



(10) **DE 10 2011 077 905 A1** 2012.12.27

(12)

## Offenlegungsschrift

(21) Aktenzeichen: **10 2011 077 905.1**

(22) Anmeldetag: **21.06.2011**

(43) Offenlegungstag: **27.12.2012**

(51) Int Cl.: **G01N 33/58 (2011.01)**  
**G01N 15/06 (2011.01)**

(71) Anmelder:

**Siemens Aktiengesellschaft, 80333, München, DE**

(72) Erfinder:

**Helou, Michael Johannes, 93051, Regensburg, DE; Reisbeck, Mathias, 93083, Obertraubling, DE; Tedde, Sandro Francesco, 91058, Erlangen, DE; Hayden, Oliver, 91074, Herzogenaurach, DE**

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht  
gezogene Druckschriften:

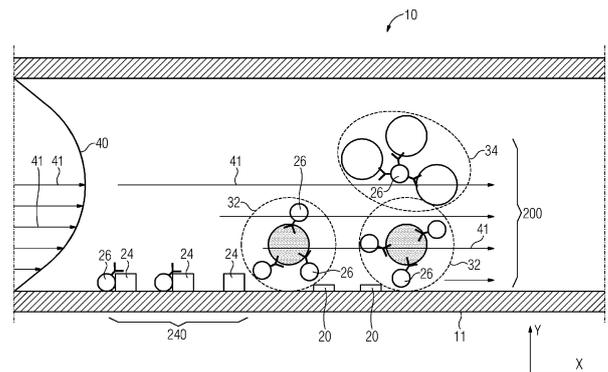
<b>DE</b>	<b>103 20 869</b>	<b>A1</b>
<b>DE</b>	<b>10 2004 062 534</b>	<b>A1</b>
<b>DE</b>	<b>10 2009 005 925</b>	<b>A1</b>
<b>DE</b>	<b>10 2009 012 108</b>	<b>A1</b>
<b>DE</b>	<b>10 2009 047 801</b>	<b>A1</b>
<b>US</b>	<b>7 807 454</b>	<b>B2</b>
<b>US</b>	<b>2002 / 0 036 141</b>	<b>A1</b>

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

(54) Bezeichnung: **Hintergrundfreie magnetische Durchflusszytometrie**

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung und ein Verfahren zur magnetischen Durchflusszytometrie. Dabei werden magnetische Einheiten (22, 24) in einem Durchflusskanal (10) angeordnet, welcher hinsichtlich Kanaldurchmesser (100) und Oberflächenbeschaffenheit der Kanalinnenwand so ausgestaltet ist, dass ein Fluss einer komplexen Suspension in dem Durchflusskanal (10) mit laminarem Strömungsprofil (40) erzeugbar ist. Die durch die magnetischen Einheiten (22, 24) bewirkbaren ( $F_M$ ) und die durch den Fluss bewirkbaren Kräfte ( $F_S$ ) auf nicht an Zellen gebundene magnetische Marker (26) bewirken, dass diese nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker (26) im vorderen Kanalabschnitt (240) zurückgehalten werden und nicht über die Zelleinrichtung (20) im weiteren Verlauf des Durchflusskanals (10) fließen.



## Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft die Durchflussszytometrie, insbesondere die magnetische Zellmessung

**[0002]** Im Bereich der Zellmessung und Zelldetektion sind neben optischen Messverfahren, wie Streulicht- oder Fluoreszenzmessung, auch magnetische Detektionsverfahren bekannt, bei denen die zu detektierende Zellsorte mittels magnetischer Labels markiert wird.

**[0003]** Insbesondere sind zur magnetbasierten Messung Verfahren bekannt, bei denen magnetisch markierte Zellen mittels Magnetophorese aus einer komplexen Zellsuspension, z. B. einer Blutprobe, aussortiert werden. Die magnetische Markierung erfolgt insbesondere dadurch, dass zellspezifische Marker in die komplexe Zellprobe eingeführt werden. Mittels Magnetophorese können magnetisch markierte Zellen oder allgemein magnetische Partikel im Durchfluss geführt, bzw. gelenkt und dadurch sortiert werden.

