

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 820 450**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2012 PCT/EP2012/068117**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.03.2013 WO13037962**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2012 E 12766297 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2020 EP 2755765**

54 Título: **Dispositivo microfluídico para generar una secuencia de sustancias en un canal microfluídico**

30 Prioridad:

14.09.2011 GB 201115895
14.09.2011 US 201161534529 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.04.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**UTHARALA, RAMESH y
MERTEN, CHRISTOPH**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 820 450 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 microfluídico para generar una secuencia de sustancias en un canal microfluídico

- 5 La presente divulgación se refiere a un aparato microfluídico según se define en la reivindicación 1 y a un método para generar una secuencia de sustancias en un canal microfluídico según la reivindicación 5. Los detalles del aparato microfluídico y el método correspondiente se definen en las reivindicaciones dependientes.

Introducción y técnica relacionada

- 10 Los dispositivos microfluídicos han demostrado un gran potencial para muchas aplicaciones terapéuticas, diagnósticas, químicas o bioquímicas. Permiten trabajar con una cantidad mínima de sustancias. Un aspecto de la microfluídica es el control de los flujos a través de una red de canales. Se han establecido varias técnicas para generar y operar válvulas microfluídicas. Por ejemplo, la litografía blanda multicapa se puede utilizar para fabricar canales ortogonales en dos capas diferentes.

- 15 Los accionadores piezoeléctricos empujan pequeños pasadores en el chip hecho de polímeros flexibles, comprimiendo así el canal y deteniendo el flujo en el interior. Hasta el momento, las válvulas microfluídicas se han utilizado principalmente para generar pequeños compartimentos y controlar el flujo en dispositivos de fase continua. Los sistemas microfluídicos basados en gotitas permiten la generación de gotitas de agua en aceite (w/o) altamente monodispersas (<3 % de polidispersidad en términos de volumen) a velocidades de hasta 10.000/s al enfocar el flujo de una fase acuosa continua con una segunda fase oleosa inmiscible. Durante la última década, la idea de utilizar estas gotitas como microrreactores para reacciones paralelizadas dentro de un intervalo de volumen de pico a nanolitros se ha explotado en muchas aplicaciones diferentes. Estas incluyen la síntesis de nanopartículas, cristalización de proteínas, PCR de una sola molécula, análisis de proteoma, diagnóstico clínico en fluidos fisiológicos humanos, titulación de anticoagulantes y encapsulación y cribado de células. Además, varias empresas están comercializando microfluidos basados en gotitas para diversas aplicaciones, como secuenciación dirigida (por ejemplo, Raindance Technologies, GNUbio) y diagnósticos (Droplet Diagnostics).

- 20 El documento WO 2007/081386 proporciona un canal microfluídico para mezclar e investigar gotitas de fase acuosa encapsuladas en una corriente de aceite.

- Una publicación de Shaojiang Zeng *et al.* "Microvalve-actuated precise control of individual droplets in microfluidic devices", LabChip, 21 de mayo de 2009; 9(10): 1340-1343 describe un ejemplo para la generación de secuencias de gotitas individuales separadas por un aceite inmiscible en un canal microfluídico, y más específicamente un aparato microfluídico para proporcionar una o más sustancias líquidas a una red de canales microfluídicos según el preámbulo de la reivindicación 1 y un método para proporcionar una secuencia de gotitas según el preámbulo de la reivindicación 5. Se describe un marcador de gotitas que es capaz de generar cuatro especies de gotitas diferentes que pueden fusionarse una a una de forma combinatoria. Si bien, en teoría, este enfoque permite la generación de muchas mezclas de diferentes compuestos (que pueden seleccionarse para obtener el efecto deseado o explotarse para la síntesis en chip de bibliotecas de compuestos), el sistema tiene varias limitaciones: El sistema depende de la fusión de gotitas y solo permite la generación de pares de gotitas combinatorios. El sistema es impulsado por presión negativa. Todo el flujo se genera aspirando desde la salida, lo que da como resultado diferentes tamaños de gotita para los diferentes compuestos cuando se aplican tiempos de apertura de válvula constantes. Aunque esto se puede compensar en teoría ajustando los tiempos de apertura de las válvulas individuales, solo se puede lograr un nivel deficiente de control. Dado que cada compuesto infundido necesita un tiempo de apertura de válvula específico, parece muy difícil generar sistemáticamente todos los pares de gotitas posibles (y sincronizar la generación de las gotitas individuales para permitir el emparejamiento). En conclusión, el sistema apenas se puede ampliar (el principio de funcionamiento se mostró para 4 compuestos infundidos, solo, y únicamente se fusionaron dos especies de gotitas). Además, un sistema impulsado por presión negativa tiene limitaciones estrictas en términos de caudales máximos y, por lo tanto, de rendimiento.

- El documento EP 1 601 874 describe el uso de dispositivos mecánicos tales como un dispositivo Braille para cerrar y abrir válvulas en un sistema microfluídico.

- 55 Es un objetivo de la presente divulgación superar al menos una de las desventajas de la técnica anterior.

Sumario de la invención

- 60 La red de canales de sustancia líquida y el canal de líquido de separación están conectados al canal de gotitas a través de una unión de generación de gotitas, y en donde la red de canales de sustancia líquida comprende una primera entrada de sustancia líquida, al menos una segunda entrada de sustancia líquida y al menos un área de combinación de sustancias líquidas. El uso del área de combinación de sustancias líquidas tiene la ventaja de que la sustancia puede reunirse de manera definida y controlada y las concentraciones de sustancia de la primera sustancia y al menos de la segunda sustancia pueden controlarse. También es posible combinar o mezclar más de dos sustancias y el número de sustancias solo está limitado por el número de entradas de sustancias que terminan en el

área de combinación de sustancias líquidas. Solo se puede usar una única unión para generar todas las gotitas en el canal de gotitas correspondiente. La fusión de las gotitas no es necesaria y puede omitirse ya que las sustancias se combinan antes de la formación de las gotitas.

5 El área de combinación de sustancia líquida puede ser una sección de un canal microfluídico y dos o más sustancias líquidas se guían a través del canal de combinación en paralelo y/o en secuencia. Si dos o más sustancias líquidas se guían en paralelo a través del canal de combinación, pueden fluir uno junto al otro en flujo laminar y la mezcla de la sustancia puede ocurrir principalmente durante o después de la generación de gotitas. Sin embargo, el área de combinación también puede comprender una sección de mezcla en donde se mezclan dos o más sustancias, por ejemplo, generando turbulencias.

15 El líquido de separación puede ser, en un sistema de agua/aceite, un aceite inmiscible y la sustancia líquida puede ser una solución acuosa que contiene la sustancia o un disolvente orgánico que contiene la sustancia o una combinación de un disolvente orgánico y un disolvente acuoso. También es posible utilizar un sistema de agua/disolvente orgánico, en donde el líquido de separación es agua y la sustancia líquida es un disolvente orgánico que contiene la sustancia. Se pueden utilizar igualmente otros sistemas.

20 El aparato comprende un canal de líquido de separación, un canal de gotitas y una red de canales de sustancia líquida en donde la red de canales de sustancia líquida y el canal de líquido de separación están conectados al canal de gotitas mediante una unión de generación de gotitas. La red de canales de sustancia líquida comprende al menos una primera entrada de sustancia líquida, al menos una primera válvula y al menos un dispositivo de presión para aplicar una presión continua o un flujo continuo a la al menos una primera sustancia líquida en la al menos una primera entrada de sustancia líquida. La al menos una primera válvula se puede conmutar entre una primera posición en la que está abierta una conexión de líquido a la unión de generación de gotitas y una segunda posición en la que la conexión de líquido a la unión de generación de gotitas está cerrada. La aplicación de una presión continua o un flujo continuo a la entrada tiene la ventaja de que se producen tiempos de conmutación más cortos y perturbaciones mínimas en el sistema. Asimismo, la distribución del tamaño de las gotitas es más homogénea y la mezcla o combinación de sustancias líquidas está mejor definida y controlada.

30 El al menos un dispositivo de presión puede ser una bomba para aplicar continuamente un flujo constante o un depósito de presión para aplicar continuamente una presión constante. El dispositivo de presión se puede utilizar para aplicar continuamente el flujo constante o la presión constante a una sola de las entradas o a varias o a todas las entradas al mismo tiempo.

