

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 626 848

 (51) Int. Cl.:

 G01N 15/02
 (2006.01)

 G01N 1/40
 (2006.01)

 B01L 3/00
 (2006.01)

 G01N 15/10
 (2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacion	nal: 27.09.2	012 PCT/US201	2/057631
87) Fecha y número de publicación internacional:	20.06.2013	WO13089883	
96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	27.09.2012	E 12856833 (4)	
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea:	01.03.2017	EP 2761303	

54 Título: Dispositivos y métodos para la separación de partículas basada en la forma

③ Prioridad:

# 30.09.2011 US 201161541934 P 02.03.2012 US 201261606287 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 26.07.2017

Titular/es:
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%) 1111 Franklin Street 12th Floor San Francisco, CA 94607-5200, US
72 Inventor/es:
DI CARLO, DINO; MASAELI, MAHDOKHT y SOLLIER, ELODIE
(74) Agente/Representante:
ÁLVAREZ LÓPEZ, Sonia

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

Dispositivos y métodos para la separación de partículas basada en la forma

#### 5 Campo de la invención

El campo de la invención se refiere en general a dispositivos microfluídicos usados para la separación y clasificación de aplicaciones. Más particularmente, el campo de la invención se refiere a los dispositivos de microfluidos usados para separar y clasificar partículas en función de sus respectivas formas.

### 10

## Antecedentes

Se han realizado varios intentos usando la microfluídica para la separación continua de células o micropartículas. Algunos de los enfoques combinan microfluídica con un campo de fuerza aplicada externamente. Por ejemplo,

- 15 fuerzas basadas en fuerzas eléctricas, magnéticas, ópticas, y acústicas se han intentado separar de las partículas. Otros enfoques se basan en la hidrodinámica pasiva creada en microcanales. Por ejemplo, se ha propuesto que diversos filtros (por ejemplo, tipo rebosadero, tipo flujo transversal) y membranas operan en función de principios de exclusión por tamaños. Por ejemplo, Takagi *et al.* han desarrollado una técnica de separación continua de partículas que usa un microcanal que tiene múltiples canales de derivación dispuestos asimétricamente. <u>Véase</u> Takagi *et al.*,
- 20 Continuous particle separation in a microchannel having asymmetrically arranged multiple branches, Lab Chip, jul.; 5(7) 778-84 (2005). Este método mejora el esquema de separación del fraccionamiento de flujo constreñido (FFC), que usa flujo laminar en un microcanal.
- Yamada *et al.* han propuesto un dispositivo microfluídico para la concentración continua y clasificación de partículas 25 usando filtración hidrodinámica (FHD). Este método usa varios canales laterales para alinear partículas a lo largo de la pared de un canal microfluídico. Canales de selección aguas abajo adicionales se usan para extraer selectivamente partículas diferentes del canal principal. <u>Véase</u> Yamada *et al.*, *Hydrodynamic filtration for on-chip particle concentration and classification utilizing microfluidics*, Lab Chip, nov; 5(11): 1233-1239 (2005). Choi *et al.* han desarrollado una separación microfluídica y una técnica para estimar el tamaño de micropartículas que usan
- 30 hidroforesis, el movimiento de las partículas en suspensión bajo la influencia de un campo de presión inducida por microestructuras. Mediante la explotación de obstáculos inclinados en un microcanal, puede generarse un gradiente de presión lateral de manera tal que las micropartículas pueden desviarse y disponerse a lo largo de los flujos laterales inducidos por el gradiente. Véase Choi et al., Continuous hydrophoretic separation and sizing of microparticles using slanted obstacles in a microchannel, Lab Chip, jul; 7(7): 890-97 (2007).
- 35

Huang *et al.*, han propuesto un método de separación continua de partículas a través del desplazamiento lateral determinista (DLD). <u>Véase</u> Huang *et al.*, *Continuous Particle Separation Through Deterministic Lateral Displacement, Science*, vol. 304 n.º 5673 págs. 987-990 (mayo de 2004). Esta técnica hace uso de la bifurcación asimétrica de flujo laminar en torno a los obstáculos. Una partícula elige su trayectoria determinista basándose en su tamaño. Otros

- 40 métodos se basan en la separación centrífuga. Por ejemplo, Ookawara et al. notificaron sobre el uso de microcanales de 200 µm x 170 µm con un radio semicircular de 2 mm para la separación centrífuga en la que las partículas de lechada se dirigen a un único brazo de un canal de bifurcación. Véase Ookawara et al., K. Feasibility Study on Concentrator of Slurry and Classification of Contained Particles by MicroChannel, Chem. Eng. J., v.101, 171-178 (2004). Más recientemente, Di Carlo et al. han desarrollado una técnica de concentración inercial,
- 45 ordenamiento, y separación que ordena partículas de una manera controlada en un canal microfluídico. Véase Di Carlo et al., Continuous inertial focusing, ordering, and separation of particles in microchannels. PNAS, 104, 48, 18892-18897 (2007).
- No obstante, la forma rara vez se ha considerado en la mayoría de estas técnicas de separación integrada, que usan 50 en general el tamaño de partículas, la capacidad de deformación, la densidad, las características eléctricas o magnéticas o incluso sus moléculas de superficie para separar las partículas al tiempo que se asume que las células y las partículas son esféricas. La centrifugación, que es la técnica convencional a macroescala para la separación de micropartículas, se ha considerado últimamente para la forma-separación de esferas y varas. <u>Véase</u> Sharma *et al.*, *Shape separation of gold nanorods using centrifugation. PNAS*, 106, 13, 498-4985 (2009). Recientemente, la
- 55 filtración hidrodinámica (FHD), el desplazamiento lateral determinista (DLD) y la dielectroforesis (DEF) han comenzado a considerar la forma como criterio de separación en microsistemas. Beech *et al.* introdujeron por vez primera la clasificación basada en la forma con la técnica DLD, mostrando que las partículas no esféricas pueden orientarse en los dispositivos DLD por el control de la profundidad del dispositivo resultante en diferentes dimensiones efectivas en la red de pilares. <u>Véase</u> Beech *et al.*, *Shape-based particle sorting A new paradigm in*
- 60 microfluidics, Proc. Micro Total Analysis Systems, Jeju, Corea, 800-802 (2009). Más recientemente, Sugaya et al.

investigaron la aplicabilidad de FHD para la separación basada en la forma y demostraron una diferencia en los comportamientos de separación de partículas esféricas y no esféricas en un punto de ramificación y usaron esta técnica para clasificar células germinativas/individuales a partir de una mezcla de células de levadura. Véase Sugaya et al. Observation of nonspherical particle behaviors for continuous shape-based separation using

- 5 hydrodynamic filtration, Biomicrofluidics, 5,024103 (2011). Del mismo modo, Valero et al. validaron la clasificación basada en la forma de levaduras mediante el equilibrio de fuerzas opuestas por DEF en múltiples frecuencias. <u>Véase</u> Valero et al., Tracking and synchronization of the yeast cell cycle using dielectrophoretic opacity, Lab Chip, 11, 1754-1760 (2011).
- 10 FHD y DLD son técnicas continuas y eficientes, pero ambas requieren caudales bajos (2-3 μl/min y 60 nl/min, respectivamente) y factores de dilución altos, ofreciendo por consiguiente una producción baja. Estas técnicas también requieren procesos de fabricación definidos con precisión y diseños complejos, ya que las características que son necesarias para garantizar la separación (redes de pilares para DLD, canales paralelizados altamente para FHD) tienen que diseñarse con precisión (resolución <1 μm). Por otra parte, DEF requiere la integración de</p>
- 15 elementos activos y un control preciso y reproducible de la conductividad del tampón entre cada experimento, lo que también complica su integración en un microsistema completamente integrado. Las soluciones basadas en DEF requieren la integración adicional de elementos activos y un control preciso y reproducible de la conductividad del tampón entre los análisis que hacen que basarse en DEF sea complicado y costoso.
- 20 Di Carlo *et al.* describen un dispositivo microfluídico para la clasificación de células exentas de etiqueta pasiva y el enriquecimiento que usa el tamaño celular y la deformabilidad como marcadores distintivos. <u>Véase</u> Lab Chip, 11, 912-920 (2011).

