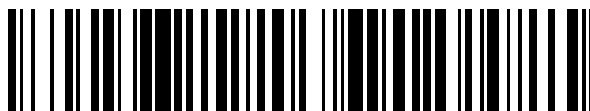


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 718 751**

51 Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.03.2016 PCT/EP2016/056637**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2016 WO16151107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.03.2016 E 16713384 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2019 EP 3274093**

54 Título: **Dispositivo de clasificación microfluídico**

30 Prioridad:

**24.03.2015 EP 15160580**

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

**04.07.2019**

73 Titular/es:

**EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY  
LABORATORY (100.0%)  
Meyerohofstrasse 1  
69117 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**MERTEN, CHRISTOPH;  
TSENG, QINGZONG;  
UTHARALA, RAMESH y  
FRESE, LUKAS**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 718 751 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

Dispositivo de clasificación microfluídico

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud de patente reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente europea N.º 15 160 580.5 presentada el 24 de marzo de 2015.

10 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo de clasificación.

15 **Antecedentes de la invención**

15 La clasificación de células activas se ha desarrollado hace casi cinco décadas (véase Fulwyler M.J. "Electronic separation of biological cells by volume," Science, Nov 12 1965; 150(3698):910-911). Los campos de uso de la clasificación de células activas han aumentado desde la primera publicación. Este aumento ha dado lugar a ventas anuales de productos de separación/aislamiento de células de 2 mil millones y medio de dólares en 2014 ([www.marketsandmarkets.com/PressReleases/cell-isolation.asp](http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/cell-isolation.asp), descargado el 25 de febrero de 2015).

20 Los clasificadores de células activadas por fluorescencia modernos tienen un rendimiento de varias 10000 células por segundo. Sin embargo, estos clasificadores de células son bastante caros (más de 200 000 dólares estadounidenses por dispositivo) y no son adecuados para la clasificación de cantidades muy pequeñas de material celular (por ejemplo, de biopsias de pacientes o de otras células primarias). Además, el tamaño de los objetos a clasificar es limitado. Por ejemplo, se requieren diferentes boquillas cuando se clasifican diferentes células u organismos multicelulares.

25 Los clasificadores microfluídicos celulares de la técnica anterior usan válvulas operadas neumáticamente, como se conoce de Abate AR, Agresti JJ, Weitz DA. Microfluidic sorting with high-speed single-layer membrane valves. Applied physics letters. May 17 2010; 96(20), Fu AY, Spence C, Scherer A, Arnold FH, Quake SR. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. Nat Biotechnol. Nov 1999; 17(11):1109-1111, and Fu AY, Chou HP, Spence C, Arnold FH, Quake SR. An integrated microfabricated cell sorter. Anal Chem. Jun 1 2002; 74(11):2451-2457.

30 El uso de estas válvulas operadas neumáticamente es bastante caro, ya que las unidades de control, incluidas las válvulas de solenoide macroscópicas, suelen costar alrededor de 25 000 dólares estadounidenses (por ejemplo, de Fluigent).

35 La patente de Estados Unidos 2007/0243627 A1 divulga un dispositivo microfluídico que comprende un canal; un sistema accionador que incluye células de Braille con accionadores, como pines, para enganchar las llamadas "porciones activas", por ejemplo, porciones de flujo, del dispositivo microfluídico; y detectores para la detección de células, por ejemplo, técnicas de citometría de flujo que usan dispositivos microfluídicos transparentes acopladas con el control de válvulas para el suministro a diferentes sitios de recogida para clasificar embriones y microorganismos, incluyendo bacterias, hongos, algas, levaduras, virus y células espermáticas. La patente de Estados Unidos 2007/0243627 A1 no divulga que las válvulas de Braille están ubicadas aguas abajo a una distancia de un nudo de clasificación; y que el dispositivo de análisis está montado en el nudo de clasificación.

40 **Sumario de la invención**

40 El dispositivo de clasificación descrito en el presente documento es un dispositivo independiente de bajo coste, que cuesta menos de 3500 dólares estadounidenses. El dispositivo de clasificación es capaz de clasificar muestras, como células, organismos multicelulares y gotitas microfluídicas. Este dispositivo de clasificación tiene muchos campos de aplicaciones, tal como per sin limitarse a, la separación celular de muestras de tejidos primarios (por ejemplo, de biopsias de pacientes, muestras de sangre, tejidos primarios) o la clasificación de células individuales dependiente del fenotipo para correlacionar fenotipos y genotipos de poblaciones heterogéneas.

45 El dispositivo de clasificación usa un visualizador de Braille para controlar una pluralidad de válvulas de Braille para clasificar las muestras en el dispositivo de clasificación. El uso de las válvulas de Braille es significativamente más barato (menos de 1000 dólares estadounidenses) y más compacto que las válvulas de la técnica anterior. Además, el uso de las válvulas de Braille permite el uso de chips microfluídicos de una sola capa para el dispositivo de clasificación.

50 Los visualizadores de Braille se han usado anteriormente para activar chips microfluídicos para el análisis celular (similar a un analizador FACS), véase Tung YC, Torisawa YS, Futai N, Takayama S. "Small volume low mechanical stress cytometry using computer-controlled Braille display microfluidics", Lab on a Chip. 2007; 7(11):1497-1503. El uso del visualizador de Braille para la clasificación de muestras como células, gotitas o embriones multicelulares no

se ha informado en la literatura.

El dispositivo de clasificación de este documento comprende un canal, que está adaptado para permitir el paso de una pluralidad de muestras en un fluido a un primer lado de un nudo de clasificación y una pluralidad de válvulas de Braille conectadas por una pluralidad de conectores al nudo de clasificación y situadas aguas abajo a una distancia del nudo de clasificación. El dispositivo de clasificación incluye además un dispositivo de formación de imágenes montado en el nudo de clasificación para obtener imágenes de algunas de la pluralidad de las muestras y adaptado para controlar algunas de la pluralidad de las válvulas de Braille dependiendo de las propiedades de las que se han obtenido imágenes de la pluralidad de las muestras.

El nudo de clasificación y la pluralidad de válvulas de Braille pueden ubicarse en dos chips diferentes conectados por tuberías. Esto permite un alto grado de flexibilidad, ya que uno de los chips microfluídicos puede reutilizarse mientras que el otro de los chips microfluídicos se cambia.