35 El aparato comprende además un primer drenaje de sustancia líquida, en donde el drenaje de sustancia líquida está cerrado en la primera posición y en donde el drenaje de sustancia líquida está abierto en la segunda posición. El uso de un drenaje o evacuación permite aplicar un flujo continuo a la entrada y cambiar el flujo al drenaje o evacuación o hacia la unión. Se puede lograr una conmutación rápida y bien controlada de los líquidos en la unión. Se proporciona una válvula de drenaje adicional relacionada con el drenaje. Por ejemplo, la válvula de drenaje se abre para dirigir un flujo constante al drenaje cuando la primera válvula está en la segunda posición. La válvula de drenaje está cerrada, cuando la primera válvula está en la primera posición.

Breve descripción de las figuras

45 Se describirán ahora ejemplos de la presente divulgación con respecto a las Figuras adjuntas en las que:

Las figuras 1a y 1b muestran un sistema de canales microfluídicos según la presente invención;

50 Las figuras 2a y 2b muestran el sistema de canales microfluídicos de la Figura 1 en una segunda configuración;

Las figuras 3a y 3b muestran el sistema de canales microfluídicos de la Figura 1 y 2 en una tercera configuración

La figura 4 muestra un segundo ejemplo de un sistema de canales microfluídicos de la presente divulgación;

55 Las figuras 5a y 5b muestran posibles segmentos de gotitas de líquido encapsuladas que pueden generarse con el aparato microfluídico.

Las figuras 6a-c muestran un ejemplo de mezclas combinatorias que utilizan el aparato microfluídico.

60 Descripción detallada

La presente divulgación puede entenderse mejor con respecto a los ejemplos en los que se implementa la presente invención. Debe entenderse que no todas las características descritas con respecto a un ejemplo tienen que implementarse y un experto en la técnica añadirá o eliminará características para adaptar la presente divulgación a aplicaciones o requisitos específicos.

La figura 1 muestra un ejemplo de una red de canales microfluídicos 2 según la presente invención. La figura 1a muestra la red de canales microfluídicos 2 que comprende la entrada de líquido de separación o la entrada de aceite 12 a través de la cual se puede insertar un líquido de separación en un canal de líquido de separación 10. El líquido de separación puede ser un aceite inmiscible, que se puede usar para encapsular gotitas acuosas como se conoce en la técnica. El canal de líquido de separación se denomina canal de aceite 10 con respecto al ejemplo descrito en donde se utilizó un aceite fluorado inmiscible como líquido de separación. El aceite inmiscible puede usarse como líquido de separación con soluciones acuosas y/u orgánicas como sustancias líquidas. Sin embargo, también es posible utilizar agua o una solución acuosa como líquido de separación, por ejemplo, si la sustancia líquida es un disolvente orgánico que comprende la sustancia.

En un aspecto de la invención, el canal de líquido de separación 10 tiene una anchura de 185 μm y una altura de 52 μm . Normalmente, la anchura del canal de líquido de separación 10 podría variar entre 150 μm y 250 μm . La altura del canal estará normalmente entre 40 y 60 μm .

El canal de aceite 10 está conectado a una unión 3 en la que se forman gotitas, como se describirá más adelante. Se proporciona una sustancia líquida a través de un canal de combinación 33 desde una red de canales de sustancia líquida 30 hasta la unión 3. El canal de combinación 33 tiene una anchura de 100 μm en este aspecto de la invención. Más generalmente, la anchura del canal de combinación 33 estará entre 80 y 120 μm .

Cuando se proporciona una sustancia líquida a través del canal de combinación 33, se forman gotitas de la sustancia líquida en la unión 3 y se encapsulan con el líquido de separación para formar una secuencia de gotitas separadas por el líquido de separación. Esta formación de gotitas o encapsulación se muestra en la figura 1b con más detalle. La unión 3 está conectada a un canal de gotitas 20, que está en el ejemplo de la figura 1 conectado a una salida de gotitas de líquido 22. En el ejemplo mostrado, la unión 3 es una unión en T que ha demostrado ser fiable para la formación de gotitas. También se pueden utilizar otros tipos de unión 3. La sustancia líquida puede ser una solución acuosa que puede contener una o más sustancias en diferentes concentraciones. La sustancia líquida se prepara y en algunos casos se combina en la red de canales de sustancia líquida como se describirá con más detalle a continuación.

El canal de gotitas 20 puede comprender un área de investigación (no mostrada) o puede comprender características adicionales (ramificaciones/válvulas) para investigar o separar las gotitas generadas en el canal de gotitas 20. Las gotitas se generan encapsulando gotitas de un líquido acuoso generado en la red de canales de sustancia líquida 30. La red de canales de sustancia 30 se combina o se conecta al canal de gotitas 20 a través del canal de combinación o mezcla 33. Al proporcionar un flujo constante y/o continuo de aceite en el canal de líquido de aceite 10 y de al menos una sustancia líquida acuosa en el canal de combinación 33, las gotitas de la sustancia líquida acuosa proporcionado en el canal de combinación 33 se encapsularán entre las secciones del líquido de separación de aceite en las gotitas que se moverán a lo largo del canal de gotitas 20.

La unión en T 3 es la única conexión de la red de canales de sustancia líquida 30 y todas las gotitas se forman a partir del líquido acuoso proporcionado en el canal de combinación 33.

Si bien se usa una unión en T 3 en los ejemplos descritos, la presente divulgación no se limita a este tipo de unión, y pueden usarse igualmente otros tipos de unión. Por ejemplo, se puede utilizar una unión de enfoque de flujo como se describe, por ejemplo, en "Vyawahare S, Griffiths AD, Merten CA. Miniaturization and parallelization of biological and chemical assays in microfluidic devices. Chem Biol. 29 de octubre de 2010; 17(10):1052-1065".

El canal de combinación 33 es la conexión entre la red de canales de sustancia líquida 30 y el canal de separación 10. El canal de combinación 33 está conectado a una pluralidad de áreas de entrada 40, 41, 42, 43, 44. La red de canales de sustancia líquida 30 se muestra en las figuras 1 y 2 con cinco áreas de entrada con fines ilustrativos, pero la invención no se limita a este número. Es igualmente posible proporcionar menos o más que las cinco áreas de entrada 40, 41, 42, 43, 44 mostradas. Cada una de las áreas de entrada 40, 41, 42, 43, 44 comprende dos entradas y una salida de residuos. Todas las áreas de entrada 40, 41, 42, 43, 44 tienen un diseño similar que ahora se describirá con más detalle con respecto a la primera área de entrada 41 y la cuarta área de entrada 44 ilustradas en dos configuraciones diferentes en la figura 1, y la figura 2. Las figuras 1 y 2 muestran el mismo aparato 2 en una configuración diferente, es decir, con diferentes válvulas activadas.

Una primera entrada 411 de la primera zona de entrada está conectada a un canal de entrada que conduce a una primera entrada o válvula de distribución 412 y a una primera válvula de residuos 413. La primera válvula de entrada 412 y la primera válvula de residuos 413 se activan alternativamente. En la configuración que se muestra en la figura 1, la primera válvula de entrada 412 está cerrada y la primera válvula de residuos 413 está abierta. Se inserta un líquido que contiene una primera sustancia a través de la primera entrada 411 y el líquido se guía a través de la válvula de residuos abierta 413 a la primera salida de residuos 419. La salida de residuos 419 puede estar conectada a un recipiente de residuos y se introduce continuamente un líquido nuevo que contiene una primera sustancia a través de la primera entrada 411.

En un aspecto de la divulgación, el canal de entrada tendrá una anchura de alrededor de 50 μm y más generalmente entre 40 y 60 μm . Las válvulas miden 490 μm y más generalmente entre 440 y 550 μm . La altura del canal es de 52

µm y más generalmente entre 40 y 60 µm.

También es posible conectar la salida de residuos 419 a un depósito y reutilizar la sustancia líquida del depósito. La primera sustancia líquida puede circular de forma continua.

