partículas (237) comprenden células biológicas (1).

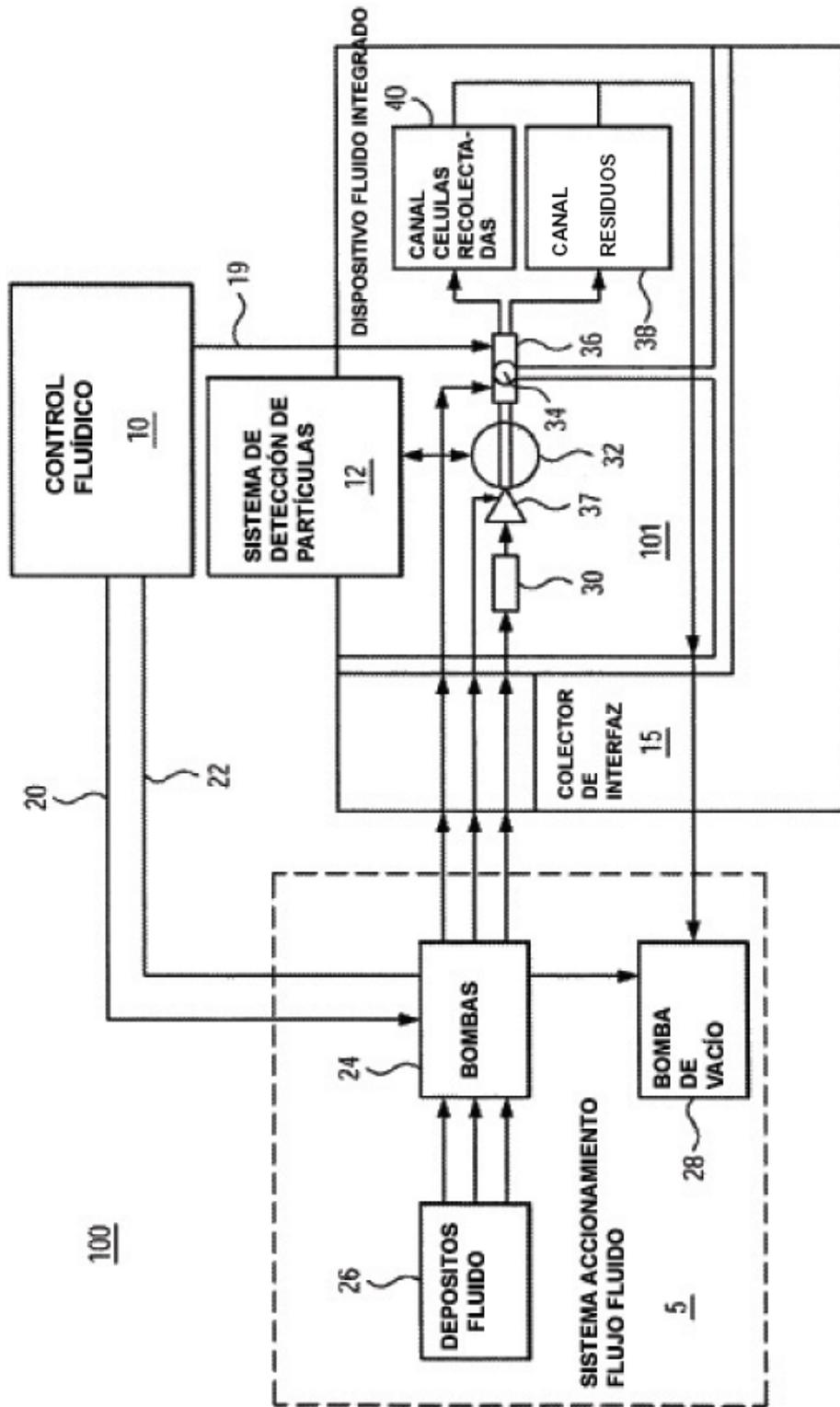
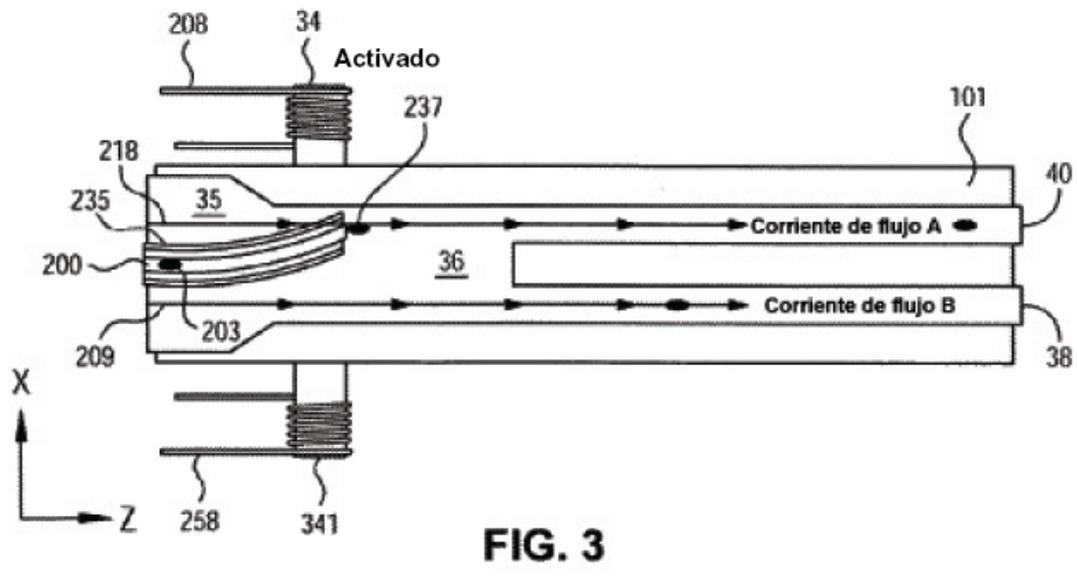