En un aspecto, el dispositivo de clasificación comprende además una placa microtituladora que tiene pocillos que están conectados de manera fluida a conexiones controlables por al menos una de las válvulas de Braille. Los pocillos recogen muestras similares de las muestras basándose en las propiedades de las muestras.

Al menos parte del dispositivo de clasificación puede estar hecho de un polímero compresible o expandible que permita que el canal se expanda para aceptar temporalmente más fluido si toda la pluralidad de válvulas de Braille están cerradas.

También se divulga un método para clasificar una pluralidad de muestras en un fluido en el canal. El método comprende hacer fluir el fluido con la pluralidad de muestras a lo largo del canal y analizar, en un nudo de clasificación, algunas de la pluralidad de muestras para generar una imagen de muestra. Las muestras se analizan para determinar al menos una propiedad de la muestra y una de la pluralidad de válvulas de Braille, ubicadas aguas abajo a una distancia del nudo de clasificación, se abre, por lo que la válvula abierta de la pluralidad de válvulas de Braille depende de las propiedades de la imagen muestreada. La apertura de la válvula de Braille permite que la muestra analizada entre en uno de una pluralidad de canales de recogida conectados con la válvula abierta de las válvulas de Braille. Los ejemplos del análisis incluyen, entre otros, imágenes o espectroscopia.

El método también permite la pausa del flujo del fluido durante la obtención de imágenes de la muestra. Esta pausa permite una mejor clasificación de las muestras, ya que la distorsión se reduce cuando, por ejemplo, se toman imágenes de las muestras para el análisis de las muestras.

### Descripción de las figuras

Las figuras 1A y 1B muestran un ejemplo del dispositivo de clasificación en una primera realización y en una segunda realización modificada.

La figura 2A muestra un ejemplo teórico del uso del dispositivo de clasificación.

La figura 2B muestra un ejemplo real del uso del dispositivo de clasificación.

La figura 3 muestra un ejemplo real de dispositivo de clasificación conectado a una placa microtituladora.

La figura 4 muestra un ejemplo del método.

La figura 5 muestra embriones de drosophila clasificados.

### Descripción detallada de la invención

La invención se describirá ahora sobre la base de los dibujos. Se entenderá que las realizaciones y los aspectos de la invención descritos en el presente documento son solo ejemplos y no limitan el alcance protector de las reivindicaciones de ninguna manera. La invención se define por las reivindicaciones y sus equivalentes. Se entenderá que las características de un aspecto o realización de la invención pueden combinarse con una característica de un aspecto o aspectos y/o realizaciones diferente(s) de la invención.

Se describe un dispositivo de clasificación microfluídico 10. El dispositivo de clasificación 10 es capaz de clasificar muestras que comprenden objetos, que tienen un intervalo de tamaño grande. Este intervalo de tamaño de los objetos puede ser de unos pocos micrómetros a varios cientos de micrómetros de diámetro. El dispositivo de clasificación 10 también es capaz de clasificar pequeñas cantidades de las muestras y, por lo tanto, puede usarse en la clasificación de células raras o en aplicaciones en las que solo se dispone de una pequeña cantidad de muestras. El dispositivo de clasificación 10 también permite la clasificación de gotitas microfluídicas, lo que permite la detección de anticuerpos y de otras (bio)moléculas, véase por ejemplo El Debs B, Utharala R, Balyasnikova IV, Griffiths AD, Merten CA. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. Proc Natl Acad Sci USA. Jul 17 2012; 109(29):11570-11575

La figura 1 muestra un primer aspecto del dispositivo de clasificación 10. Las muestras, que comprenden, por ejemplo, gotitas, células o incluso embriones multicelulares cuando los objetos se cargan a través de una primera entrada 30a y una segunda entrada 30b [CM1] [DRH2] en la primera sección 20 del dispositivo de clasificación 10.

Las muestras cargadas fluyen o pasan a lo largo de un canal 40 a un nudo de clasificación 50 en una segunda sección del dispositivo de clasificación 10. El canal 40 normalmente tiene alrededor de 50 µm de profundidad y varios cientos de µm de anchura. El canal 40 puede tener varios milímetros de largo. Sin embargo, estas dimensiones del canal 40 no son limitantes de la invención.

5 Una fuente de luz LED 70, montada debajo del nudo de clasificación, hace brillar un haz de luz en el nudo de clasificación 50. Una cámara 80 montada sobre el dispositivo de clasificación 10 toma una imagen de las muestras en el nudo de clasificación y un dispositivo de computación (no mostrado) procesa la imagen de las muestras para determinar una o más propiedades. El dispositivo de computación analiza la imagen y se toma una decisión de clasificación basada en la propiedad determinada como criterio de clasificación. El análisis se realiza en un aspecto analizando los colores de las gotas en el canal 40 que cruzan una línea perpendicular al canal 40. Podrían llevarse a cabo otros análisis midiendo el tamaño y la forma de los objetos en las gotas en el canal 40 y/o repasando los contenidos de las gotas. El dispositivo de clasificación 10 está hecho en un aspecto de la invención a partir de polidimetilsiloxano (PMDS). También sería posible llevar a cabo espectroscopía de fluorescencia láser en los objetos en las gotas en el nudo de clasificación 50 para determinar las propiedades usadas como criterios de clasificación. En este caso, la intensidad de la fluorescencia de las muestras puede medirse usando un tubo fotomultiplicador en lugar de la cámara 80 como dispositivo de análisis.

20 La clasificación se implementa abriendo o cerrando una pluralidad de válvulas de Braille que comprenden un canal y un pin (el canal sobre el pin se indica como un círculo 105) en la tercera sección 100 del dispositivo de clasificación 10, que está situado más aguas abajo del nudo de clasificación 50. En este aspecto, se muestra que las válvulas de Braille 105 están montadas en un chip de válvula microfluídica 90 separado, que está conectado por una tubería 95 al nudo de clasificación 50. El diámetro de la tubería 95 será normalmente menor a 1 mm, pero su longitud puede ser desde alrededor de un centímetro hasta un metro de longitud. La tercera sección 100 tiene una pluralidad de canales de recogida 110, pero por simplicidad solo se ilustran aquí dos de los canales de recogida 110. Los canales de recogida 110 tendrán una profundidad inferior a 1 mm y tendrán varios cientos de micrómetros de anchura con una longitud en la región milimétrica.