### <u>Resumen</u>

25

55

La invención se refiere a un sistema de clasificación de partículas como se describe en la reivindicación 1 independiente adjunta y en las reivindicaciones dependientes 2-5.

La invención se refiere además a un método de clasificación de partículas con formas diferentes en suspensión en 30 un fluido de muestra como se describe en la reivindicación 6 independiente adjunta y en las reivindicaciones dependientes 7-12.

### Breve descripción de los dibujos

35 La FIG. 1 ilustra un sistema o dispositivo de clasificación de partículas que no forma parte de la presente invención.

La FIG. 2A ilustra una vista ampliada de una región que se expande aguas abajo que termina en tres salidas separadas. Dos salidas tienen limitadores fluídicos idénticos, mientras que el limitador fluídico central tiene menos resistencia.

40 La FIG. 2B ilustra un modo de realización de un dispositivo de clasificación de partículas que usa un controlador de presión para ajustar las resistencias fluídicas de la pluralidad de salidas.

La FIG. 3 ilustra una fuente de partículas acoplada a la entrada de un sistema de clasificación de partículas.

La Fig. 4A ilustra un canal con forma rectangular, tal como el microcanal de concentración inercial con una relación de aspecto alta (Al>An) en el que se introduce una distribución de partículas al azar en la entrada.

45 La Fig. 4B ilustra una representación en sección transversal del microcanal 14 de concentración inercial en la región A de la FIG. 1.

La FIG. 4C ilustra una representación en sección transversal del microcanal 14 de concentración inercial en la región B de la FIG. 1.

- La FIG. 4D ilustra las relaciones de aspecto y dimensiones de diversas partículas que tienen diferentes tamaños y formas que fluyen a través del sistema de clasificación de partículas. Las dimensiones se muestran en las direcciones a y *b* que son en general ortogonales entre sí.
  - La Fig. 4E ilustra una imagen microscópica tomada de las partículas capturadas en la entrada. La barra de escala es de 10 µm.

La FIG. 4F ilustra una imagen microscópica tomada de las partículas capturadas en la salida. La barra de escala es de 10 μm.

- La FIG. 5A ilustra histogramas representados para ilustrar la variación de la distribución de partículas con formas diversas (esferas, vara con una relación de aspecto 3:1, y vara con un relación de aspecto 5:1) obtenida en diferentes números de Reynolds (recuadro) en diferentes geometrías de canal (ilustradas en las imágenes A, D y G del panel).
- 60 La FIG. 5B ilustra la X<sub>eq</sub> media representada para las tres geometrías de canal y las condiciones de flujo

#### ensayadas.

15

La Fig. 6A ilustra en la imagen A del panel un ajuste gaussiano representativo del recuento de partículas normalizado (%) como función de  $X_{eq}$  para partículas esféricas y de vara 1:5. La imagen B del panel muestra un factor de separabilidad de 1. La imagen C del panel muestra un factor de separabilidad de 2.

5 La FIG. 6B ilustra el factor de separabilidad obtenido para el canal con una anchura de 25 μm (imagen D), el canal con una anchura de 30 μm (imagen E), y el canal con una anchura de 35 μm (imagen F) en diversos caudales.

Las FIGS. 7A-7C ilustran tres configuraciones diferentes de un sistema de clasificación de partículas que no forma parte de la presente invención que se ensayó.

- 10 La FIG. 7D ilustra una imagen micrográfica del área entre las salidas 1 y 2.
  - La FIG. 7E ilustra una imagen micrográfica del área entre las salidas 4 y 5.
  - La FIG. 7F ilustra una imagen micrográfica del área en torno a la salida 5.
    - La FIG. 7G ilustra el RE y RdE de diversas partículas en cada salida del dispositivo de la Fig. 7A.
  - La FIG. 7H ilustra el RE y RdE de diversas partículas en cada salida del dispositivo de la Fig. 7B.
  - La FIG. 7I ilustra el RE y RdE de diversas partículas en cada salida del dispositivo de la Fig. 7C.
  - La FIG. 7J ilustra la PE de diversas partículas en cada salida del dispositivo de la Fig. 7A.
  - La FIG. 7K ilustra la PE de diversas partículas en cada salida del dispositivo de la Fig. 7B.
    - La FIG. 7L ilustra la PE de diversas partículas en cada salida del dispositivo de la Fig. 7C.
    - La FIG. 8A ilustra un sistema de clasificación de partículas que no forma parte de la presente invención.
- 20 La FIG. 8B ilustra un gráfico del *RE* para cada una de las cinco salidas del dispositivo de la Fig. 8A. La FIG. 8C ilustra un gráfico de la *PE* para cada una de las cinco salidas del dispositivo de la Fig. 8A. La FIG. 8D ilustra un gráfico del *RdE* para cada una de las cinco salidas del dispositivo de la Fig. 8A. La FIG. 9A ilustra una imagen microscópica de las células en la entrada de un sistema de clasificación de partículas. Las células se categorizaron en cinco grupos: individuales pequeñas (recuadro superior), individuales
- 25 grandes (segundo a partir del recuadro superior), germinativas (tercero a partir del recuadro superior), como dobletes (cuarto a partir del recuadro superior) y agregados (último recuadro). La FIG. 9B ilustra imágenes respectivas de la salida 2 y la salida 3. Las individuales tuvieron un alto rendimiento de extracción en la salida 2, mientras que en la salida 3, la pureza de las células germinativas aumentó. La FIG. 9C ilustra un gráfico de *RE* y *RdE* para cada una de las seis salidas.
- 30 La FIG. 9D ilustra un gráfico de la PE para cada una de las seis salidas.

### Descripción detallada de los modos de realización ilustrados

- La FIG. 1 ilustra un sistema 10 de clasificación de partículas que no forma parte de la presente invención. El sistema 35 10 de clasificación de partículas puede formarse con cualquier serie de materiales adecuados para aplicaciones microfluídicas. Por ejemplo, las características del sistema 10 de clasificación de partículas pueden formarse con polidimetilsiloxano (PDMS), que se une a un sustrato plano, tal como vidrio o plástico usando un proceso común de moldeo para réplica de PDMS. En resumen, las técnicas litográficas estándar se usaron para producir un molde a partir de un molde maestro de silicio recubierto por centrifugado con SU-8 fotorresistente. Los chips de PDMS se
- 40 produjeron a partir de este molde usando el kit elastómero Sylgard 184 (Dow Corning Corporation) y un agente reticulante en la relación polimérica de 1:10. Para contener los canales, PDMS y vidrio fueron activados por plasma de aire (Plasma Cleaner, Plasma Harrick, 500 mTorr, 30 s) antes unirse entre sí.
- Alternativamente, las características del sistema 10 de clasificación de partículas pueden formarse directamente en 45 un sustrato, tal como silicio o incluso un polímero, tal como plástico usando técnicas litográficas u otras técnicas similares conocidas para producir dispositivos microfluídicos. Una ventaja del sistema 10 de clasificación de partículas es que puede fabricarse con técnicas de fabricación microfluídica estándar que reduce el tiempo y el coste de fabricación. Además, es innecesaria configuración externa alguna para inducir la separación de partículas en contraposición a los métodos activos. La separación depende de la geometría del dispositivo y de la presencia del
- 50 fluido como fuerza motriz. A diferencia de los dispositivos basados en DLD y FHD que requieren caudales bajos, el sistema 10 de clasificación de partículas descrito en la presente memoria puede usarse con caudales relativamente altos, lo que significa que el dispositivo puede alcanzar una alto producción.
- Como se usa en la presente memoria, "partícula" se refiere a un objeto de pequeñas dimensiones en el micrómetro o 55 menor escala. Las partículas pueden incluir objetos tanto vivos como no vivos. Los ejemplos de partículas incluyen células, bacterias, virus, y similares. Las partículas pueden incluir orgánulos o subcomponentes de constituyentes biológicos más grandes. Las partículas también pueden incluir objetos inanimados como perlas o similares. Las partículas pueden unirse o conjugarse con otras especies. Las partículas incluyen partículas tanto individuales o distintas, así como aglomeraciones de otros objetos más pequeños.