5 Mientras que la primera válvula de entrada 412 está cerrada en la configuración de la figura 1, una cuarta sustancia líquida insertada en una cuarta entrada 441 es guiada al área de combinación 34 y al canal de combinación 22 para formar y encapsular las gotitas de la cuarta sustancia líquida proporcionada por la cuarta entrada 441 de la cuarta área de entrada 44. En una configuración similar a la primera área de entrada 41, la cuarta sustancia líquida proporcionada a través de la cuarta entrada 441 es guiada a una cuarta válvula de entrada 442 y una cuarta válvula de residuos 443. 10 En la configuración ilustrada en la figura 1, la cuarta válvula de entrada 442 está abierta y la cuarta válvula de descarga está cerrada. La cuarta sustancia líquida que entra en la cuarta entrada 441 es guiada al área de combinación 34 y a través del canal de combinación 33 a la unión en T 3. El cuarto líquido se forma en las gotitas 6 en el canal de gotitas 20 como también se muestra en la figura 1b.

15 La figura 2 muestra una configuración diferente. La cuarta válvula de entrada 442 está ahora cerrada y la correspondiente válvula de residuos 443 está abierta. El cuarto líquido de la cuarta entrada de líquido 441 será guiado a la cuarta evacuación 449. Se puede mantener un flujo continuo de líquido a través de la cuarta entrada 441. Por el contrario, la primera válvula de entrada 412 está ahora abierta en la configuración de la figura 2 y la primera válvula de residuos 413 está cerrada para la primera sustancia líquida proporcionada en la primera entrada 411. La primera sustancia líquida se guía ahora al área de combinación 34 y al canal de combinación 33 y se forman gotitas de la primera sustancia líquida 7 en el canal de gotitas 20 como se ilustra en la figura 2.

25 Se describe una aplicación sencilla del aparato microfluídico 2 con respecto a las figuras 1 y 2 que se refieren a dos sustancias líquidas, una primera sustancia líquida proporcionada en la primera entrada 411 y la cuarta sustancia líquida proporcionada en la cuarta entrada 441. Debe entenderse que se pueden proporcionar al menos una segunda sustancia líquida y una tercera sustancia líquida a la entrada de la segunda sustancia líquida 421 y la entrada de la tercera sustancia líquida 431 y a la entrada de la sustancia líquida 401. Estas entradas están diseñadas de la misma manera y es posible encapsular al menos las cuatro sustancias líquidas en la red de canales ilustrada en la figura 2 30 de esta manera.

Además de la primera entrada de sustancia 411, a la segunda entrada de sustancia líquida 421, la tercera entrada de sustancia líquida 431 y la cuarta entrada de sustancia líquida 441 y la entrada de sustancia líquida 401, cada una de las redes de entrada 40, 41, 42, 43, 44 comprende una entrada adicional 405, 415, 425, 435, 445. Cada una de las 35 entradas adicionales 405, 415, 425, 435, 445 comprende un par de una válvula de entrada adicional 406, 416, 426, 436, 446 y una válvula de residuos adicional 407, 417, 427, 437, 447. Por ejemplo, la primera entrada adicional 415 de la primera área de entrada 41 comprende una primera válvula de entrada adicional 416 y una primera válvula de residuos adicional 417. Añadiendo estas entradas adicionales y válvulas adicionales, es posible utilizar en total ocho sustancias diferentes en ocho entradas de sustancia líquida diferentes al aparato microfluídico mostrado en el ejemplo de las figuras 1, 2 y 3. 40

En el ejemplo mostrado, las entradas adicionales 405, 415, 425, 435, 445 están conectadas a través de la correspondiente válvula adicional 407, 417, 427, 437, 447 a la salida de residuos 409, 419, 429, 439, 449 de la correspondiente área de entrada 40, 41, 42, 43, 44, respectivamente. Una salida de residuos se utiliza para dos 45 entradas. Sin embargo, también es posible proporcionar una salida de residuos separada para cada válvula de residuos, es decir, para cada entrada, por ejemplo, si se reutilizan las sustancias líquidas correspondientes. También es posible combinar más de dos entradas a una salida de residuos común.

Todas las entradas están dispuestas en la red de canales de sustancia líquida y se combinan en el área de 50 combinación o mezcla 34 en un solo canal de combinación 33. De esta manera se pueden encapsular gotitas de ocho sustancias diferentes con este ejemplo. Es posible utilizar cada una de las ocho sustancias por separado. También es posible combinar dos o más sustancias en una gotita abriendo dos o más de las válvulas de entrada 402, 406, 412, 416, 422, 426, 432, 436, 442, 446 al mismo tiempo, como se muestra en la figura 3. En el ejemplo de la figura 3, la primera válvula de entrada 412 y la cuarta válvula de entrada 442 están abiertas, mientras que todas las demás 55 válvulas de entrada están cerradas y la sustancia líquida introducida en la primera entrada 411 y en la cuarta entrada 441 se combinan en el área de combinación 34 y se transfieren a la unión en T 3 a través del canal de combinación 33. Puede generarse una secuencia de gotitas combinadas 8 que contienen la primera sustancia y la segunda sustancia.

60 Los ejemplos de las figuras 1, 2 y 3 se han descrito con respecto a cuatro y ocho entradas de canales de sustancia. Para una persona experta en la técnica es obvio que la divulgación no se limita a este número. Muchas más entradas con una disposición de válvula de entrada y evacuación mostrada en las figuras 1, 2 y 3 se pueden utilizar y combinar en una única zona de mezcla 34. En la figura 4 se ilustra un ejemplo. El ejemplo de la figura 4 muestra un total de dieciséis redes de entrada de sustancias, cada una con un canal de entrada y un canal de entrada adicional que 65 permite en este ejemplo la adición de treinta y dos sustancias líquidas que se pueden combinar en una secuencia de gotitas a través de la unión en T única 3. Por tanto, la secuencia o las gotitas pueden contener hasta 32 gotitas

diferentes y todas sus combinaciones en este ejemplo. En el ejemplo que se muestra en la figura 4, todas las válvulas están en estado cerrado que puede ser un estado inicial. Es obvio, que cada una de las válvulas, se puede abrir individualmente para permitir que los líquidos pasen a la unión 3 o a la evacuación, como se explica con los ejemplos de las figuras 1 a 3.

5 Es posible generar un número ilimitado de combinaciones de secuencias. Algunas de estas combinaciones de secuencias se pueden usar, por ejemplo, para codificar o para seleccionar un gran número de compuestos usando "gotitas codificantes". Las combinaciones de secuencias se pueden utilizar como un tipo de "código de barras" para
10 indicar una posición dentro del líquido de separación. Esto permite, por ejemplo, una identificación de las gotitas de producto 7 en el canal de separación 10. Por ejemplo, algunas de las gotitas 7 pueden usarse para el análisis (como se describe a continuación) y otras gotitas forman la identificación (código de barras) de modo que un investigador pueda identificar las gotitas de producto 7 de interés.

15 Se apreciará que se pueden usar diferentes esquemas de codificación. Por ejemplo, los dígitos de una cifra se pueden codificar con un color y las decenas con otro color. En este esquema de codificación, el número "25" se codificaría como dos gotitas de un primer color seguidas de cinco gotitas de un segundo color. Alternativamente, se podría usar un esquema binario en el que el primer color representara un 1 y el segundo color representara un 0. En este esquema de codificación, la muestra 10 (=2) sería una gotita de color seguida por la segunda gotita de color y el binario 101 (= 5 decimal) sería una gotita de primer color seguida por la segunda gotita de color y finalmente la primera gotita de
20 color nuevamente.

El número de gotitas también se puede determinar por la "longitud" de un tapón de gotitas en el canal. Por ejemplo, en lugar de generar gotitas separadas, la longitud del tapón viene determinada por el tiempo en el que se inserta el colorante en el canal de separación 10 y se puede leer ópticamente. Así, por ejemplo, cada uno del primer color o del
25 segundo color se puede inyectar durante 500 ms en el canal de separación 10 y se mide la longitud del tapón de gotitas formado en el canal de separación 10.

En un aspecto de la divulgación, las sustancias líquidas que componen el código de identificación se insertan en el canal de separación 10 en una o más uniones 3 diferentes en las que se forman las gotitas de codificación. Esto se
30 debe a que los colorantes o fluoróforos que se utilizan para formar el código de identificación pueden interferir con las reacciones en las gotitas de producto 7 de interés. Se utilizan dos diferentes uniones 3 de modo que cada unión 3 se utilice para un solo colorante.

En un aspecto de la invención, las sustancias líquidas para el código de identificación son colorantes alimentarios.