30 El chip microfluídico de la tercera sección 100 del dispositivo de clasificación 10 es un chip microfluídico diferente al de la primera sección 20 y al de la segunda sección 60 para permitir un mayor grado de flexibilidad. La primera sección 20, la segunda sección 60 y la tercera sección 100 podrían ubicarse en un solo chip microfluídico. La primera sección 20 y la segunda sección 60 pueden cambiarse para diferentes aplicaciones si están ubicadas en un chip microfluídico diferente, mientras que la tercera sección con los canales de recogida 100 y las válvulas de Braille 105 pueden reutilizarse.

35 La figura 5 muestra una imagen de embriones de drosophila en el canal 40 tomada en el nudo de clasificación 50. Los embriones de drosophila pueden clasificarse de acuerdo con una de sus propiedades. En este ejemplo, la propiedad usada para la clasificación es su fluorescencia detectada en la cámara 80.

40 Las válvulas de Braille microfluídicas 105 se conocen, por ejemplo, por las publicaciones Gu W, Zhu X, Futai N, Cho BS, Takayama S. Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays. Proc Natl Acad Sci USA. Nov 9 2004;101(45):15861-15866 and Tung YC, Torisawa YS, Futai N, Takayama S. Small volume low mechanical stress cytometry using computer-controlled Braille display microfluidics. Lab on a Chip. 2007; 7(11): 1497-1503. Las válvulas de Braille microfluídicas pueden usarse como válvulas de Braille 105 en el dispositivo de clasificación 10. Estas válvulas de Braille 105 se operan mediante un visualizador de Braille (mostrado esquemáticamente debajo del chip en la tercera sección 100 de la figura 1) y tienen un tiempo de respuesta de alrededor de 30 ms. Esto permite un rendimiento potencial de hasta ~30 Hz.

50 En un aspecto, el dispositivo microfluídico 10 posee sesenta y cuatro válvulas de Braille 105, pero esto no es limitativo de la invención. Las muestras en el dispositivo microfluídico 10 se clasifican en múltiples canales de recogida diferentes de los canales de recogida 110 de acuerdo con sus criterios de clasificación, como el fenotipo de los objetos en las muestras. Otros ejemplos de propiedades como los criterios de clasificación incluyen, pero no se limitan a, intensidades de fluorescencia, diferentes colores, diferentes tamaños y diferentes morfologías.

55 La decisión de clasificación se basa en este ejemplo en los datos obtenidos de las imágenes tomadas en el nudo de clasificación 50. El dispositivo de clasificación 10 puede, en un ejemplo, medir las intensidades RGB de las muestras que fluyen en el canal 40.

60 En un aspecto del dispositivo de clasificación 10, las válvulas de Braille 105 permiten detener el flujo de las muestras, por ejemplo, durante 1 segundo, a través del nudo de clasificación 50 durante la adquisición de la imagen por la cámara 80. Esta detención permite lecturas más complejas de los datos de la imagen para determinar las propiedades, tales como imágenes confocales de alto contenido, que pueden implementarse sin distorsión de las muestras en la imagen.

65 En la figura 2A se muestra un ejemplo [CM3] del uso del dispositivo de clasificación 10, que ilustra esquemáticamente la clasificación multivía de gotitas coloreadas como muestra. El dispositivo de clasificación 10 de

la figura 2A está conectado a través de la tubería 95 a ocho productores de gotas 200, similares a los descritos en El Debs B, Utharala R, Balyasnikova IV, Griffiths AD, Merten CA. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. Proc Natl Acad Sci USA. Jul 17 2012; 109(29):11570-11575.

5 Los productores de gotas 200 producen las gotitas coloreadas de las muestras. Las gotitas se encapsulan rodeando las gotitas con un aceite inmiscible. El color de las muestras se debe a los tintes acuosos que son de un color diferente. Los productores de gotas 200 están conectados aguas arriba a través del canal 40 o de un tubo adicional al nudo de clasificación 50. Las gotitas en el canal 40 solo se juntan después de la encapsulación, es decir, no hay mezcla de los tintes acuosos en el canal 40.

10 Supongamos que, en el nudo de clasificación 50, las gotitas del canal 40 pasan a través del nudo de clasificación 50 en un orden aleatorio (en términos de sus colores). La cámara (80-no mostrada en la figura 2) toma la imagen y la decisión de clasificación se toma basándose en el valor RGB de la gotita que contiene la muestra coloreada. Esto permite recoger poblaciones puras de gotitas de muestras de un color específico en los canales de recogida 110 aguas abajo.

15 En la figura 2B se muestra un ejemplo real del uso del dispositivo de clasificación 10. La clasificación de gotitas individuales se indica mediante flechas en los pocillos de una placa microtituladora. El conjunto superior de imágenes muestra la clasificación de una gotita brillante en un pocillo objetivo n.º 2 y el conjunto inferior de imágenes muestra la clasificación de una gotita oscura en un pocillo objetivo n.º 8. En cada caso, el pocillo objetivo se indica con un círculo discontinuo en las imágenes. Tras la detección de una de las gotitas, se determina el pocillo objetivo para la gotita y las válvulas de Braille para esta conexión fluidica específica se mantienen abiertas hasta que la gotita haya pasado todo el camino desde el módulo de clasificación hasta la placa microtituladora. Es posible llenar más de ocho pocillos simplemente moviendo el adaptador del tubo (alineando los extremos de todas las tuberías 95 con los pocillos de la placa microtituladora; parte del lado izquierdo de cada imagen) a la siguiente columna de los pocillos.

20 Un problema para el uso de las válvulas de Braille 105 en el pasado para las aplicaciones de clasificación es el hecho de que la parte de la válvula del chip está cubierta por un visualizador de Braille. Esto ha hecho que la obtención de imágenes de las muestras sea muy difícil. El nudo de clasificación 50 del dispositivo de clasificación 10 puede observarse debajo de la cámara 80 (o con un microscopio o con un tubo fotomultiplicador). El dispositivo de clasificación 10 tiene las válvulas de Braille 105 en una tercera sección diferente 100 separada de la segunda sección 60 con el nudo de clasificación 50 y, por lo tanto, no está en el mismo campo de visión que la cámara 80.