60

El sistema de clasificación de partículas incluye una entrada 12 que se conecta a un extremo aguas arriba de un microcanal 14 de concentración inercial. Como se aprecia en la FIG. 1, existe un filtro opcional 16 para capturar los desechos u otras partículas grandes de interés. El filtro opcional 16 puede estar formado por una o más protuberancias, postes, o similares que impiden el paso de partículas grandes o voluminosas en el microcanal 14 de

- 5 concentración inercial. El microcanal 14 de concentración inercial puede tener una longitud de varios centímetros (p. ej., 4 cm) y una sección transversal rectangular. Por ejemplo, el microcanal 14 de concentración inercial puede tener una altura de aproximadamente 50 μm y una anchura en el intervalo de aproximadamente 25-35 μm aunque se contemplan otras dimensiones fuera de este intervalo.
- 10 El microcanal 14 de concentración inercial termina en un extremo aguas abajo en una región 18 que se expande aguas abajo se extiende preferiblemente de forma gradual lateralmente a medida que se mueve a lo largo de la dirección del flujo (dirección de la flecha A en la FIG. 2A). A este respecto, los contornos de los bordes del canal 19 que definen la región 18 que se expande aguas abajo como se aprecia en la FIG. 2A están curvados o tienen forma parabólica en oposición a una cámara que se expande que forma un ángulo
- 15 recto. En general, se prefiere una transición fluida desde el microcanal 14 de concentración inercial a la región 18 que se expande aguas abajo. Por ejemplo, las paredes que definen la región 18 que se expande aguas abajo que pueden formar un ángulo que aumenta progresivamente hacia el exterior a medida que se mueven aguas abajo en la dirección de flujo del fluido. Por ejemplo, las paredes que definen la región que se expande aguas abajo pueden formar un ángulo que aumenta progresivamente hacia el exterior, es decir, un ángulo de 2° por 100 μm de
- 20 movimiento en la dirección de flujo del fluido. Como se explica más adelante, la región 18 que se expande aguas abajo mantiene las partículas concentradas en las líneas de corriente de concentración al tiempo que potencia su espaciamiento lateral (Xeq).
- Haciendo aún referencia a la FIG. 1, una pluralidad de salidas 20 se conecta a la región 18 que se expande aguas abajo. Cada salida 20 puede ser un canal de salida que se abre en un extremo en la región 18 que se expande. Se ilustran cinco (5) de tales salidas 20 aunque pueden usarse más o menos. Se muestra que cada salida 20 incluye un limitador fluídico 22 que se ilustra gráficamente en la FIG. 1. El limitador fluídico 22 puede formarse a partir de una estructura o estructuras que restringen el flujo en las salidas 20. Como ejemplo, el limitador de flujo es el canal serpentín 24 que tiene una pluralidad de curvas, tal como se ilustra en la FIG. 2A. Por ejemplo, un limitador fluídico
- 30 22 puede tener veinte de dichas curvas para una longitud total de varios centímetros. El número de curvas puede usarse para ajustar o calibrar la resistencia del limitador fluídico 22. Por ejemplo, como se aprecia en la FIG. 2A, el limitador fluídico 22b intermedia tiene una resistencia que es ½ de la de los limitadores fluídicos 22a, 22c externos. Como otro ejemplo, el limitador de flujo puede ser un canal con un diámetro reducido o incluso un canal que contiene una o más estructuras configuradas para reducir el flujo allí. En otro modo de realización, el limitador 35 fluídico 22 no es cualquier clase de estructura en la salida 20 sino que en su lugar es una presión aplicada o creada
- en las salidas 20.

Por ejemplo, la FIG. 2B ilustra un modo de realización de un sistema 10 de clasificación de partículas que usa un controlador de presión 23 que se acopla a cada salida 20. El controlador de presión 23 incluye líneas 25 de fluidos
distintas conectadas a cada salida 20. El controlador de presión 23 se configura de modo que puede aplicar selectivamente diferentes presiones a las diversas salidas 20. A este respecto, el controlador de presión 23 puede calibrar las resistencias relativas fluídicas de las salidas 20. En este modo de realización, no hay necesidad de canales serpentín para crear la resistencia fluídica. Esta funcionalidad se transfiere al controlador de presión 23. Además, las diversas resistencias fluídicas pueden ajustarse o calibrarse dinámicamente por medio del controlador
45 de presión 23. El sistema 10 de clasificación de partículas puede así volver a configurarse sin tener que hacer ningún cambio físico al sistema 10 de clasificación de partículas.

Cada limitador fluídico 22 puede tener una resistencia fluídica idéntica o diferente dependiendo de la naturaleza de las partículas clasificadas en el sistema 10 de clasificación de partículas. El limitador fluídico 22 en cada salida 20 puede diseñarse o "calibrarse" específicamente para capturar fracciones enriquecidas de partículas que tienen una forma o formas particulares de partículas. En el caso en que se use la presión como el limitador fluídico 22, el flujo relativo a través de las diversas salidas 20 puede controlarse ajustando por separado la presión en las respectivas salidas 20 en partes definidas. La FIG. 1 ilustra cinco (5) limitadores fluídicos 22 (L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub>), aunque pueden usarse más o menos. Además, en algunos modos de realización, puede haber una o más salidas 20 que no tengan

55 ningún limitador fluídico 22 en el mismo o aplicado a ello (en el caso de que la presión sea el limitador fluídico 22). Como se aprecia en las FIGS. 1 y 2, tras cada limitador fluídico 22, hay una respectiva salida 26 (indicada 1, 2, 3, 4, y 5 en la FIG. 1).

La FIG. 3 ilustra una vista lateral de una parte del sistema 10 de clasificación de partículas. El sistema 10 de 60 clasificación de partículas se acopla por la entrada 12 a una fuente 30 de partículas con formas diferentes que se

configura para la introducción continua en la entrada 12. La FIG. 3 ilustra partículas en forma de células 32. La fuente 30 contiene células 32 que tienen una forma circular, una forma de vara, y una forma irregular en esta ilustración aunque se contemplan otros tipos de partículas y formas. La FIG. 3 ilustra una jeringa como la fuente 30 de diferentes partículas con formas diferentes que se pueden usar para inyectar continuamente células 32 en el

- 5 sistema 10 de clasificación de partículas. Como se usa en la presente memoria, la introducción continua significa que las partículas se inyectan durante un periodo prolongado de tiempo en lugar de un único proceso de flujo por lotes. La jeringa (o múltiples jeringas) pueden acoplarse a una bomba de jeringa usada habitualmente para bombear un fluido que contiene las células 32 a través del sistema 10 de clasificación de partículas. Las partículas se transportan por un fluido portador (normalmente un líquido), que también se inyecta en la entrada 12. El sistema 10
- 10 de clasificación de partículas puede trabajar sobre un amplio intervalo de caudales. Como se explica a continuación, se observaron las diferencias basadas en la forma en la posición de concentración en caudales en el intervalo de 20 µl/min a 110 µl/min, no obstante, el límite superior estaba limitado por la fuerza de adhesión del dispositivo en lugar del propio fenómeno fluídico. De este modo, se espera que los caudales fuera de este intervalo particular también trabajen.
- 15