35 La generación de secuencias se realiza activando las correspondientes válvulas de entrada. Las válvulas de entrada y las válvulas de residuos pueden usar una pantalla Braille para activar las válvulas. Un pasador de la pantalla Braille se puede alinear con una válvula correspondiente y la válvula se puede cerrar presionando el pasador en la válvula para comprimir el canal. Se pueden preferir las pantallas Braille, ya que proporcionan tiempos de conmutación rápidos de aproximadamente 500 ms o menos. También pueden usarse otras válvulas conocidas en la técnica de la
40 microfluidica.

Las sustancias líquidas se suministran continuamente a las respectivas entradas, por ejemplo, mediante bombas. No es necesario cambiar la velocidad de las bombas o la presión proporcionada. El cambio de sustancia líquida se realiza
45 únicamente conmutando las válvulas correspondientes. Este sistema impulsado por presión asegura un tamaño de gotitas homogéneo.

Los ejemplos se han descrito de manera que en cualquier momento solo se abre una válvula de entrada a la vez, lo que permite el paso de solo una sustancia líquida al canal de gotitas. Sin embargo, también es posible abrir dos o más
50 válvulas a la vez. Esto dará lugar a una mezcla de sustancias líquidas proporcionada a través de las entradas correspondientes. Esto se puede utilizar para combinar y mezclar diferentes sustancias proporcionadas en las diferentes entradas de una manera predefinida.

También es posible utilizar este concepto para la dilución de una sustancia y realizar diferentes tipos de ensayos o
55 investigaciones con el sistema descrito.

Ejemplos

Ejemplo 1: Diferenciación de células madre

60 El aparato microfluidico 2 se utiliza para seleccionar ingredientes de los medios (por ejemplo, factores de crecimiento y estímulos químicos) que desencadenan la diferenciación de las células madre en linajes específicos (por ejemplo, neuronas, células musculares, etc.). Es bien sabido que la diferenciación de las células madre depende de muchos factores (químicos) en paralelo. Por tanto, se requiere el cribado de mezclas combinatorias de ingredientes de medios
65 e incluso se explota comercialmente en sistemas convencionales (por ejemplo, plasticell). Si bien una configuración convencional requiere grandes cantidades de células madre y solo permite un rendimiento relativamente bajo, el

aparato microfluidico 2 de la presente divulgación puede eludir estas limitaciones.

En este ejemplo, una suspensión de células madre así como una serie de factores de crecimiento y estímulos químicos se inyectan continuamente en (diferentes entradas de) el aparato microfluidico 2. Usando una secuencia predefinida de configuraciones de válvulas, todas las posibles combinaciones de factores de crecimiento y estímulos químicos se coencapsulan junto con las células madre en gotitas. Aguas abajo de la etapa de encapsulación, las gotitas se incuban durante un período de tiempo suficiente para permitir la diferenciación de las células madre en diferentes linajes.

Posteriormente, las gotitas se mezclan con reactivos de ensayo (por ejemplo, anticuerpos) para identificar los linajes celulares resultantes. Para este fin, las gotitas que contienen las células madre se fusionan con las gotitas que contienen los reactivos de ensayo antes de realizar una lectura de fluorescencia en el chip o una etapa de formación de imágenes para visualizar la unión de anticuerpos específicos (indicando la diferenciación en un linaje específico).

Aunque todas las composiciones de muestra se generan en una secuencia predefinida y el orden de las gotitas resultantes se mantiene constante durante todo el experimento, se puede desear un código de barras adicional de las muestras para permitir una determinación precisa de las gotitas. Esto se puede lograr inyectando fluoróforos específicos en entradas acuosas particulares y dirigiendo su flujo hacia el creador de gotitas cada vez que se cambian las configuraciones de la válvula, generando así gotitas que forman el código de identificación y que muestran una señal de fluorescencia específica. Al usar dos fluoróforos diferentes, inyectándolos de forma alterna y variando el número de gotitas generadas (o simplemente la concentración de los fluoróforos), los números de muestra se pueden escribir en forma de códigos de barras ópticos que se muestran en la figura 5a y b.

Metodología 1: Generación de códigos de barras ópticos (números grandes) entre las muestras combinatorias (indicadas por letras) usando 2 fluoróforos inyectados y encapsulados de manera alterna (el cambio del fluoróforo indica el siguiente dígito) mientras se varía el número de gotitas generadas. En la figura 5a se muestra un ejemplo.

Metodología 2: Generación de códigos de barras ópticos (números grandes) entre las muestras combinatorias (indicadas por letras) usando dos fluoróforos diferentes inyectados y encapsulados de manera alterna (el cambio del fluoróforo indica el siguiente dígito) mientras se usan diez concentraciones diferentes de cada fluoróforo. Se muestra un ejemplo en la figura 5b.

Ejemplo 2: Química combinatoria

El nuevo aparato microfluidico 2 se utiliza para preparar muestras que contienen diferentes reactivos para la síntesis combinatoria de moléculas bioactivas. Por ejemplo, el aparato microfluidico 2 puede usarse para mezclar azidas y alquenos para reacciones de "química de clic" (por ejemplo, Cicloadición 1,3-Dipolar de Huisgen) de una manera combinatoria. En este enfoque, una serie de alquenos (n) y varias azidas (z) se inyectan continuamente en el aparato microfluidico 2. Usando una secuencia predefinida de configuraciones de válvulas, todos los posibles pares de alqueno-azidas se coencapsulan en las gotitas de producto. Aguas abajo de la etapa de encapsulación, las gotitas de producto se incuban a temperatura elevada durante un período de tiempo suficiente para obtener los productos de las reacciones químicas.

Posteriormente, las gotitas de producto se mezclan con reactivos de ensayo para probar la actividad biológica de los productos recién generados. Para este fin, las gotitas de producto se fusionan con gotitas que contienen todos los reactivos de ensayo (por ejemplo, una diana de fármaco y un sustrato fluorogénico que permite controlar su actividad) antes de realizar una lectura de fluorescencia en el chip. Las gotitas de producto combinadas con los reactivos de ensayo que muestran una señal de fluorescencia específica (por ejemplo, intensidades de fluorescencia particularmente altas/bajas) indican una potente inhibición de la diana del fármaco por un compuesto recién sintetizado.

Aunque todas las composiciones de muestra se generan en una secuencia predefinida y el orden de las gotitas resultantes se mantiene constante durante todo el experimento, se puede desear un código de barras adicional de las muestras usando gotitas de codificación y se puede lograr como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 3: Detección de combinaciones de fármacos potentes

Muchas enfermedades no se pueden curar basándose en la aplicación de un solo fármaco que actúa sobre un solo fármaco diana. Por ejemplo, las infecciones por VIH generalmente se tratan con terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA). En este enfoque, se administran al mismo tiempo cócteles de fármacos dirigidos a diferentes proteínas víricas (por ejemplo, transcriptasa inversa, proteasa del VIH o la proteína Envelope) para evitar la generación de mutantes resistentes. De manera similar, el tratamiento del cáncer o de las bacterias multirresistentes a menudo implica la aplicación de cócteles de fármacos.

El aparato microfluidico 2 de la presente divulgación se puede utilizar para encapsular sistemáticamente todas las combinaciones posibles de un número dado de fármacos en gotitas y monitorizar sus efectos potencialmente

acumulativos sobre un patógeno coencapsulado (también infundido a través de una de las entradas del dispositivo). Después de la generación de la muestra y un tiempo de incubación que permite la proliferación del patógeno, las gotitas de producto 7 y su contenido se mezclan con reactivos de ensayo para una lectura de viabilidad. Para este fin, las gotitas de producto 7 se fusionan con gotitas de reactivo que contienen todos los reactivos de ensayo (por ejemplo, acoplado la viabilidad del patógeno con una señal de fluorescencia) antes de realizar una lectura de fluorescencia en el chip. Las gotitas fusionadas que muestran una señal de fluorescencia específica (por ejemplo, intensidades de fluorescencia particularmente altas/bajas) indican la eliminación eficaz del patógeno mediante un cóctel de fármacos específico.