**[0004]** Für die Zellmessung in der Diagnostik und Wissenschaft ist es notwendig, dass gerade auch Zelltypen, die in nur sehr geringen Konzentrationen in einer Blutprobe vorliegen, wie beispielsweise disseminierte Tumorzellen, vermessen werden. Für die Quantifizierung von Zellkonzentrationen oder auch für einen verlässlichen Nachweis bestimmter Zellen ist daher eine Einzelzelldetektion anzustreben. Es ist bekannt, dass dafür eine vorhergehende Anreicherung der zu bestimmenden Zellen aus einer Suspension mit komplexem Hintergrund notwendig ist. Dies allein führt in den meisten Fällen jedoch noch nicht zu ausreichender Spezifität der Messung. Gerade da die magnetische Zellmessung mit einer sehr einfachen Probenvorbereitung durch Hinzufügen der zellspezifischen Marker einhergeht, stellt sich bei der magnetischen Durchflussszytometrie das Problem, dass ungebunden magnetische Marker stets ein Hintergrundsignal hervorrufen. Dieser Hintergrund führt beispielsweise zu falsch positiven Detektionssignalen.

**[0005]** Es ist Aufgabe der vorliegenden Erfindung ein durch ungebundene magnetische Marker hervorgerufenen Hintergrundsignal in der magnetischen Durchflussszytometrie zu minimieren.

**[0006]** Die Aufgabe wird durch eine Vorrichtung gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Ein Verfahren zur magnetischen Durchflussszytometrie wird in Patentanspruch 9 angegeben. Ein Herstellungsverfahren für eine erfindungsgemäße Vorrichtung wird in Patentanspruch 15 angegeben. Vorteilhafte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der Unteransprüche.

**[0007]** Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur magnetischen Durchflussszytometrie umfasst einen Durchflusskanal, eine erste magnetische Einheit zur Anreicherung und eine zweite magnetische Einheit zur Ausrichtung magnetisch markierter Zellen sowie wenigstens eine Zellmesseinrichtung. Die magnetischen Einheiten sind in einem bezüglich der Durchflussrichtung vorderen Kanalabschnitt angeordnet. Der Durchflusskanal ist hinsichtlich des Kanaldurchmessers und der Oberflächenbeschaffenheit der Kanalinnenwand so ausgestaltet, dass ein Fluss einer komplexen Suspension in dem Durchflusskanal mit laminarem Strömungsprofil erzeugbar ist. Der Durchflusskanal ist weiter so ausgestaltet, dass die durch die magnetischen Einheiten bewirkbaren sowie die durch den Fluss bewirkbaren Kräfte derart auf nicht an Zellen gebundene magnetische Marker wirken, dass diese ungebundenen magnetischen Marker im vorderen Kanalabschnitt zurückhaltbar sind. Dies hat den Vorteil, dass diese ungebundenen Marker die Zellmesseinrichtung, die sich in Flussrichtung weiter hinten im Durchflusskanal befindet, nicht erreichen. Somit werden die nicht an Zellen gebundenen Marker im vorderen Kanalabschnitt zurückgehalten und nicht über die Zellmesseinrichtung im weiteren Verlauf des Kanals fließen und so als Störkomponente eliminiert, womit das Hintergrundsignal, das durch ungebundene magnetische Marker hervorgerufen wird, vermindert wird. Dies hat den Vorteil, dass eine höhere Spezifität bei der Messung der magnetisch markierten Zellen, insbesondere eine Einzelzelldetektion gewährleistet ist.

**[0008]** Insbesondere ist die erste magnetische Einheit in der Vorrichtung so im vorderen Kanalabschnitt angeordnet, dass dadurch ein magnetisches Gradientenfeld erzeugbar ist, welches magnetisch markierte Zellen sowie nicht an Zellen gebundene magnetische Marker innerhalb des Durchflusskanals am Kanalboden anreichert. Die Anreicherung hat den Vorteil, die magnetisch markierten Zellen zur Messung an die Zellmesseinrichtung nahe dem Kanalboden heranzuführen und hat darüber hinaus den Vorteil, die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker an die zweite magnetische Einheit am Kanalboden heranzuführen, durch die, wie im Folgenden beschrieben wird, das Zurückhalten der ungebundenen Marker vorzugsweise begünstigt wird.