Si bien una jeringa se ilustra en la FIG. 3 como bombeo, la fuente de 30 partículas con formas diferentes a través del sistema 10 de partículas de clasificación otra presión o dispositivos de administración basados en flujo usados en relación con los dispositivos microfluídicos pueden usarse para fluir continuamente partículas a través del sistema 10 de clasificación de partículas. En un aspecto, el fluido que contiene partículas con diferentes tamaños o formas se

- 20 bombean continuamente a través del sistema 10 de clasificación de partículas. El caudal de partículas a través del sistema 10 de clasificación de partículas puede ajustarse para efectuar un enriquecimiento y recogida diferentes de partículas con formas diferentes. Los caudales pueden variar por la velocidad a la que se hace fluir el fluido a través del sistema, geometrías de canal, y las relaciones variadas de resistencia del fluido. En términos más generales, las condiciones pueden modificarse para alterar el número de Reynolds.
- 25

Para usar el sistema 10 de clasificación de partículas, la fuente 30 de partículas con formas diferentes se introduce continuamente en la entrada 12 usando una técnica de presión o flujo como se discute en la presente memoria. Las formas de las partículas pueden incluir cualquier número de diferentes formas incluyendo partículas circulares, similares a una vara, con forma oblonga, con forma elíptica, con forma irregular. Con referencia a la FIG. 1, en la

- 30 ubicación A del sistema 10 de clasificación de partículas, las partículas con formas diferentes se distribuyen aleatoriamente a través del microcanal 14 de concentración inercial. Después de fluir a lo largo de la mayoría del microcanal 14 de concentración inercial (p. ej., en torno a 4 cm en la ubicación B), las partículas con formas diferentes se concentran en diferentes ubicaciones o corrientes dentro del microcanal 14 de concentración inercial.
- 35 Cada corriente tiene una cantidad particular de partículas enriquecidas con una forma particular. Estas corrientes se les proporciona luego una separación lateral adicional por la región 18 que se expande aguas abajo en la que se recogen en las salidas 20. Las diferentes resistencias en los limitadores fluídicos 22 pueden usarse para recoger las diferentes fracciones enriquecidas de partículas. Además, las dimensiones del microcanal 14 de concentración inercial, así como el caudal de partículas a través del sistema 10 de clasificación de partículas o el número de 40 Reynolds pueden ajustarse para modificar el número y la posición de las corrientes separadas creadas en el
- dispositivo.

La FIG. 4A ilustra esquemáticamente un canal con forma rectangular, tal como el microcanal 14 de concentración inercial con un alta relación de aspecto (Al>An) en la que se introduce una distribución de partículas al azar en la entrada como se muestra. En los números de Reynolds (*R<sub>p</sub>*) con partículas moderadas (p. ej., las que están dentro del intervalo de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 4), se sabe que las partículas distribuidas al azar se concentran en dos regiones de equilibrio centradas en las caras del canal. La Fig. 4B ilustra una representación en sección transversal del microcanal 14 de concentración inercial en la región A de la FIG. 1. Como se aprecia en la Fig. 4B, las partículas con formas diversas se distribuyen al azar en el fluido. Las partículas se concentran por inercia

- 50 debido al efecto combinado de  $F_{L/P}$  (efecto de pared) y  $F_{L/C}$  (gradiente de cizallamiento). La FIG. 4C ilustra una representación en sección transversal del microcanal 14 de concentración inercial en la región B de la FIG. 1. Como se aprecia en la FIG. 4C, las partículas con formas diferentes alcanzan varias posiciones de equilibrio  $X_{eq}$  a lo largo de la anchura del microcanal 14 de concentración inercial. Como se aprecia en la FIG. 4C, las partículas con forma circular se ordenan más cerca de las paredes del microcanal 14 de concentración inercial mientras que las partículas
- 55 con forma alargada o con forma de vara se sitúan en líneas de corriente situadas más cerca del eje central del microcanal 14 de concentración inercial. Las partículas con forma de vara migran a una posición estable más cerca del eje central del canal que las partículas esféricas con el mismo volumen, y se alinean de manera tal que rotan "dan vueltas" periódicamente alrededor de un eje corto seguido de órbitas de Jeffery, y son empujadas de la pared del canal. Similar a las observaciones señaladas anteriormente, las partículas que tienen diámetros rotacionales
- 60 superiores (Dmax) tenderán a recogerse en líneas de corriente situadas cerca del eje central del canal (con referencia

al microcanal 14 de concentración inercial) mientras que las partículas que tienen diámetros rotacionales inferiores tenderán a recogerse en líneas de corriente situadas lateralmente alejadas del eje central del canal. De este modo, las salidas pueden situarse de manera selectiva lateralmente con respecto al microcanal 14 de concentración inercial para capturar selectivamente subpoblaciones de partículas con diferentes diámetros rotacionales.

5

La FIG. 4D ilustra las relaciones de aspecto y dimensiones de diversas partículas que tienen diferentes tamaños y formas que fluyen a través del sistema de clasificación de partículas. La Fig. 4E ilustra una imagen microscópica tomada de las partículas capturadas en la entrada. La FIG. 4F ilustra una imagen microscópica tomada de las partículas capturadas en la salida. La barra de escala en las FIG. 4E y 4F es de 10 µm. Las diversas partículas con

- 10 forma esférica o con forma de vara se formaron a partir de perlas. Las perlas esféricas de 3 y 6 μm (Polyscience) se alargaron a varas con diferentes relaciones de aspecto (*R* = 1:3 y 1:5), siguiendo el protocolo previamente publicado por Champion *et al*. Véase Champion *et al.*, *Role of target geometry in phagocytosis, Proc. Natl. Acad. Sci.* EE. UU. 103(13): 4930-4934 (2006). Las perlas se suspendieron en agua a 75 °C poli(alcohol vinílico) (PAV) soluble en agua caliente a una concentración final de 10 % en p/vol., 5 % en peso/vol. de glicerol, y 0,08 % en peso/vol. de
- 15 partículas de poliestireno esféricas). Esta solución se extendió y se secó durante la noche sobre una superficie plana de 19 x 27 cm. Las películas se alargaron entonces en aceite mineral a 120 °C y se secaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Para recuperar las partículas con forma de vara, las películas se lavaron con isopropanol y se disolvieron en 30 % de isopropanol/agua a 75 °C. Las partículas se lavaron finalmente ocho veces, cada vez con cantidades decrecientes de isopropanol, con el fin de eliminar todo el PAV de la superficie de las partículas.
- 20 Suspensiones de partículas se inyectaron en dispositivos ensayados a una concentración máxima de 1x10<sup>6</sup> perlas/ml, usando una bomba de jeringa (Harvard Apparatus PHD 2000) y una jeringa de vidrio (Hamilton), en caudales Q que oscilan entre 20 y 110 μl/min.

Las partículas con formas diferentes, después de haberse ordenado en diferentes posiciones de equilibrio X<sub>eq</sub>, a
 continuación, entran en la región 18 que se expande aguas abajo lo que mejora las diferencias X<sub>eq</sub> entre las partículas que aún mantienen las partículas en las respectivas líneas de corriente concentradas. Las partículas se capturan luego en los diversos canales de salida 20. Como se explica anteriormente, las resistencias de los limitadores fluídicos 22 pueden ajustarse para calibrar la fracción de partículas que se recogió en cada salida 20. Esto se realiza calibrando la relación de las resistencias fluídicas de las salidas 20. Esto puede ser expresado por α
 que representa la relación de los caudales de salida (Q) de un canal de salida en particular (α<sub>1:2</sub> = Q<sub>salida n.º 1</sub>/Q<sub>salida n.º</sub>

30 que representa la relación de los caudales de salida (Q) de un canal de salida en particular ( $\alpha_{1:2} = Q_{salida n. \circ 1}/Q_{salida n.}$ 2), que se relaciona directamente con la relación de las resistencias fluídicas de salida ( $\alpha_{1:2} = R_1/R_2$ ).