25 Las válvulas de Braille 105 están ubicadas aguas abajo del nudo de clasificación 50 a una distancia de al menos 3000 µm, en este ejemplo. Las válvulas de Braille 105 podrían estar en el mismo chip microfluidico que el nudo de clasificación 50 o en un segundo chip microfluidico conectado por la tubería 95 como se muestra en la figura 1.

30 Los fluidos que contienen las muestras se inyectan mediante bombas externas 35 (por ejemplo, bombas de jeringa controladas por ordenador, controladores de flujo accionados por presión, bombas electro-osmóticas, etc.) en el sistema de dispositivo de clasificación, en lugar de usar el movimiento peristáltico descrito anteriormente de los propios pines de Braille. Esto permite un flujo estable de las muestras a través del canal 40 y de la tubería 95, sin efectos pulsantes significativos y todavía permite detener el flujo de fluido con las muestras temporalmente durante la adquisición de la imagen. El PDMS a partir del que se fabrica el dispositivo de clasificación 10 tiene un grado de flexibilidad y, por lo tanto, los fluidos pueden inyectarse de forma continua, incluso cuando todas las válvulas de Braille 105 están cerradas. Mientras este cierre no dure más de unos pocos segundos, el PDMS en expansión tolera el aumento de la presión en los canales 40. Se apreciará que el PDMS es solo un tipo de polímero flexible, a partir del que se fabrican los canales 40, y que podrían usarse otros tipos de polímeros flexibles.

35 El visualizador de Braille permite la clasificación multivía, como se muestra con referencia a la figura 2. Debería ser posible clasificar las celdas individuales de las muestras en el fluido directamente en diferentes pocillos 310 de una placa microtituladora 300. Esto es de interés para la genómica unicelular. Usando métodos de la técnica anterior, es difícil detectar primero el fenotipo de una célula rara individual en el fluido, realizar una etapa de secuenciación en la célula rara y a continuación correlacionar el fenotipo con el genotipo.

40 Se ha descubierto que en las plataformas de genómica unicelular de la técnica anterior (como la plataforma Fluidigm C1) las células en el fluido se quedan atrapadas en posiciones aleatorias en el chip de secuenciación y muchas de las células incluso terminan en residuos sin quedar atrapadas. Por lo tanto, los datos de secuenciación obtenidos de las células no pueden asignarse a un fenotipo particular determinado más aguas arriba.

45 El dispositivo de clasificación 10 resuelve este problema emitiendo las células clasificadas en el chip microfluidico 320 individualmente en los pocillos 310 de la placa microtituladora 300. La implementación actual implica un procedimiento de clasificación de 8 vías en el que cada uno de los ocho canales de recogida 110 está controlado por una de las válvulas de Braille 105. El propio visualizador de Braille tiene un total de 64 pines en este ejemplo (y en principio los hay disponibles incluso más grandes), lo que permite el escalado de hasta 64 canales de recogida 110 desde los que pueden descargarse las células individuales en algunos de los diferentes pocillos 310 en

la placa microtituladora 300 bajo demanda.

Una vez realizada esta descarga, la tubería 95 que conecta el dispositivo de clasificación 10 en el chip microfluídico 320 y la placa microtituladora 300 se mueven a los siguientes 64 pocillos (por ejemplo, de una placa de 384 pocillos) o simplemente se conectan a la siguiente placa microtituladora (no mostrada). Puede implementarse un rendimiento global de al menos 64 células en 5 minutos (lo que equivale a más de 6000 muestras clasificadas por día). Todos los procedimientos ómicos aguas abajo pueden llevarse a cabo de manera altamente paralelizada (con acceso libre a cada célula individual).

En la figura 5 se muestra un ejemplo de los organismos clasificados, que muestra embriones de *Drosophila* clasificados de manera positiva y negativa.

La figura 4 muestra un esquema del método de este dispositivo de clasificación. En una primera etapa 410, una pluralidad de muestras se coloca en un fluido en el canal 40. El fluido se inyecta en el canal 40 y se hace pasar a lo largo del canal 40 en la etapa 420 a un nudo de clasificación 50, en la que se obtienen imágenes de las muestras en la etapa 430. El fluido puede detenerse en el nudo de clasificación 50 si es necesario, como se ve en la etapa 440. Las imágenes tomadas de las muestras en la etapa 430 se analizan en la etapa 450 y, en función de las propiedades de las muestras, una de las válvulas de Braille 105 se abre en la etapa 460. La apertura de la válvula de Braille en la etapa 460 hace que el fluido con la muestra entre en uno de los canales de recogida 100 en la etapa 470, desde donde la muestra puede moverse a través del canal de recogida 100 hacia uno de los pocillos 310 donde se recoge(n) la(s) muestra(s) en la etapa 480. Este método se ha descrito en relación con la obtención de imágenes de las muestras. Es igualmente aplicable cuando se llevan a cabo otros análisis de la muestra, en cuyo caso las etapas 430 y 450 se sustituyen por etapas apropiadas para los otros análisis.

## Referencias

1. Fulwyler MJ. Electronic separation of biological cells by volume. *Science*. Nov 12 1965; 150(3698):910-911.
2. El Debs B, Utharala R, Balyasnikova IV, Griffiths AD, Merten CA. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proc Natl Acad Sci USA*. Jul 17 2012; 109(29):11570-11575.
3. Gu W, Zhu X, Futai N, Cho BS, Takayama S. Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays. *Proc Natl Acad Sci USA*. Nov 9 2004; 101(45):15861-15866.
4. Tung YC, Torisawa YS, Futai N, Takayama S. Small volume low mechanical stress cytometry using computer controlled Braille display microfluidics. *Lab on a Chip*. 2007; 7(11):1497-1503.
5. Abate AR, Agresti JJ, Weitz DA. Microfluidic sorting with high-speed single-layer membrane valves. *Applied physics letters*. May 17 2010; 96(20).
6. Fu AY, Spence C, Scherer A, Arnold FH, Quake SR. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nat Biotechnol*. Nov 1999; 17(11):1109-1111.
7. Fu AY, Chou HP, Spence C, Arnold FH, Quake SR. An integrated microfabricated cell sorter. *Anal Chem*. Jun 1 2002; 74(11):2451-2457.