**[0009]** Insbesondere ist diese zweite magnetische Einheit so im vorderen Kanalabschnitt angeordnet, dass dadurch magnetisch markierte Zellen innerhalb des Durchflusskanals entlang einer Achse ausgerichtet werden, auf welcher die Zellmesseinrichtung im weiteren Verlauf des Kanals angeordnet ist. Diese Anordnung der zweiten magnetischen Einheit hat den Vorteil eine magnetophoretische Führung der magnetisch markierten Zellen vornehmen zu können, durch die die Zellen ausgerichtet und insbesondere

vereinzelt über die Zellmesseinrichtung geführt werden können.

**[0010]** Diese zweite magnetische Einheit ist außerdem beispielsweise so am Kanalboden angeordnet, dass sie in den Durchflusskanal hineinragt. Dies hat den Vorteil, dass die magnetische Einheit zusätzlich zur magnetischen Kraft auf die magnetischen Marker, besonders die ungebundenen magnetischen Marker auch eine mechanische Behinderung des Weiterflusses dieser magnetischen Marker bewirken kann. Alternativ könnten die Führungstreifen auch in den Kanalboden eingelassen sein, so dass diese kein mechanisches Hindernis für die Strömung darstellen. Dann jedoch muss die magnetische Haltekraft, die auf die ungebundenen Marker wirkt, höher sein oder die Durchflussgeschwindigkeit geringer, um die ungebundenen magnetischen Marker gleichermaßen zuverlässig zurückhalten zu können.

**[0011]** Die zweite magnetische Einheit weist insbesondere magnetische Führungstreifen auf. Diese sind insbesondere aus einem ferromagnetischen Material. Vorzugsweise sind diese magnetischen Führungstreifen in einem Fischgrätenmuster angeordnet. Die Führungstreifen weisen also pfeilförmig in die Mitte des Kanalbodens. Somit werden die magnetisch markierten Zellen besonders effektiv auf diese mittlere Achse entlang des Kanalbodens ausgerichtet, wo sie dann auf die Zellmesseinrichtung zufließen. Um der Filteraufgabe gerecht zu werden, erstrecken sich die Führungstreifen, insbesondere über die gesamte Kanalbreite.

**[0012]** In einer vorteilhaften Ausführungsform der Erfindung ist die zweite magnetische Einheit in der Vorrichtung so ausgestaltet, dass durch diese zweite magnetische Einheit eine magnetische Kraft sowie eine zusätzliche Rückhaltekraft auf die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker bewirkbar sind, die der Scherkraft des Flusses der komplexen Suspension richtungs- und betragsmäßig entgegenwirken. Diese Ausgestaltung der magnetischen Einheit hat also den Vorteil einer Kombination zweier Kräfte auf die ungebundenen Marker, mittels derer diese entgegen der Flussrichtung im Kanal zurückgehalten werden können.

**[0013]** In einer weiteren vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung ist der Durchflusskanal der Vorrichtung hinsichtlich Kanaldurchmesser so ausgestaltet, dass Zellaggregate von mehreren Zellen, die über magnetische Marker aneinander gebunden sind, soweit in die Kanalmitte ragen können, dass durch die auf die Zellaggregate bewirkbaren Kräfte diese Zellaggregate mit der in der Kanalmitte vorherrschenden Durchflussgeschwindigkeit abtransportierbar sind. Diese Ausgestaltung hinsichtlich des Kanaldurchmessers birgt also den weiteren Vorteil, dass auch Zellaggregate nicht zu falschpositiven Signalen

führen, da diese mit der höchsten im Kanal vorherrschenden Durchflussgeschwindigkeit abtransportiert werden. Insbesondere ist der Durchflusskanal hinsichtlich des Durchmessers weiter so ausgestaltet, dass von den Zellaggregaten, die in der Kanalmitte fließen, ein Abstand zur Zellmesseinrichtung, die insbesondere am oder im Kanalboden angeordnet ist, einhaltbar ist, in dem keine Detektion des Zellaggregates hervorrufbar ist. D.h. also, dass der Kanaldurchmesser so groß gewählt ist, dass die Zellaggregate von mehreren Zellen, die über magnetische Marker aneinander gebunden sind, in ausreichend weitem Abstand zur Zellmesseinrichtung an dieser vorbeifließen. Die Sensitivität eines magnetoresistiven Sensors etwa nimmt mit  $1/d^3$  ab, wobei  $d$  für den Abstand zum Sensor steht. Die Zellmesseinrichtung ist zweckdienlicherweise mit einem magnetoresistiven Sensor realisiert. Dieser kann insbesondere ein GMR-Sensor sein (giant magnetoresistance). Von Vorteil ist es mehrere Sensorelemente anzuordnen, welche z. B. Brückenelemente einer Wheatstone-Brückenschaltung sind.