En un modo de realización de la invención, las partículas que se han analizado a través del sistema 10 de clasificación de partículas y se han recogido en las salidas 26 pueden analizarse a través del sistema 10 de 35 clasificación de partículas una o más veces adicionales para concentrar o enriquecer aún más una fracción de partículas deseada. Por ejemplo, las partículas pueden analizarse en primer lugar a través del sistema de clasificación de partículas en un primer caudal (es decir, número de Reynolds) seguido de uno o más análisis a través del mismo dispositivo con un caudal diferente (es decir, número de Reynolds diferente). En otros modos de realización, las partículas pueden analizarse a través del sistema 10 de clasificación de partículas sólo una vez.

40

La forma representa uno de los factores más importantes para identificar específicamente una partícula. Entre otras especificaciones, la forma puede ser un marcador del estado del ciclo celular. Por ejemplo, las células eucariotas muestran cambios físicos en la forma que son dependientes del ciclo celular, tales como una evolución de una célula de levadura a partir de una esfera a un gemelo biesférico o un agregado mayor, dependiendo de su etapa del ciclo

- 45 celular. La forma es también un indicador del estado celular y puede convertirse en una indicación usada para el diagnóstico clínico. Por ejemplo, la forma de las células sanguíneas puede cambiar debido a numerosas condiciones clínicas, enfermedades y medicamentos, tales como el cambio de morfología de las células sanguíneas resultantes de infecciones parasitarias (p. ej., enfermedad de células falciformes, anemia, malaria). De este modo, la forma podría usarse como marcador específico en la separación de partículas microfluídicas y puede servir como base
- 50 para el fraccionamiento de partículas exentas de etiqueta. Alternativamente, partículas con tamaños diferentes, tales como parásitos u otros patógenos pueden eliminarse o extraerse de los fluidos corporales. La capacidad para concentrar de forma continua y separar las partículas en función de su forma tiene una amplia utilidad para diversas aplicaciones industriales, clínicas y de investigación. Incluso las partículas que tienen diferentes formas pero volúmenes similares pueden clasificarse.

55

Otra aplicación del sistema 10 de clasificación de partículas es el proceso basado en la forma de la extracción de una diana no esférica a partir de una muestra compleja con objetos esféricos, tales como agua contaminada, sangre, etc. La resistencia y estabilidad del cemento, por ejemplo, se vinculan críticamente a una forma y tamaño de partículas. La separación de micropartículas de cemento en fracciones puras se ve obstaculizada por las formas formas de las partículas que conducen e la obstrucción de las formas estabilidad.

60 irregulares de las partículas que conducen a la obstrucción de los filtros tradicionales. Un enfoque para la filtración

de partículas de tamaño muy definido sin filtros propensos a la obstrucción ayudaría en el desarrollo de formulaciones de cemento optimizadas - ahorro de costes de material para diversas aplicaciones de construcción.

El sistema 10 de clasificación de partículas también puede usarse para clasificar partículas que tienen diferentes 5 relaciones de alargamiento. El alargamiento de la forma celular también se ha identificado como un indicador del ciclo celular, ya que las células eucariotas y procariotas muestran cambios dependientes del ciclo físico. La comprensión de los ciclos celulares es sujeto de numerosos proyectos de investigación, que se realizan en gran medida usando células de levadura debido a su genética bien conocida y sus característicos cambios de forma durante la proliferación, p. ej., las células de levadura germinativas que evolucionan a partir de una esfera a un

- 10 gemelo biesférico o un agregado mayor. Otro ejemplo son las bacterias con forma de vara (por ejemplo, bacilos) que se vuelven más largos mientras mantienen la misma dimensión corta dependiendo de la etapa del ciclo celular. El enriquecimiento de las células en una cierta etapa del ciclo de vida puede evitar el ruido dependiente del ciclo celular, y ayudar a los microbiólogos en la sincronización de una población para comprender mejor la dinámica de población, los efectos ambientales que conducen a la desincronización, y la estocasticidad en el comportamiento de
- 15 una célula individual. Esta sincronización en fases del ciclo dadas se realiza en general (i) por métodos invasivos usando productos químicos (agentes metabólicos) que alteran la fisiología de la célula o usando un aumento de la temperatura, o (ii) por elutriación basada en tamaños, que aísla las células más pequeñas. Los métodos invasivos interfieren con el metabolismo de la célula y perturban el ciclo natural, mientras que la elutriación solo proporciona células jóvenes que aún no han iniciado la división activa. El sistema 10 de clasificación de partículas proporciona un aconte de activate de activate de activate de activación activa.
- 20 método continuo exento de fármacos y exento de etiqueta, no invasivo para la clasificación y sincronización de células de levadura basadas en su forma.

Más generalmente, la concentración inercial de partículas no esféricas es de interés para diversas áreas de investigación. Existen numerosas partículas con forma arbitraria ampliamente estudiadas en biología y 25 procesamiento industrial que serían importantes hacer hincapié con fines de recuento y análisis. Se ha demostrado recientemente que la desviación de estas partículas de la simetría esférica da lugar a un aumento considerable de la incertidumbre de la impedancia que necesita ser considerada durante la interpretación de las mediciones eléctricas de la forma. Del mismo modo, en las mediciones ópticas de partículas basadas en el tamaño, tales como mediciones de dispersión, la forma puede ser difícil de determinar. El alineamiento preciso de partículas formadas por 30 concentración inercial, y especialmente la previsibilidad de su orientación, contribuiría a abordar este tipo de incertidumbre y producir mediciones más fiables.

Otra aplicación del sistema 10 de clasificación de partículas es el alineamiento fluídico de partículas con códigos de barras. Las partículas con códigos de barras se fabrican usando litografía de flujo de parada y se usan para ensayos 35 bioquímicos multiplexados y de alta producción. Estas partículas aún se limitan a pocas aplicaciones de investigación, debido al requerimiento de su alineamiento por el flujo envolvente o carriles de guía activos que complica su integración en microsistemas. Los efectos inerciales pueden permitir un control preciso del alineamiento y concentración de partículas con códigos de barras para la lectura óptica de sus patrones. Al eliminar la necesidad del flujo envolvente, junto con la posibilidad de trabajar con altos caudales, esto puede aumentar en gran medida la 40 producción de bioensayos basados en partículas a través de la alta paralelización del sistema de concentración

integrado con una detección óptica de campo amplio.

Otra aplicación potencial es la clasificación de microalgas antes de la citometría para la identificación más eficaz de los microorganismos marinos en agua. El fitoplancton posee una gran variedad de formas y tamaños; los objetos no 45 esféricos rotan y se trasladan verticalmente en un patrón oscilatorio en el canal y dependen de su ángulo inicial, las células con la misma longitud pueden pasar a través de la región de interrogación en diferentes ángulos, causando diferentes señales de dispersión. El sistema 10 de clasificación de partículas también puede usarse como un proceso original y pasivo de control de calidad para la fabricación de micropartículas, por ejemplo para la eliminación selectiva de agregados de partículas sintetizadas, en función de su relación de aspecto.