## Numerales de referencia

- |        |                              |
|--------|------------------------------|
| 10     | Dispositivo de clasificación |
| 20     | Primera sección              |
| 30a, b | Entradas                     |
| 40     | Canal                        |
| 50     | Nudo de clasificación        |
| 60     | Segunda sección              |
| 70     | Fuente de luz LED            |
| 80     | Cámara                       |
| 90     | Chip de válvula              |
| 95     | Tubería                      |
| 100    | Tercera sección              |
| 105    | Válvulas de braille          |
| 110    | Canal de recogida            |
| 200    | Productores de gota          |
| 300    | Placa microtituladora        |
| 310    | Pocillos                     |
| 320    | Chip microfluídico           |

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de clasificación (10) que comprende:
  - 5 un canal (40) adaptado para permitir el paso de una pluralidad de muestras en un fluido a un primer lado de un nudo de clasificación (50);  
una pluralidad de válvulas de Braille (95) conectadas por una pluralidad de conectores al nudo de clasificación (50) y ubicadas aguas abajo a una distancia del nudo de clasificación (50);  
un dispositivo de análisis (80) para analizar algunas de la pluralidad de las muestras y adaptado para controlar  
10 algunas de la pluralidad de válvulas de Braille (95) en función de las propiedades de las muestras analizadas de la pluralidad de las muestras; **caracterizado por que** el dispositivo de análisis (80) está montado en el nudo de clasificación (50).
  2. El dispositivo de clasificación de la reivindicación 1, en el que las válvulas de Braille (95) están situadas aguas  
15 abajo del nudo de clasificación (50) a una distancia de al menos 3000 µm.
  3. El dispositivo de clasificación (10) de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el nudo de clasificación (50) y la pluralidad de válvulas de Braille (95) están ubicadas en dos chips microfluidicos diferentes conectados por una  
20 tubería (96).
  4. El dispositivo de clasificación (10) de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fluido es inyectado mediante bombas externas (35).
  5. El dispositivo de clasificación (10) de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además una  
25 placa microtituladora (300) que tiene pocillos (310) conectados de manera fluida a conexiones controlables por al menos una de las válvulas de Braille (95).
  6. El dispositivo de clasificación (10) de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que al menos partes del dispositivo de clasificación (10) están hechas de un polímero compresible o expandible.  
30
  7. El dispositivo de clasificación (10) de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el dispositivo de análisis (80) es uno de una cámara, un microscopio o un tubo fotomultiplicador.
  8. El dispositivo de clasificación (10) de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el canal está  
35 hecho de un polímero flexible.
  9. Un método para clasificar una pluralidad de muestras en un fluido en un canal (40) que comprende:
    - 40 pasar (420) el fluido con la pluralidad de muestras a lo largo del canal (40);  
analizar (450) en un nudo de clasificación (50) algunas de la pluralidad de muestras para determinar al menos una propiedad de algunas de las muestras;  
abrir una de una pluralidad de válvulas de Braille (95), situadas aguas abajo a una distancia del nudo de clasificación (50), dependiendo la válvula de Braille abierta de la pluralidad de válvulas de Braille (95) de al  
45 menos una propiedad; y  
permitir (460) que la muestra analizada entre a uno de una pluralidad de canales de recogida (110) que están conectados a la válvula de Braille (95) abierta.
    10. El método de la reivindicación 9, que comprende además detener (440) el flujo del fluido durante el análisis de la muestra.  
50
    11. El método de las reivindicaciones 9 o 10, que comprende además inyectar el fluido en el canal (40).
    12. El método de la reivindicación 11, que comprende además cerrar todas de la pluralidad de válvulas de Braille (95) mientras se está inyectando el fluido en el canal.  
55
    13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, que comprende además pasar una pluralidad de las muestras analizadas que tienen propiedades similares a lo largo de un mismo canal de la pluralidad de canales de recogida (110).
    - 60 14. El método de una de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el análisis (450) de algunas de las muestras comprende obtener imágenes (430) de la muestra y analizar (450) las imágenes de la muestra.