10 Se puede desear un código de barras opcional de las muestras y se puede lograr como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4: Estudio de las vías celulares mediante perturbaciones químicas

15 El aparato microfluido 2 de la presente divulgación se usa para analizar y mapear vías celulares y/o interacciones de diferentes factores celulares (por ejemplo, proteínas). Para este fin, las vías se alteran utilizando combinaciones de compuestos inhibidores o estimulantes conocidos (con respecto a un determinado fenotipo). Posteriormente se realiza una lectura para analizar si la combinación de compuestos da como resultado efectos acumulativos, saturados o competitivos (en comparación con el efecto de compuestos individuales). Por ejemplo, si la combinación de dos inhibidores no media una inhibición más fuerte que cada uno de los dos inhibidores individualmente, parece muy probable que sus objetivos estén involucrados en la misma vía. Por el contrario, en caso de que se observe un efecto acumulativo (aumentado), es más probable que los objetivos estén involucrados en dos vías diferentes que no están directamente vinculadas. El cribado sistemático de combinaciones de inhibidores y estímulos permite, por tanto, derivar mapas de interacción detallados de vías celulares.

25 El aparato microfluido 2 de la presente divulgación se puede utilizar para encapsular sistemáticamente todas las combinaciones posibles de un conjunto de diferentes inhibidores y estímulos en gotitas y monitorizar sus efectos en células coencapsuladas (también infundidas a través de una de las entradas del dispositivo). Después de su generación, las muestras en las gotitas de producto 7 se incuban para permitir la inhibición o estimulación de sus correspondientes dianas celulares. Posteriormente, el contenido de las gotitas de producto 7 se mezcla con reactivos de ensayo permitiendo controlar el fenotipo. Por ejemplo, las gotitas de producto 7 se fusionan con gotitas de reactivo que contienen todos los reactivos de ensayo (por ejemplo, acoplado la inhibición de vías celulares con una señal de fluorescencia) antes de que se realice una lectura de fluorescencia en el chip. La lectura cuantitativa de las señales de fluorescencia permite determinar si la combinación de compuestos da como resultado efectos acumulativos, saturados o competitivos y, por lo tanto, permite derivar un mapa de interacción detallado (con respecto a los objetivos de los compuestos).

Se puede desear un código de barras opcional de las muestras y se puede lograr como se describe en el ejemplo 1.

40 También es posible proporcionar una pluralidad de uniones en T conectadas a una pluralidad de redes de canales de sustancia líquida.

Ejemplo 5: Mezclas combinatorias

45 El aparato microfluido de la divulgación se puede usar para generar mezclas combinatorias. En la figura 6a-c se muestra un ejemplo en el que se utilizan cuatro concentraciones diferentes de un colorante fluorescente como sustancias líquidas. La figura 6a muestra en el eje x las concentraciones del colorante (25 μm , 50 μm , 100 μm y 200 μm) y en el eje y el grado de fluorescencia en unidades arbitrarias (U.A.). Se ajustó una línea de regresión a los datos y se representó mejor con la ecuación $y = 0,0028x - 0,1033$.

50 La figura 6b muestra el resultado de mezclar varias combinaciones de dos de las concentraciones del colorante en cantidades aproximadamente iguales. Los cuadrados muestran los valores teóricos calculados a partir de la ecuación y los rombos muestran los resultados medidos reales. De manera similar, la figura 6c muestra los resultados de mezclar tres de las concentraciones de la matriz en cantidades aproximadamente iguales. Los resultados experimentales están sustancialmente de acuerdo con los resultados teóricos calculados. Esto muestra que la mezcla combinatoria puede tener lugar en la red de canales microfluidicos 30.

Ejemplo 6: Combinación con microscopio

60 Además, es posible combinar el canal de gotitas 20 con un microscopio u otras configuraciones de investigación o experimentales para investigar los compuestos generados en la secuencia de gotitas. La secuencia de gotitas también puede usarse para experimentos adicionales y puede aplicarse a sistemas biológicos y no biológicos dispuestos dentro de la red de microcanales.

REIVINDICACIONES

1. Un aparato microfluídico (2) para proporcionar una o más sustancias líquidas a una red de canales microfluídicos (30), comprendiendo el aparato microfluídico (2) una red de canales microfluídicos (30) de al menos una primera entrada de sustancia líquida (401, 411, 421, 431, 441) para proporcionar una primera sustancia, y al menos una segunda entrada de sustancia líquida (405, 415, 425, 435, 445) para proporcionar una segunda sustancia, en donde la primera y la segunda entrada de sustancia líquida terminan en un canal de combinación (33) que está conectado a una unión de generación de gotitas (3) para formar gotitas en un líquido inmiscible, proporcionado por un canal de líquido de separación (10) a la unión de generación de gotitas (3), y al menos un dispositivo de entrada para aplicar continuamente una presión constante o un flujo continuo a la al menos una primera sustancia líquida en la al menos una primera entrada de sustancia líquida (401, 411, 421, 431, 441) y la al menos una segunda sustancia en la al menos una segunda entrada de sustancia (405, 415, 425, 435, 445), en donde al menos una primera válvula de entrada (402, 412, 422, 432, 442) está conectada a la al menos una primera entrada de sustancia líquida (401, 411, 421, 431, 441) y al menos una segunda válvula de entrada (406, 416, 426, 436, 446) que está conectada a la al menos una segunda entrada de sustancia líquida (405, 415, 425, 435, 445), pudiéndose conmutar ambas válvulas de entrada entre una primera posición, en la que una conexión de líquido a la red de canales microfluídicos (30) está abierta, y una segunda posición, en la que la conexión de líquido a la red de canales microfluídicos (30) está cerrada, **caracterizado por** el aparato microfluídico comprende un primer drenaje de sustancia líquida (409, 419, 429, 439, 449) conectado de manera fluida a la primera entrada de sustancia (401, 411, 421, 431, 441) y una primera válvula de drenaje (403, 413, 423, 433, 443) relacionada con el primer drenaje de sustancia líquida (409, 419, 429, 439, 449), en donde el drenaje de sustancia líquida está abierto en una segunda posición, pudiéndose conmutar la primera válvula de drenaje (403, 413, 423, 433, 443) de modo que la primera válvula de drenaje (403, 413, 423, 433, 443) está abierta, cuando la primera válvula de entrada (402, 412, 422, 432, 442) está en la segunda posición para dirigir un flujo constante al primer drenaje de sustancia líquida, y la primera válvula de drenaje (403, 413, 423, 433, 443) está cerrada cuando la primera válvula de entrada (402, 412, 422, 432, 442) está en la primera posición.
2. El aparato microfluídico de la reivindicación 1, en donde la unión de generación de gotitas está conectada a un canal de gotitas (20).
3. El aparato microfluídico de la reivindicación 2, en donde el canal de líquido de separación (10) y el canal de gotitas (20) se utilizan llenos de un líquido de separación de un aceite inmiscible.
4. El aparato microfluídico de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la primera sustancia líquida es al menos uno de una solución acuosa, un disolvente orgánico o una combinación de los mismos que comprende una primera sustancia.
5. Un método para proporcionar una secuencia de gotitas (7) de una o más sustancias líquidas entre un líquido de separación, comprendiendo el método:
- proporcionar un aparato microfluídico según cualquiera de las reivindicaciones 1-4;
 - proporcionar un primer líquido de separación a la primera entrada de sustancia líquida (401, 411, 421, 431, 441) y al menos una segunda sustancia a la segunda entrada de sustancia líquida (405, 415, 425, 435, 445);
 - aplicar una presión constante o un flujo continuo a la al menos una primera sustancia líquida en la al menos una primera entrada de sustancia líquida (401, 411, 421, 431, 441) y la al menos segunda sustancia en la al menos segunda entrada de sustancia (405, 415, 425, 435, 445);
 - conmutar la al menos una primera válvula de entrada (402, 412, 422, 432, 442) que está conectada a la al menos una primera entrada de sustancia líquida (401, 411, 421, 431, 441) y la al menos una segunda válvula de entrada (406, 416, 426, 436, 446) que está conectada a la al menos segunda entrada de sustancia líquida (405, 415, 425, 435, 445), entre una primera posición en la que una conexión de líquido a la red de canales microfluídicos (30) está abierta y una segunda posición en la que la conexión de líquido a la red de canales microfluídicos (30) está cerrada;
 - conmutar la primera válvula de drenaje (413, 413, 423, 433, 443) relacionada con el primer drenaje de sustancia líquida (409, 419, 429, 439, 449);
 - proporcionar al menos una de una primera sustancia líquida y al menos una segunda sustancia líquida a través del canal de combinación (30) a la unión de generación de gotitas (3) y
 - generar una secuencia de gotitas de la sustancia líquida proporcionada en el líquido de separación en el canal de gotitas,
- caracterizado por que** conmutar la al menos una primera válvula de entrada (402, 412, 422, 432, 442) comprende conmutar entre la primera posición, en la que un drenaje de sustancia líquida (409, 419, 429, 439, 449) está cerrado y la conexión de líquido a la unión de generación de gotitas está abierta, y la segunda posición, en la que el drenaje de sustancia líquida (409, 419, 429, 439, 449) está abierto y la conexión de líquido a la unión de generación de gotitas (3) está cerrada;
- conmutar la primera válvula de drenaje (403, 413, 423, 433, 443) comprende conmutar entre una primera posición,

en donde el primer drenaje de sustancia líquida (409, 419, 429, 439, 449) está cerrado, y una segunda posición, en donde el drenaje de sustancia líquida está abierto; y en donde la primera válvula de entrada (402, 412, 422, 432, 442) y la primera válvula de drenaje (403, 413, 423, 433, 443) se activan alternativamente.