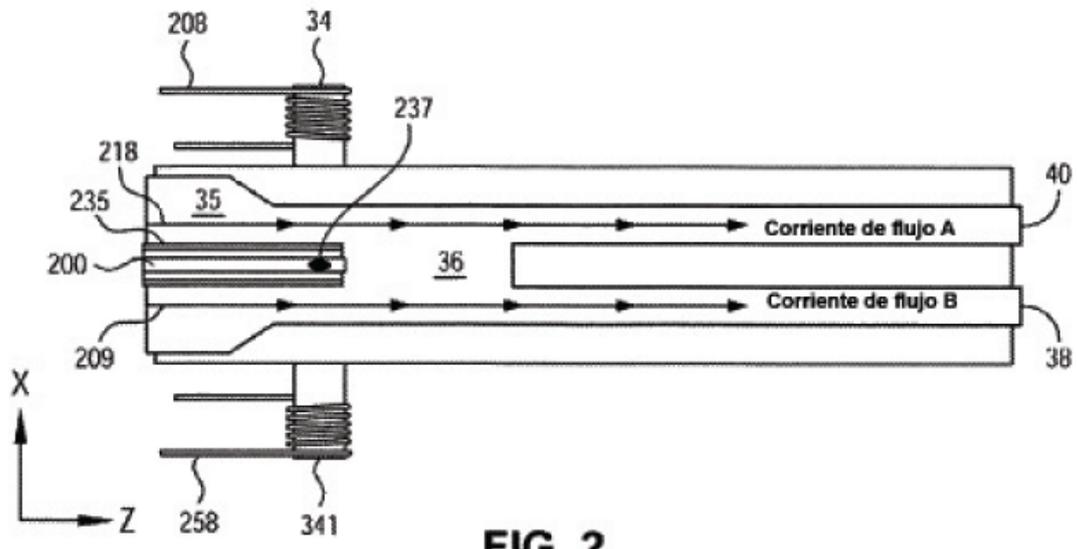
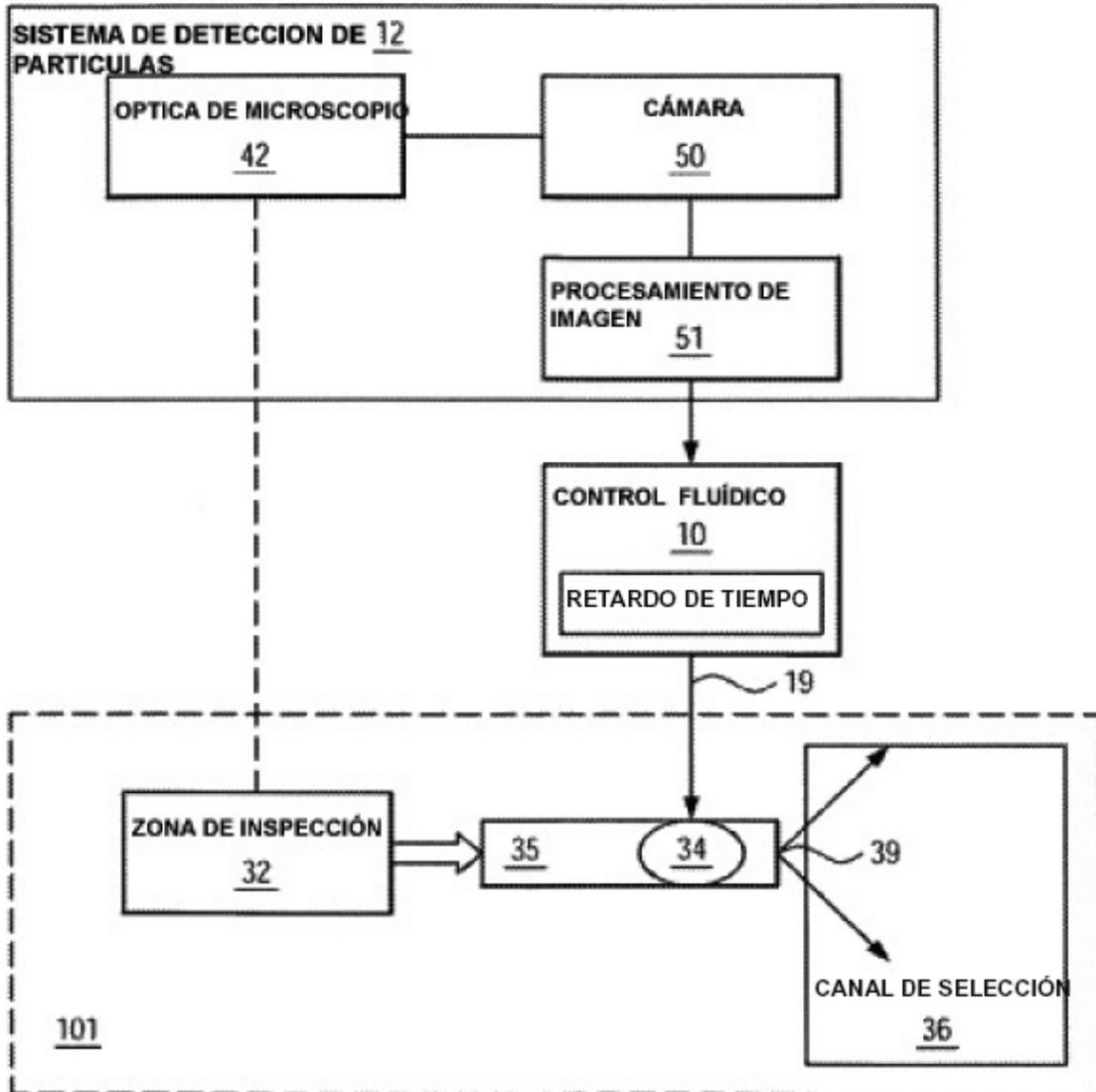