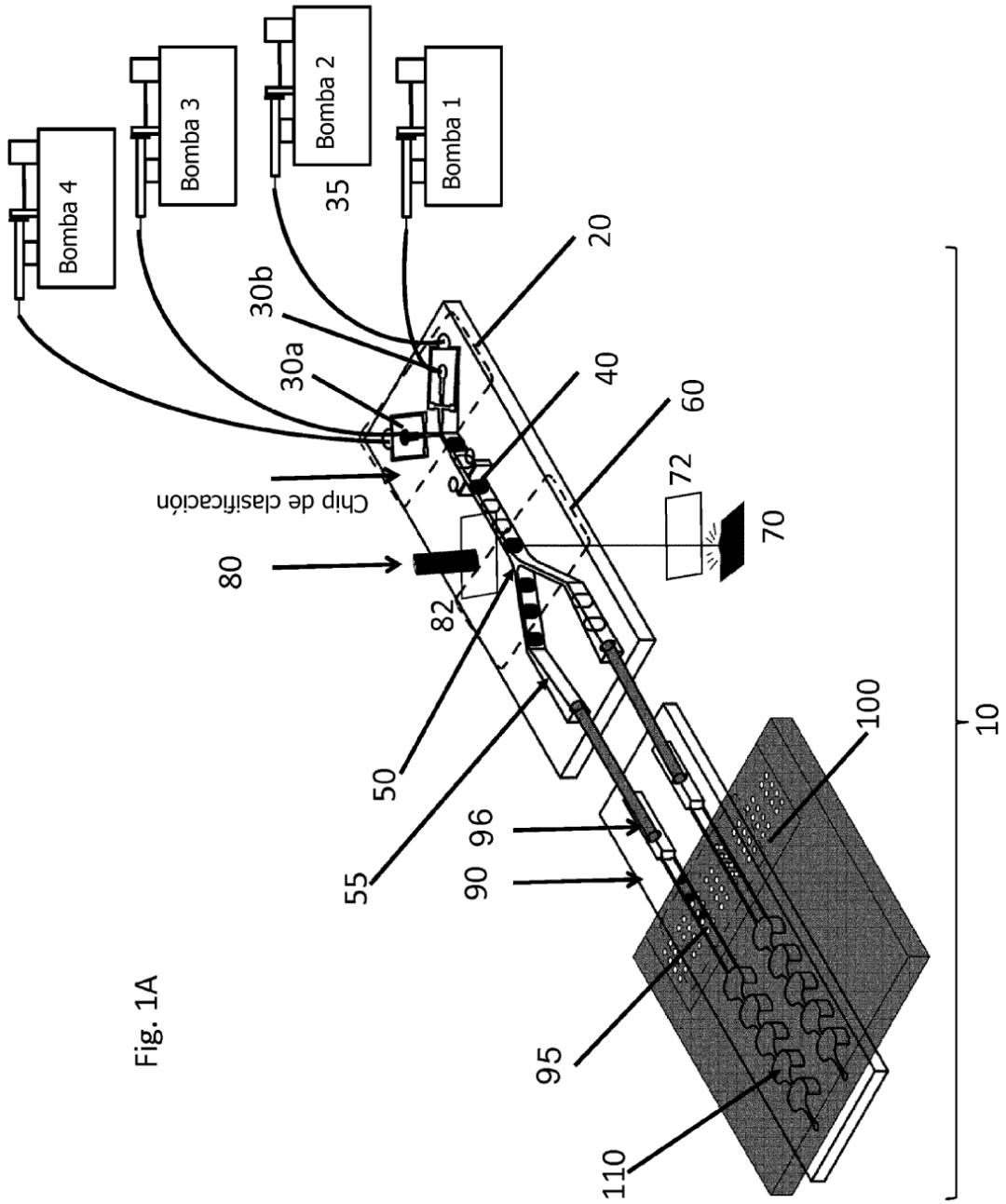


Fig. 1A



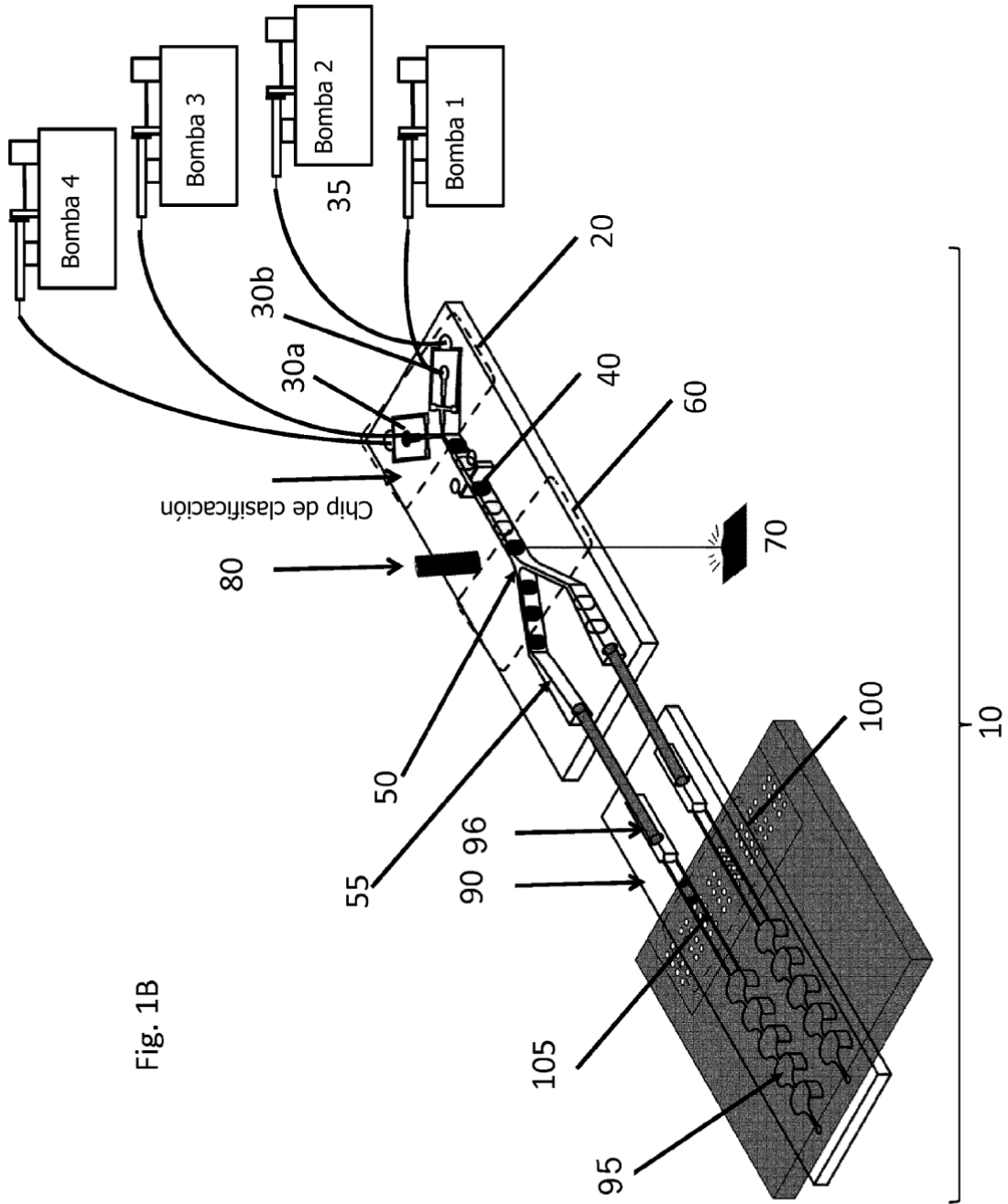