5 6. El método para proporcionar una secuencia de gotitas según la reivindicación 5, en donde la secuencia de gotitas es una secuencia codificante de gotitas, en donde las gotitas individuales de la secuencia de gotitas se encuentran entre un líquido de separación continuo, comprendiendo el método:

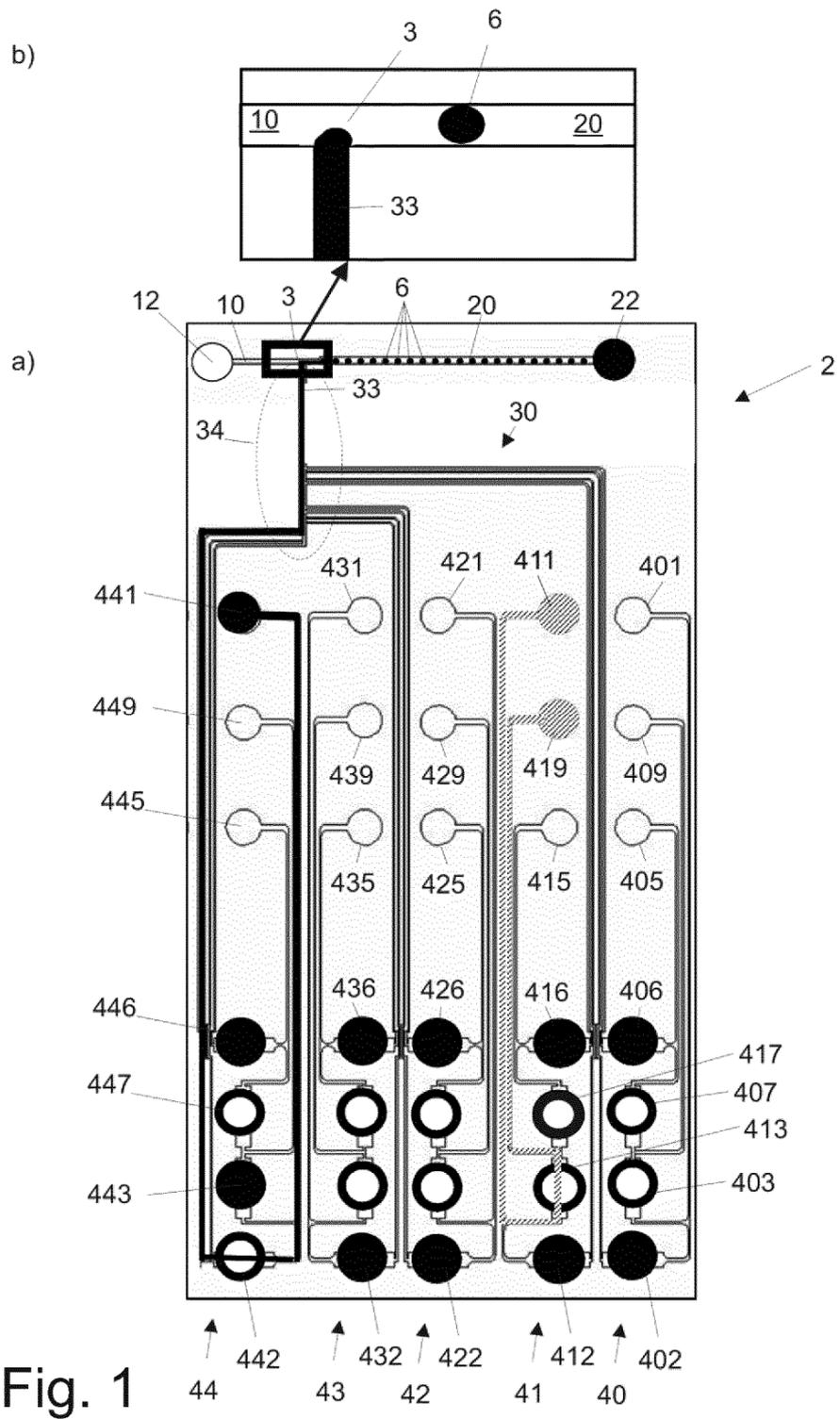
10 - formar selectivamente en la unión de generación de gotitas (3) gotitas de la primera sustancia líquida y de la al menos una segunda sustancia líquida para generar una secuencia predeterminada de gotitas; en donde la secuencia predeterminada de gotitas se usa como codificación.

15 7. El método de la reivindicación 6, en donde al menos una de la primera sustancia líquida y la al menos una segunda sustancia líquida está teñida y la codificación es una codificación de colores.

8. El método de la reivindicación 7, en donde la primera sustancia líquida se tiñe con un primer colorante y la al menos una segunda sustancia líquida se tiñe con un segundo colorante.

20 9. El método de las reivindicaciones 7 u 8, que comprende además detectar ópticamente la secuencia codificante de gotitas.

10. Un uso de un aparato microfluídico de una de las reivindicaciones 1 a 4 para generar secuencias de gotitas de una o más sustancias.