## Parte experimental

Para investigar el efecto de las diferencias de forma en las posiciones de concentración inercial, se llevó a cabo un estudio sistemático usando un sistema de clasificación de partículas que tiene diversas anchuras de canal (25, 30 y 55 35 µm) y un canal de concentración inercial de 4 cm de longitud. Se ensayó un amplio intervalo de caudales (20 a 110 µl/min) y X<sub>eq</sub> se evaluó para cada una de estas condiciones. X<sub>eq</sub> es la posición de equilibrio medio de las partículas, estimada por la medición de la distancia entre el centro de las partículas y la pared del canal (0 % o 50 % indica, respectivamente, que el centro de partícula se sitúa en la pared del canal (0 %) o el centro de canal (50 %)), con más de 100 puntos de datos para cada condición. La FIG. 5A ilustra histogramas representados para ilustrar la

60 variación de la distribución de partículas con formas diversas (esferas, vara con relación de aspecto 3:1, y vara con

relación de aspecto 5:1) obtenida en diferentes números de Reynolds (recuadro) en diferentes geometrías de canal. El histograma A de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 35  $\mu$ m y un caudal de 20  $\mu$ l/min. El histograma B de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 35  $\mu$ m y un caudal de 110  $\mu$ l/min. El histograma D de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 30  $\mu$ m y un caudal de 100  $\mu$ l/min. El histograma D de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 30  $\mu$ m y un

- 5 caudal de 30 μl/min. El histograma E de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 30 μm y un caudal de 40 μl/min. El histograma G de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 25 μm y un caudal de 20 μl/min. El histograma H de la FIG. 5A se preparó a partir de un canal que tenía una anchura de 25 μm y un caudal de 50 μl/min.
- 10 La FIG. 5B ilustra la media representada para las tres geometrías de canal y las condiciones de flujo ensayadas. El gráfico C de la FIG. 5B se preparó a partir un dispositivo que tenía una anchura de canal de 35 μm. El gráfico F de la FIG. 5B se preparó a partir un dispositivo que tenía una anchura de canal de 30 μm. El gráfico I de la FIG. 5B se preparó a partir un dispositivo que tenía una anchura de canal de 30 μm. El gráfico I de la FIG. 5B se preparó a partir un dispositivo que tenía una anchura de canal de 30 μm. El gráfico I de la FIG. 5B se preparó a partir un dispositivo que tenía una anchura de canal de 25 μm. Las barras de error indican la desviación estándar obtenida de al menos 100 mediciones. El canal y la anchura de canal influyen en gran medida en la 15 posición de equilibrio de las partículas con formas.
- 15 posición de equilibrio de las particulas con formas.

En el canal con una anchura de 35  $\mu$ m (con una relación de aspecto del canal más cercana a 1), con números de Reynolds superiores a 10 ( $Re = 13 \text{ o } 20 \mu$ l/min), los efectos inerciales comienzan a concentrar las partículas tanto con forma esférica como con de vara. Las partículas Inicialmente distribuidas al azar con varias formas migran hacia

- 20 el eje central del canal y lo más importante, las partículas con formas diferentes muestran patrones de frecuencia muy diferentes de la posición de la partícula. Las esferas comenzaron a concentrarse y ocupar cuatro posiciones concentradas con precisión, mientras que las varas se extienden más en gran parte a lo largo de la anchura del canal. A medida que la inercia del fluido aumenta aún más (*Re* = 72 o 110 µl/min), los diferentes tipos de partículas migran más claramente unos de otros. Las partículas esféricas son las más cercanas a las paredes, mientras que la 25 distancia desde cada pared aumenta para las relaciones de aspecto más altas de las partículas.
  - La disminución de la anchura del canal de 35 a 30  $\mu$ m cambia la relación de aspecto de la sección transversal del canal, que conduce a la migración a sólo dos (2) posiciones de equilibrio distintas. En 30  $\mu$ l/min (*Re* = 21), las varas 1:5 se separan inicialmente a partir de esferas y las varas 1:3. Para caracterizar la posibilidad de separación, se
- 30 definió un factor de separabilidad (FS<sub>Tipo1-Tipo2</sub>) que se calcula como la diferencia en las posiciones concentradas media entre dos tipos de partículas, normalizado por la media de sus desviaciones estándar, como se muestra por la ec. (1) siguiente:

$$FS_{a/b} = \frac{|X_a - X_b|}{\text{media}\left(DE_a, DE_b\right)}$$

100 100 1

(1)

- 35 La FIG. 6A ilustra en imagen A del panel un ajuste gaussiano representativo del recuento de partículas normalizado (%) como una función de X<sub>eq</sub> para las partículas esféricas y de vara 1:5. La imagen B de la FIG. 6A ilustra un ajuste gaussiano de dos gráficas de un factor de separabilidad de 1. La imagen C de la FIG. 6A ilustra un ajuste gaussiano de dos gráficas de un factor de separabilidad de 2. Cuando la anchura del canal se redujo a 30 μm y un caudal de 30 μl/min (*Re* = 21), se midió el siguiente factor de separabilidad: S<sub>Esferas /varas 1:3</sub> = 0,24, S<sub>varas1:3/varas1:5</sub> = 2,26.
- 40

Como Q se incrementó a 40 µl/min (Re = 28), ambas familias de varas emigraron alejadas de las esferas y unas de otras, haciendo posible la posible separación basada en la forma;  $S_{Esferas/Varas1:3} = 0.85$ ,  $S_{Varas1:3/Varas1:5} = 1,46$ . Como Re se aumentó aún más (Re = 49 o 70 µl/min), las varas tendieron a moverse más cerca de las paredes en las que se sitúan las esferas, reduciendo la brecha entre las posiciones de concentración;  $S_{Esferas/Varas1:3} = 1,05$ ,

- 45 Svaras1:3IVaras1:5 = 0,61. La disminución de la anchura del canal además a 25 μm hace difícil concentrar todas las partículas. De hecho, incluso en Re = 37 (50 μl/min), las varas 1:5 aún no están concentradas en una línea de corriente única. Este resultado se debe también en parte debido al hecho de que especialmente con varas de mayor tamaño (relación de aspecto 5:1), este canal estrecho se obstruye con frecuencia. Estos resultados sugieren claramente que existen condiciones óptimas que maximizan la distancia entre las posiciones de partículas y
- 50 permiten una separación de partículas más eficiente. La FIG. 6B ilustra el factor de separabilidad obtenido para el canal con una anchura de 25 μm (imagen D), el canal con una anchura de 30 μm (imagen E), y el canal con una anchura de 35 μm (imagen F) en diversos caudales.
- Asimismo se llevaron a cabo experimentos de separación basados en la forma usando el sistema de clasificación de 55 partículas. Una mezcla de esferas y varas se inyectó en diferentes caudales para diferentes diseños de salida. Las fracciones de las partículas recogidas de cada salida se analizó y la separación se caracterizó usando tres (3) parámetros definidos para un tipo de partícula *a* y una salida *i*;

$$RE = \frac{N_a(\text{salida}_i)}{N_a \text{ (entrada)}}, PE = \frac{N_a(\text{salida}_i)}{N_{tot}(\text{salida}_i)}, RdE = \frac{N_a(\text{salida}_i)/N_{tot}(\text{salida}_i)}{N_a(\text{entrada})/N_{tot}(\text{entrada})}$$
(2)

El rendimiento de extracción (*RE*) ilustra el reparto de salida de un tipo de partícula dado, la pureza de extracción Pureza (*PE*) ilustra la composición de partículas de una salida dada, y la relación de enriquecimiento (*RdE*) define la 5 proporción de partículas a en la salida i en comparación con su proporción en la entrada. Las FIGS. 7A-7C ilustran tres configuraciones diferentes de un sistema de clasificación de partículas que no forma parte de la presente invención que se ensayó. El dispositivo ilustrado en la FIG. 7A usa un microcanal de concentración inercial que tiene una anchura de 25 µm con una relación de aspecto del canal (*RAc*) de 0,53, con cinco resistencias fluídicas idénticas para cada salida. El caudal usado fue de 40 µl/min. El dispositivo ilustrado en la FIG. 7B usa un microcanal 10 de concentración inercial que tiene una relación de aspecto de canal (*RAc* = 0,64) y un caudal de 80 µl/min. Cinco

- salidas incluyen las siguientes resistencias:  $\alpha_{1:2} = 3/4$  y  $\alpha_{1:3} = \frac{1}{2}$ . El dispositivo ilustrado en la FIG. 7C usa un microcanal de concentración inercial que tiene una relación de aspecto de canal de (RAc = 0.64) y un caudal de 70 µl/min. Se usaron siete salidas que incluyen las siguientes resistencias:  $\alpha_{1:2} = 3/4$ ,  $\alpha_{1:3} = \frac{1}{2}$ .  $\alpha_{1:3} = \frac{1}{2}$ ,  $\alpha_{1:3} = \frac{1}{2}$ ,  $\alpha_{1:4} = \frac{1}{4}$ . Los diferentes diseños de salida (con diferentes resistencias) en los dispositivos ilustrados en la FIG. 7A proporcionan una variedad 15 de partes de captura relativas de fluido en las diferentes salidas. Al calibrar estos parámetros del dispositivo, se
- demostró un intervalo de posibles separaciones entre las esferas, varas 1:3 y varas 1:5.