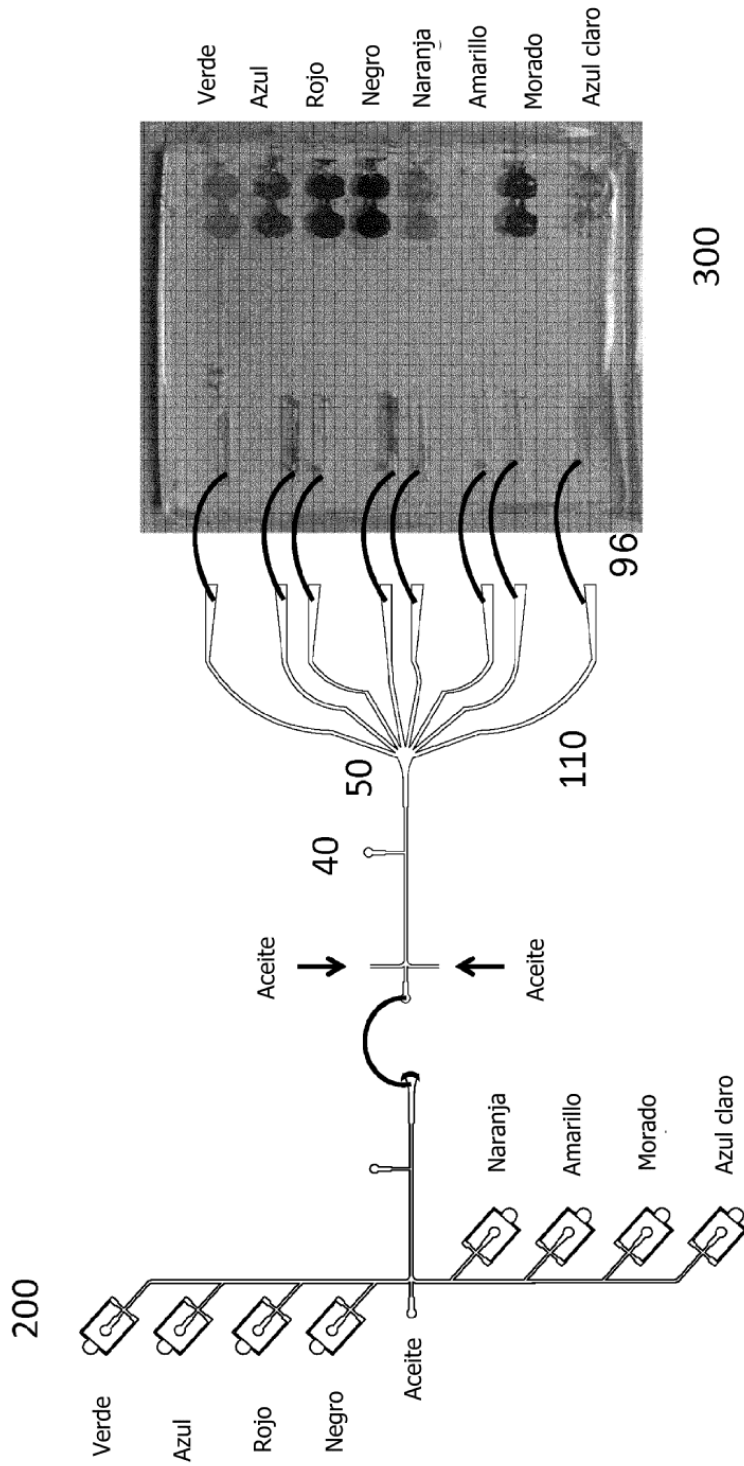
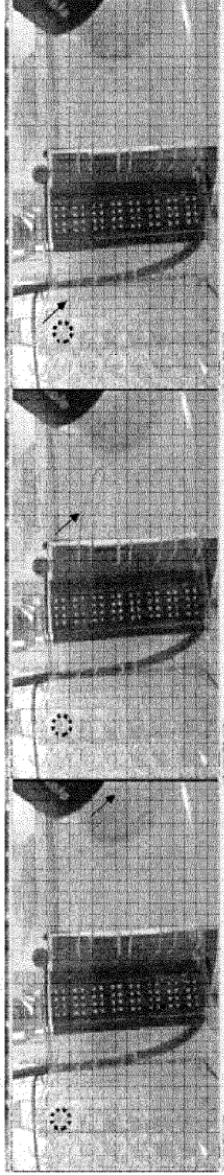