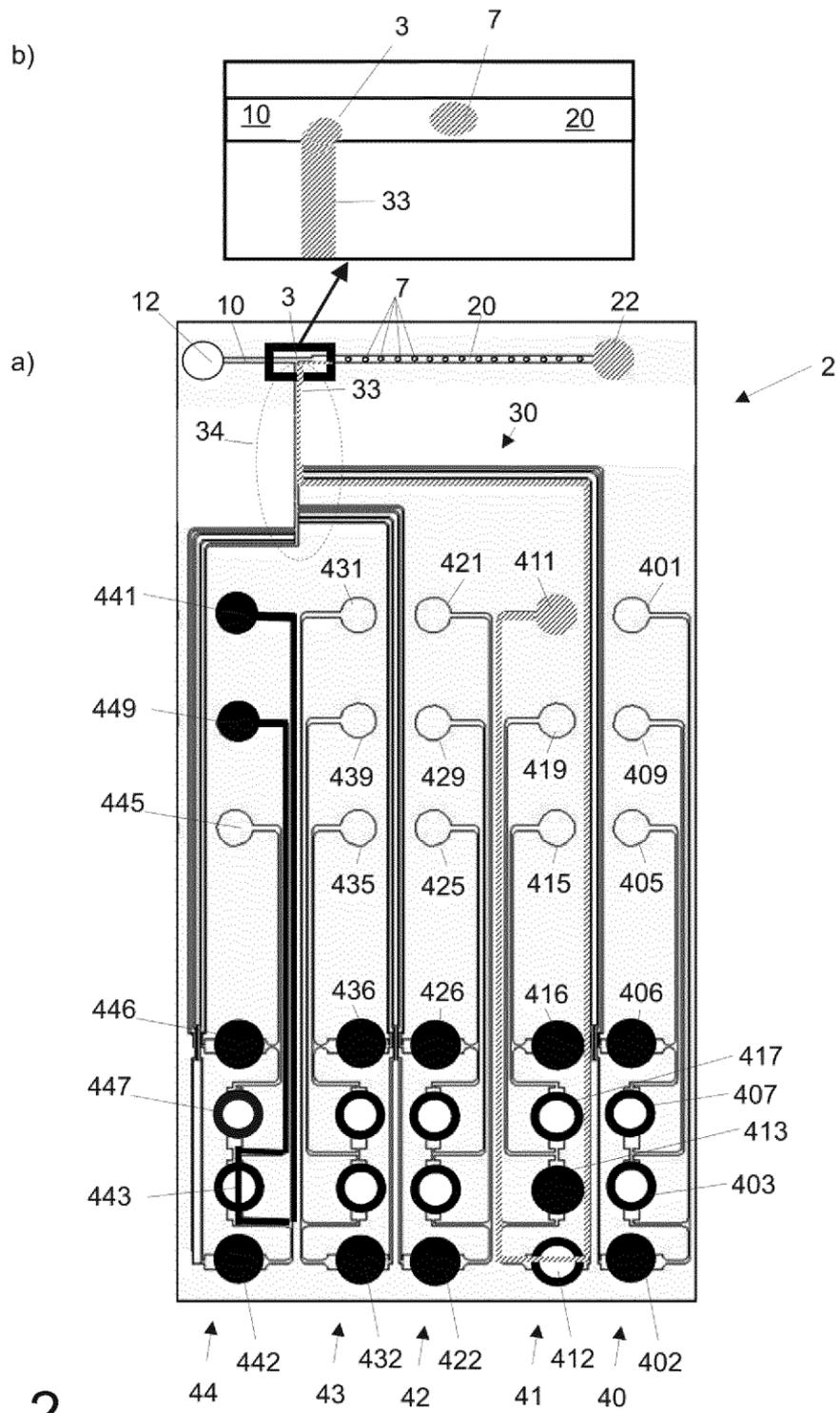


Fig. 2

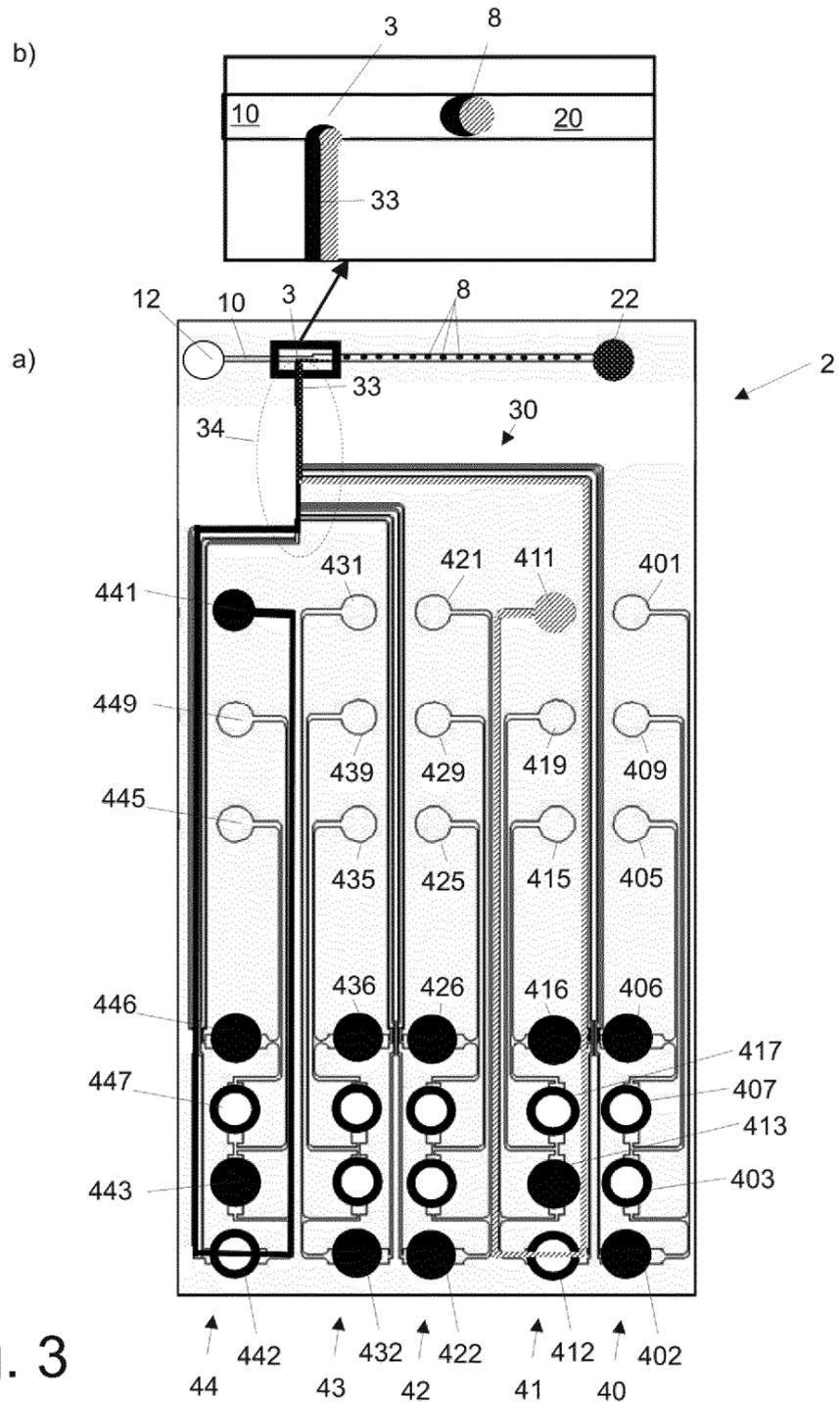


Fig. 3

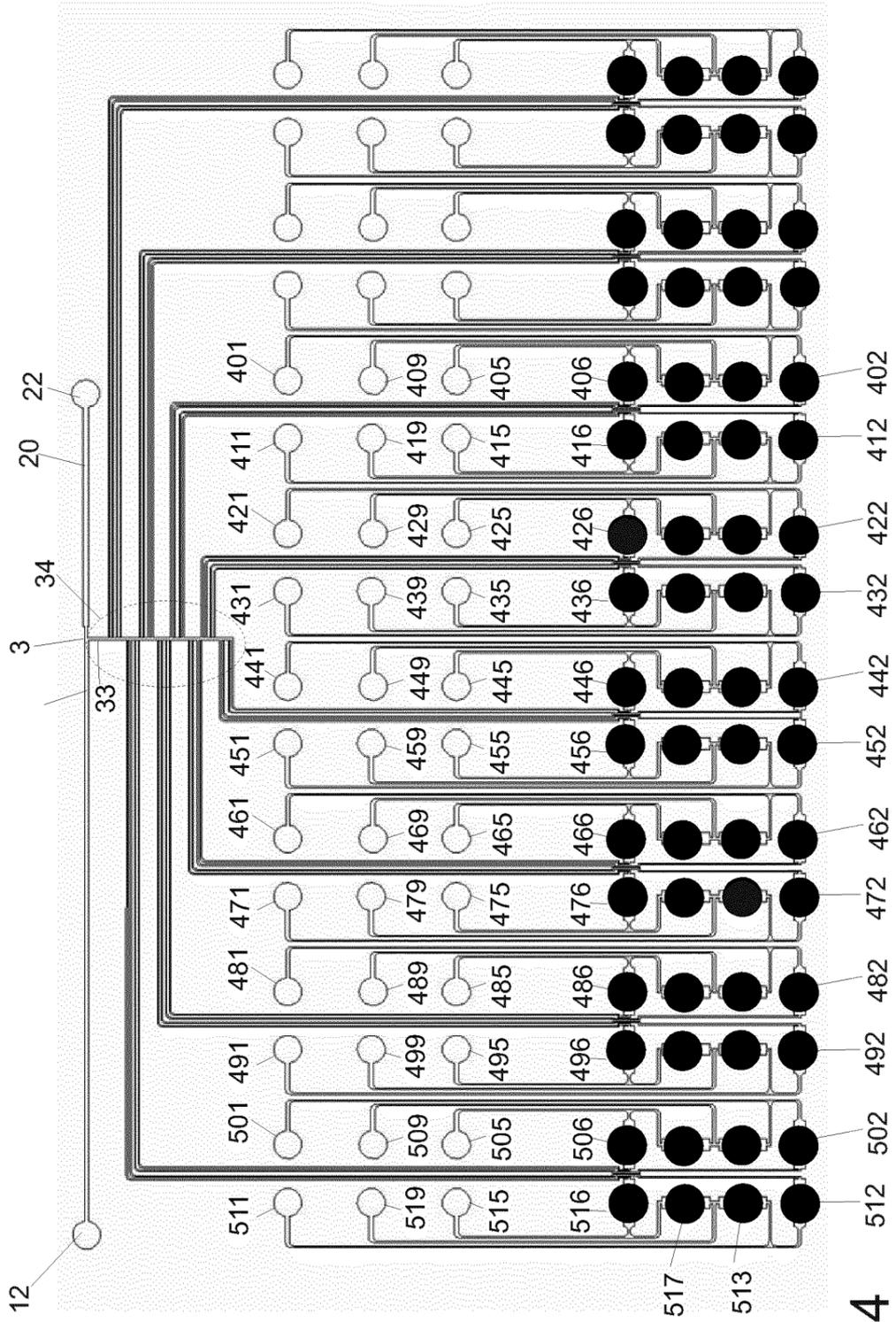


Fig. 4

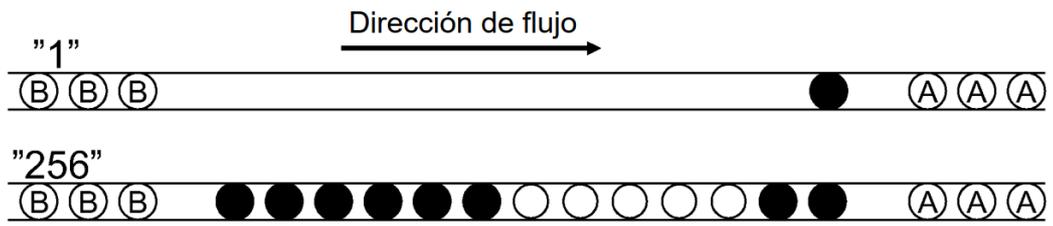


Fig. 5a