La FIG. 7D ilustra una instantánea micrográfica del área entre las salidas 1 y 2 que muestra la mayoría de las esferas y varas 1:3 procedentes de la salida 1, mientras que las varas 1:5 se capturan en su mayoría en la salida 2.
20 *RdE, RE* y *PE* de diferentes partículas en cada salida del dispositivo de la FIG. 7A se muestran a continuación en las FIGS. 7G y 7J. La FIG. 7E ilustra una instantánea micrográfica del área entre las salidas 4 y 5. *RdE, RE* y *PE* de diferentes partículas en cada salida del dispositivo de la FIG. 7B se muestran a continuación en las FIGS. 7G y 7J. La FIG. 7E ilustra una instantánea micrográfica del área entre las salidas 4 y 5. *RdE, RE* y *PE* de diferentes partículas en cada salida del dispositivo de la FIG. 7B se muestran a continuación en las FIGS. 7H y 7K. La FIG. 7F ilustra una instantánea micrográfica del área en torno a la salida 5. RdE, *RE* y *PE* de diferentes partículas en cada salida del dispositivo de la FIG. 7C se muestran a continuación en las FIGS. 7I y 7L.

25

De acuerdo con las mediciones del *FS* para estas condiciones de flujo (*FS*<sub>varas1:3/varas1 5</sub> = 1,9, *FS*<sub>Esferas /Varas1:5</sub> = 2,4, mientras que *FS*<sub>Esferas/Varas1:3</sub> = 0,5), en el dispositivo de la FIG. 7A, no se encontraron varas 1:5 que tengan un alto rendimiento de extracción en las salidas 2 y 4 (86 % de varas 1:5) con hasta una pureza del 90 %, en comparación con varas 1:3 barras y esferas que se recogieron principalmente en las salidas 1 y 5 (83 % de todas las esferas y

- 30 70 % de las varas 1:3 inyectadas). Para lograr otro escenario de separación y con un mayor caudal, las condiciones experimentales se calibraron a una relación de aspecto de anchura de canal de 0,64, y un caudal de 80 µl/min en el dispositivo de la FIG. 7B y se modificó la relación de la resistencia fluídica entre las diferentes salidas ( $\alpha_{1:2} = 3/4$ ,  $\alpha_{1:3} = 1/2$ ). Contrariamente a antes, se consiguió un excelente rendimiento de extracción para partículas esféricas (85 % de todas las esferas se encuentran en las salidas 1 y 5), mientras que ambos tipos de varas permanecen juntas
- 35 (90 % de todas las varas se extraen en las salidas 2 y 4), dando lugar a una pureza de extracción del 96 % para las esferas (FIGS. 7H y 7K). Estos resultados están de acuerdo con los valores de FS, ya que FS<sub>Esferas/Varas1:3</sub> aumentó de 0,5 a 1, mientras que FS<sub>Esferas1:3/Varas1:5</sub> inicialmente en 1,9 se redujo a 0,6 para estas condiciones. La disminución del caudal a 60 μl/min en un canal de 30 μm (RAc = 0,64) usando el dispositivo ilustrado en la FIG. 7C permite la separación de los tres tipos de partículas mientras que disminuye ligeramente la pureza de esferas, como se predice
- 40 por las mediciones del FS (FSEsferas/Varas1:3 se mantiene en 1, pero FSVaras1:3/Varas1:5 aumenta de 0,6 a 1,3). La presencia de siete (7) salidas en este dispositivo proporciona una separación más precisa entre las líneas de corriente (α1:2 = 3/4, α1:3 = 1/2, α1:4 = 1/4). De hecho, el 88 % de las esferas se aislaron en las salidas 2 y 6 con una pureza del 87 %, 49 % de varas 1:5 en la salida 4 con una pureza del 78 %, y un dato aún más relevante el 77 % de varas 1:3 con una pureza de hasta el 80 % (FIGS. 7I y 7L).
- 45

La separación basada en la forma Inercial es posible para un amplio intervalo de tamaños de partículas. La separación de esferas de 3  $\mu$ m y elipsoides derivados de 3  $\mu$ m se confirmó experimentalmente mediante la aplicación del mismo concepto que se usó para la separación de perlas de 6  $\mu$ m con parámetros ligeramente modificados. Usando el sistema de clasificación de partículas de la FIG. 8A, que no forma parte de la presente

- 50 invención, las esferas se recogieron en las salidas 1 y 5 con un rendimiento (*RE*) del 90 % como se aprecia en la FIG. 8B y una pureza (*PE*) de hasta el 90 % como se aprecia en la FIG. 8C. Con respecto a varas 3:1, se alcanzó un rendimiento (*RE*) del 81 % en las salidas 2, 3 y 4 como se aprecia en la FIG. 8B y se consiguió un rendimiento del 97 % de varas 5:1 en las salidas 2, 3 y 4 con una pureza (*PE*) de hasta el 88 % como se aprecia en la FIG. 8D ilustra la relación de enriquecimiento (RdE) para las tres formas. Para la concentración por inercia de
- 55 partículas menores de 2 µm, se requieren caudales y presiones más altos que necesitan materiales con fuerzas de adherencia superiores, tales como poliéster termoestable (PTE). La posibilidad de separar perlas de 3 µm abre un nuevo intervalo de aplicaciones en la separación de las bacterias para sincronizar las poblaciones en diferentes

etapas de crecimiento celular, en las que por ejemplo, las bacterias con forma de vara pueden tener hasta el doble de su longitud.

La separación basada en la forma usando efectos inerciales también puede usarse para la clasificación de células 5 de levadura y la sincronización del ciclo celular. La comprensión del ciclo celular es el sujeto de la investigación actual, que a menudo explora el uso de células de levadura (*S. Cerevisiae*) debido a la genética bien conocida y a los cambios de forma característicos); las células de levadura germinativas se alargan a partir de una esfera a un gemelo biesférico o a un agregado mayor. Usando el sistema de clasificación de partículas de la FIG. 7C (*RAc* = 0,64, siete salidas con  $\alpha_{1:2}$  = 3/4,  $\alpha_{1:3}$  = 1/2,  $\alpha_{1:4}$  = 1/4), la clasificación de levaduras se llevó a cabo a un caudal de 60

- 10 µl/min. La levadura se cultivó en caldo de soja tríptico (CST) en un agitador incubado (37 °C) durante un día antes del experimento de separación. La suspensión se cultivó se diluyó en TFS a una concentración no limitante de 1,5x10<sup>6</sup> células/ml y luego, de manera similar a las perlas, se inyectó a diversos caudales usando una bomba de jeringa Harvard Apparatus y una jeringa de vidrio Hamilton. El comportamiento de separación se capturó a través de la formación de imágenes a alta velocidad, siendo el contenido de cada salida analizado mediante el recuento
- 15 inmediato con un hemocitómetro (Quick-Read). Se observaron las morfologías de las células de levadura y se categorizaron, en función de su estado de ciclo, en (i) individuales pequeñas que no se dividen, (II) individuales grandes, (iii) levadura germinativa, (IV) como dobletes, y (v) agregados que se componen de tres o más células.