Fig. 1B

Fig. 2A



Clasificación de una gotita brillante en el pocillo n.º 2



Clasificación de una gotita oscura en el pocillo n.º 8

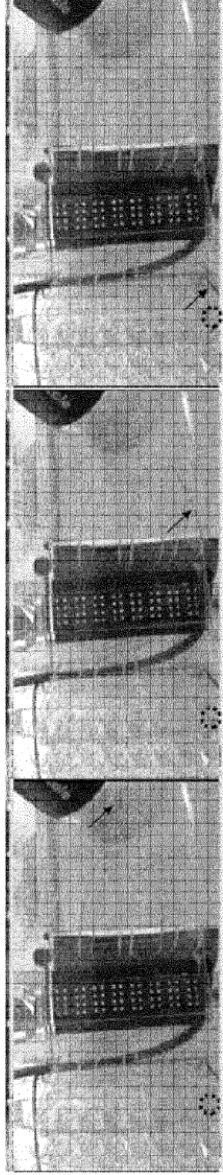


Fig. 2B

Fig. 3

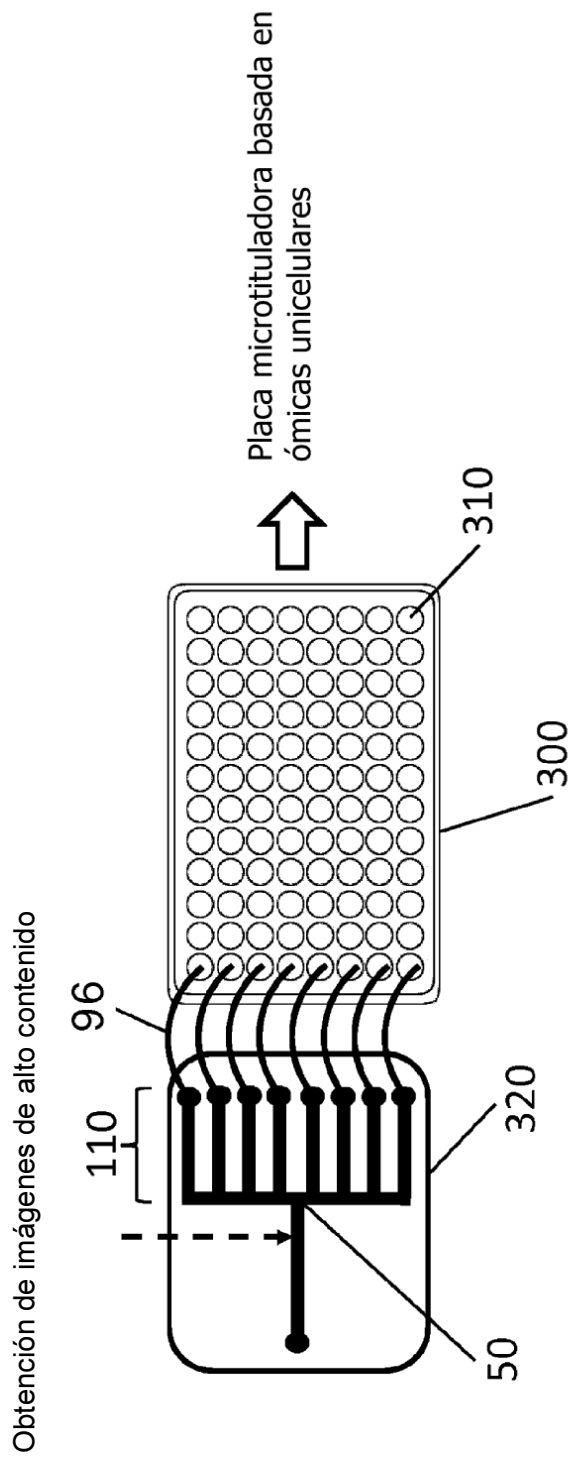
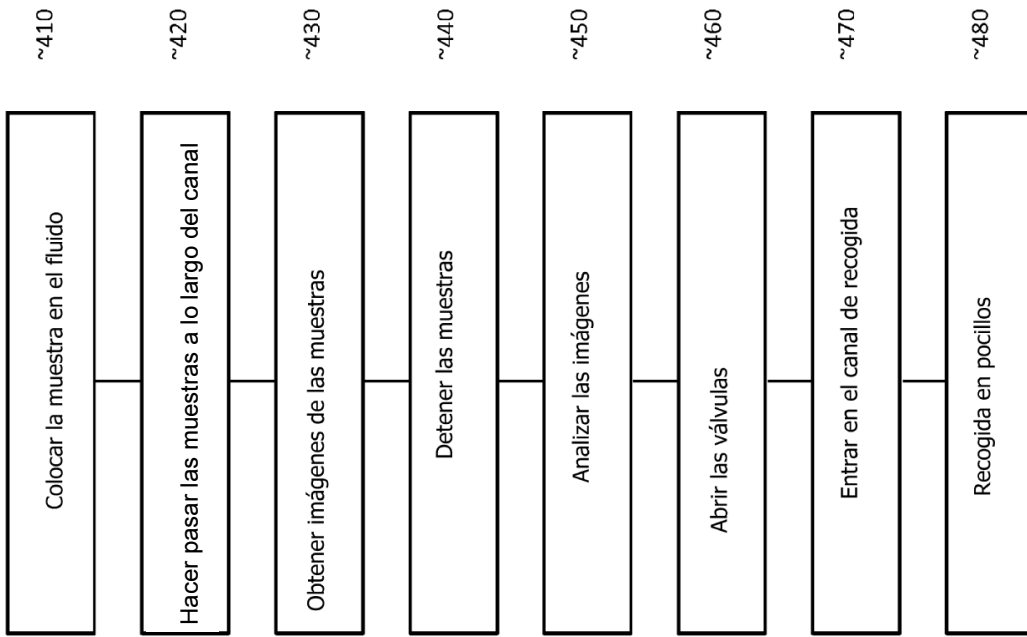


Fig. 4



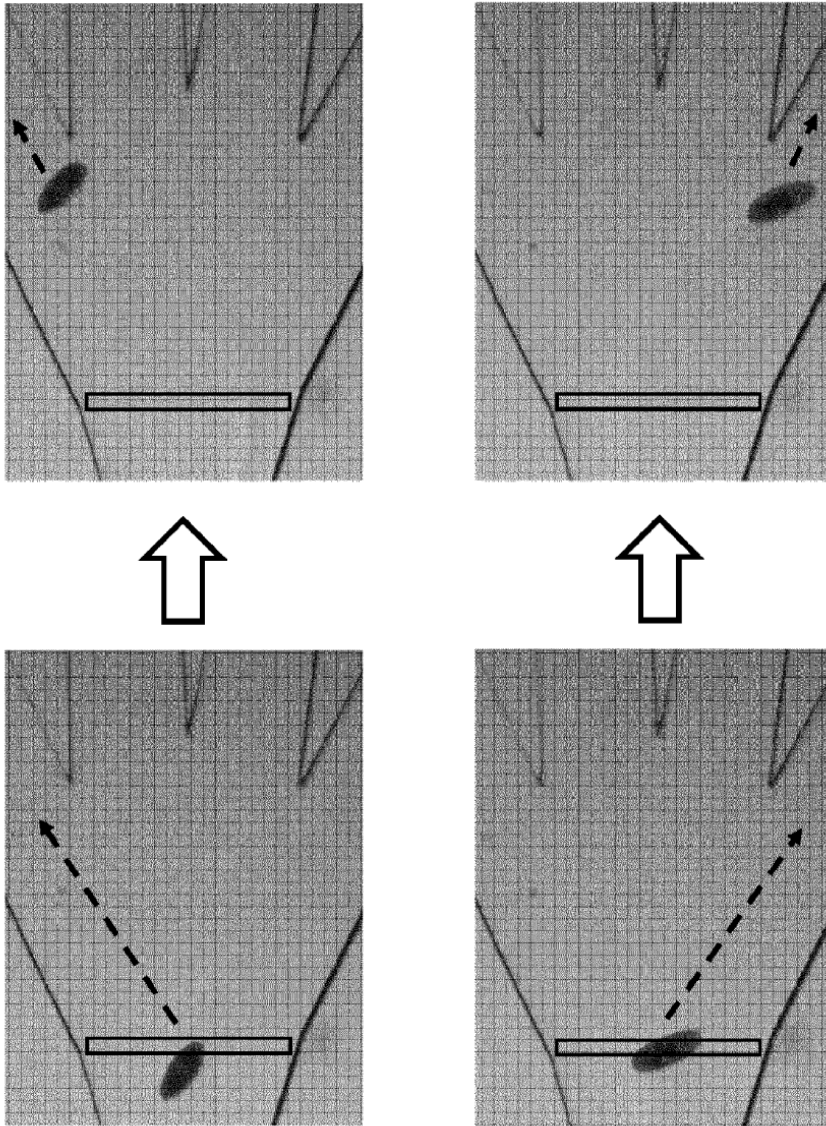


Fig. 5