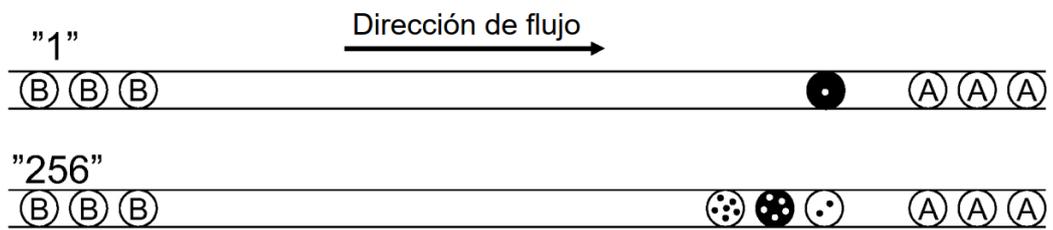


Fig. 5b

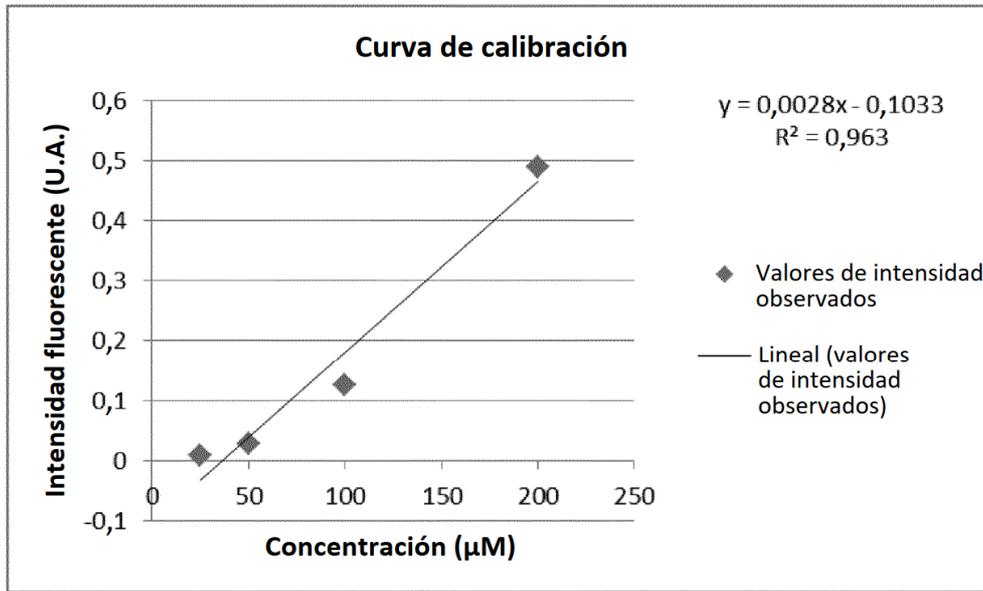


Fig. 6a

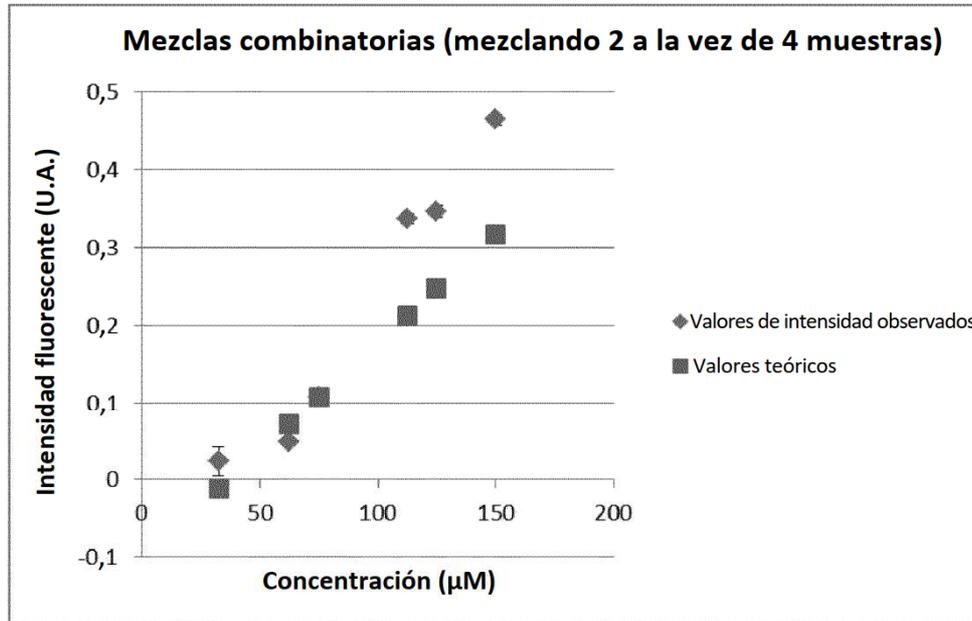


Fig. 6b

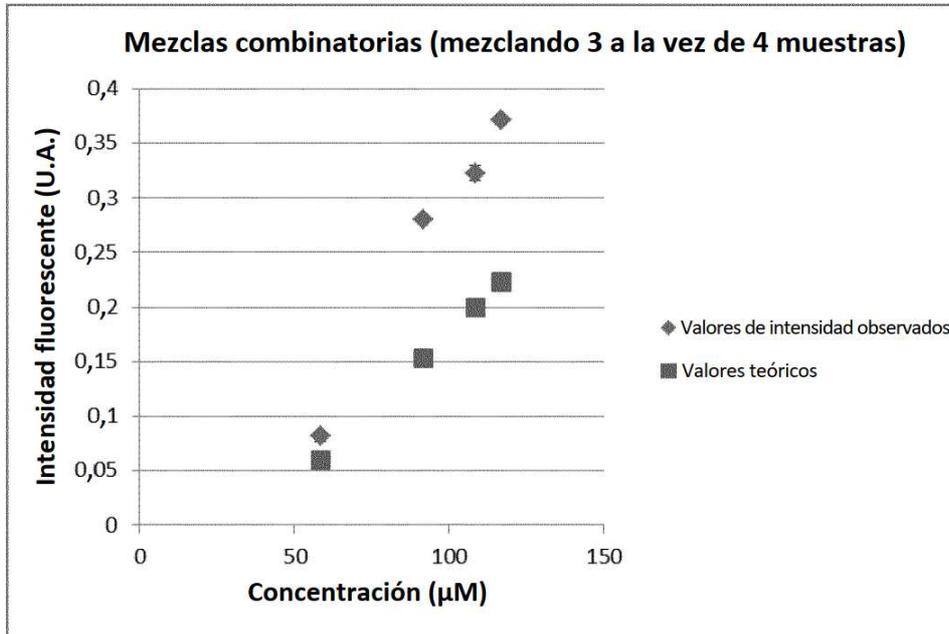


Fig 6c