La FIG. 9A ilustra una imagen microscópica de las células en la entrada del dispositivo. Las células se categorizan 20 en cinco grupos: individuales pequeñas (recuadro superior), individuales grandes (segundo a partir del recuadro superior), germinativas (tercero a partir del recuadro superior), como dobletes (cuarto a partir del recuadro superior) y agregados (último recuadro). La FIG. 9B ilustra imágenes respectivas de la salida 2 y la salida 3. Las individuales tenían un alto rendimiento de extracción en la salida 2, mientras que en la salida 3, la pureza de las células germinativas aumentó.

### 25

Se descubrió que las individuales que no se dividen tenían un alto rendimiento de extracción en las salidas 2 y 6 (90 % de las individuales pequeñas y 91 % de las individuales grandes se recuperan en estas salidas como se aprecia en la FIG. 9C), con una pureza de hasta el 94 % (FIG. 9D), mientras que las células de levadura germinativas se recogieron principalmente en las salidas 3 y 5 (54 % de levadura germinativa, con una pureza de

30 hasta el 31 %, en comparación con una pureza del 6,6 % en la entrada). La mayor producción del sistema de clasificación de partículas (60 µl/min, es decir, 1.500 células/s en comparación con 100 células/s) se podría aumentar aún más por la paralelización de los canales de concentración, mientras que la pureza y enriquecimiento especialmente necesarios para esta aplicación de sincronización mejora con la conexión en cascada de varios dispositivos en serie.

#### 35

En los experimentos se descubrió que un sistema de clasificación de partículas con RAc = 0.53 (An = 25 µm, Al = 47 µm) en Q = 40 µl/min que tiene cinco (5) salidas con resistencias iguales es el mejor dispositivo para separar varas largas (1:5) de 6 µm a partir de esferas y varas cortas (1:3), mientras que la separación de esferas de 6 µm de los dos tipos de varas se realiza mejor usando RAc = 0.64 (An = 30 µm, Al = 47 µm) en Q = 80 µl/min con cinco (5)

- 40 salidas con  $\alpha_{1:2}$  = 3/4 y  $\alpha_{1:3}$  = 1/2. El mejor dispositivo para la separación de los tres tipos de partículas de 6 µm era *RAc* = 0,64 (An = 30 µm, Al = 47 µm), en Q = 70 µl/min con siete (7) salidas con  $\alpha_{1:2}$  = 3/4,  $\alpha_{1:3}$  = 1/2,  $\alpha_{1:4}$  = 1/4. Para esferas de partículas de 3 µm podría separarse mejor de los dos tipos de varas con *RAc* = 0,53 (An = 25 µm, Al = 47 µm) del dispositivo en Q = 80 µl/min con cinco (5) salidas con  $\alpha_{1:2}$  = % y  $\alpha_{1:3}$  = 1/2. El enriquecimiento de la levadura germinativa de la población total de células fue exitoso usando un dispositivo con *RAc* = 0,64 (An = 30 µm, Al = 47 µm)
- 45  $\mu$ m) con siete (7) salidas con  $\alpha_{1:2}$  = 3/4,  $\alpha_{1,3}$  = 1/2,  $\alpha_{1:4}$  = 1/2. Las condiciones pueden ser optimizadas para otros modos de separación deseados, tales como el enriquecimiento de individuales, etc.

### REIVINDICACIONES

1. Un sistema de clasificación de partículas, que comprende:

5 una entrada;

un microcanal (14) de concentración inercial dispuesto en un sustrato y que tiene una región (18) que se expande aguas abajo en un extremo distal, en donde la entrada (12) se conecta a un extremo aguas arriba del microcanal:

una fuente (30) de partículas con formas diferentes conectada a la entrada, en la que la fuente de partículas con formas diferentes se configuran para su introducción continua en la entrada; 10

una pluralidad de salidas (20) conectada al microcanal en la región que se expande aguas abajo; caracterizado porque el sistema comprende además un controlador de presión conectado a la pluralidad de salidas por las líneas de fluidos, en donde el controlador de presión (23) ejerce presiones variables para ajustar la resistencia respectiva del fluido en la pluralidad de

15 salidas.

> 2. El sistema de la reivindicación 1, en donde las partículas comprenden células.

3 El sistema de la reivindicación 1, en donde el caudal de la fuente de partículas con formas diferentes 20 es ajustable.

El sistema de la reivindicación 1, en donde la región que se expande aguas abajo comprende paredes 4. opuestas (19) que forman un ángulo que aumenta progresivamente hacia el exterior en la dirección de flujo del fluido.

25

El sistema de la reivindicación 4, en donde las paredes opuestas forman un ángulo que aumenta 5. progresivamente hacia el exterior, es decir, un ángulo de 2° por 100 µm de movimiento en la dirección de flujo del fluido.

30 6. Un método de clasificación de partículas con formas diferentes en suspensión en un fluido de muestra, que comprende:

hacer fluir el fluido de muestra que contiene partículas con formas diferentes en suspensión a través de un sistema (10) de clasificación de partículas, que comprende:

35

40

un microcanal (14) de concentración inercial dispuesto en un sustrato y que tiene una región (18) que se expande aguas abajo en un extremo distal,

una pluralidad de salidas (20) acoplada a la región que se expande aguas abajo, recoger el fluido en cada una de las pluralidades de salidas, en la que al menos una de las salidas contiene un fluido enriquecido en al menos una forma de partículas en comparación con el fluido de muestra caracterizado porque dicho sistema

de clasificación de partículas comprende además un controlador de presión (23) conectado a la pluralidad de salidas por las líneas de fluidos, en donde el controlador de presión ejerce presiones variables para ajustar la resistencia respectiva del fluido en la pluralidad de salidas.

45 7. El método de la reivindicación 6, en donde las partículas comprenden células.

8. El método de la reivindicación 6, en donde el caudal del fluido de muestra es variable.

El método de la reivindicación 6, en donde al menos un determinado número de partículas con formas 9 50 diferentes que se clasifican tienen esencialmente el mismo volumen.

El método de la reivindicación 6, en donde al menos un determinado número de partículas con formas 10. diferentes que se clasifican tienen un perfil similar en sección transversal en una dimensión, pero un perfil diferente en sección transversal en otra dimensión.

55

11. El método de la reivindicación 6, que comprende hacer fluir el fluido de muestra que contiene partículas con formas diferentes en suspensión a través de un sistema de clasificación de partículas en un primer número de Reynolds y posteriormente hacer fluir el fluido de muestra recogido que contiene partículas con formas diferentes en suspensión a través de un sistema de clasificación de partículas en un segundo número de Reynolds

60 diferente del primer número de Reynolds.

12. El método de la reivindicación 6, en donde la pluralidad de salidas incluye al menos una salida situada en un eje central del microcanal de concentración inercial o adyacente a un eje central del microcanal de concentración inercial y al menos una salida situada lateralmente alejada del eje central del microcanal de concentración inercial, y en el que al menos una salida situada en un eje central del microcanal de concentración 5 inercial o adyacente a un eje central del microcanal de concentración inercial captura un subgrupo de partículas que tienen un diámetro rotacional superior al de otro subgrupo de partículas que tienen un diámetro rotacional inferior.

inercial o adyacente a un eje central del microcanal de concentración inercial captura un subgrupo de partículas que tienen un diámetro rotacional superior al de otro subgrupo de partículas que tienen un diámetro rotacional inferior, que se recogen en al menos una salida situada lateralmente alejada del eje central del microcanal de concentración inercial.





FIG. 2B



















21