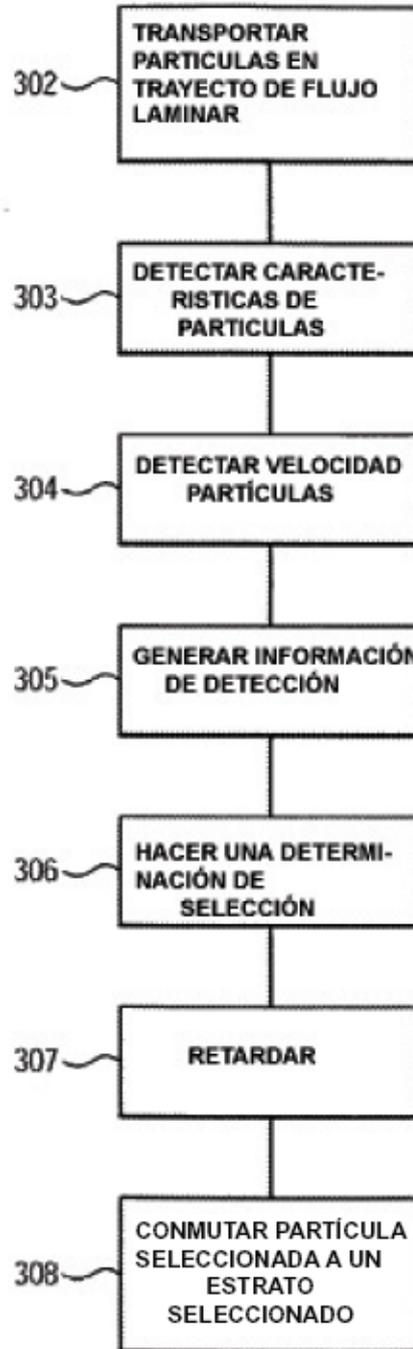
FIG. 1





**FIG. 4**

300



**FIG. 5**

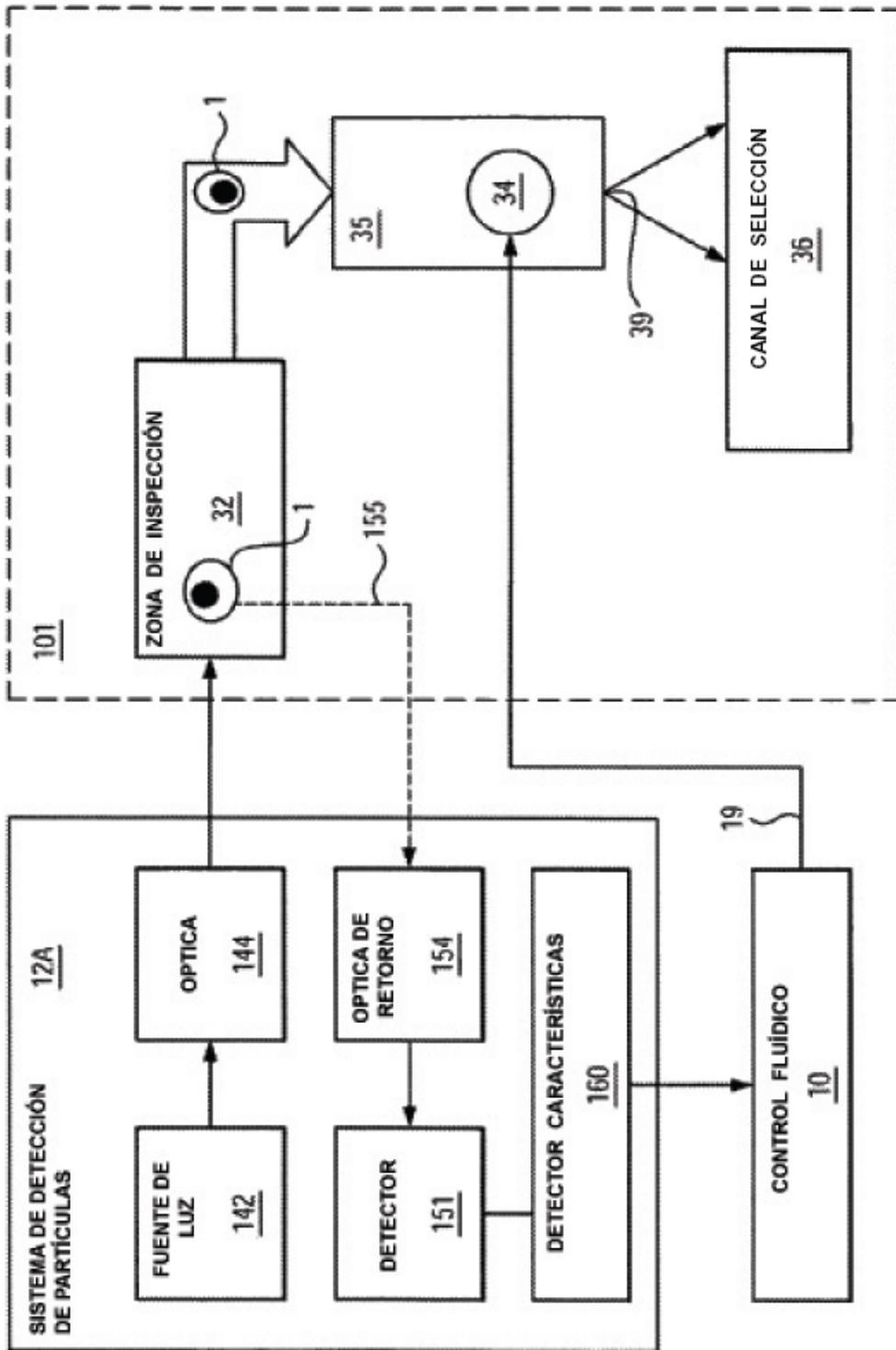


FIG. 6