**[0014]** Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren zur magnetischen Durchflusszytometrie wird ein laminarer Fluss einer Zellprobe mit magnetisch markierten Zellen sowie nicht an Zellen gebundenen magnetischen Markern erzeugt. Des Weiteren werden die magnetisch markierten Zellen sowie die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker in einem magnetischen Gradientenfeld dynamisch angereichert. Zusätzlich werden die magnetisch markierten Zellen magnetophoretisch entlang einer Achse ausgerichtet. Die Magnetfeldstärke des magnetischen Gradientenfeldes sowie die Durchflussgeschwindigkeit werden dabei so gewählt, dass die auf nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker wirkenden Kräfte diese Marker im Fluss zurückhalten. Dies hat den Vorteil, dass jeder zurückgehaltene ungebundene Marker nicht zu einem Hintergrundsignal beitragen kann.

**[0015]** Insbesondere werden bei dem Verfahren die magnetischen Marker im Überschuss zu der Zellprobe gegeben. Gerade dadurch entsteht zwar das hohe Hintergrundsignal, aber auch dadurch wird erst gewährleistet, dass sehr spezifische Zellen, die etwa nur in geringer Konzentration in einer Probe vorliegen, ohne weitere Probenvorbereitung zuverlässig markiert werden und demnach selektiv detektiert werden können. Erst durch das Konzept der Herausfiltrierung bzw. Retardierung der überschüssigen magnetischen Marker kann eine zufriedenstellende spezifische Einzelzelldetektion in Zellproben, wie etwa Blut, realisiert werden.

**[0016]** In einer vorteilhaften Ausgestaltung der Erfindung erfolgt in dem Verfahren die Erzeugung des laminaren Flusses der Zellprobe in einem Durchflusskanal, die dynamische Anreicherung zur Kanalinnen-

wand des Kanalbodens hin und die magnetophoretische Ausrichtung entlang einer Achse, wobei die Achse in Flussrichtung entlang der Kanalinnenwand des Kanalbodens verläuft. Durch diesen Achsenverlauf werden die magnetisch markierten Zellen über eine Zellmesseinrichtung geführt. Die Zellprobe wird dabei so an einer magnetischen Einheit an der Kanalinnenwand des Kanalbodens vorbei geführt, dass die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker in dieser Zellprobe an eben dieser magnetischen Einheit zurückgehalten werden.

**[0017]** Vorzugsweise werden in dem Verfahren superparamagnetische Marker als magnetische Marker verwendet.

**[0018]** In einer vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens werden die Magnetfeldstärke des magnetischen Gradientenfeldes und die Durchflussgeschwindigkeit so gewählt, dass die auf Zellaggregate von mehreren über magnetische Marker aneinander gebundene Zellen wirkenden Kräfte bewirken, dass diese Zellaggregate mit der in der Kanalmitte vorherrschenden Durchflussgeschwindigkeit abtransportiert werden. Dies hat den weiteren Vorteil, dass auch die Zellaggregate nicht zu falschpositiven Signalen führen. Insbesondere ist die Kanalmitte, in der sich die Zellaggregate bewegen, so weit von der Zellmesseinrichtung, insbesondere dem magneto-resistiven Sensor an oder in der Kanalwand, entfernt, dass das magnetische Streufeld der Marker in oder um die Zellaggregate nicht detektiert wird.

**[0019]** Bei dem Verfahren wird also insbesondere eine Zellprobe in eine Ausführungsform der oben beschriebenen Vorrichtung injiziert.

**[0020]** Bei dem erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren für eine Vorrichtung zur magnetischen Durchflusszytometrie wird die zweite magnetische Einheit zur Ausrichtung magnetisch markierter Zellen im Durchflusskanal am Kanalboden angeordnet und ragt insbesondere in den Durchflusskanal hinein. Dies hat den Vorteil, gegenüber einer Anordnung im Kanalboden, zusätzlich zur magnetischen Haltekraft auch eine mechanische Rückhaltekraft durch ein Strömungshindernis zu realisieren.

**[0021]** Ein besonderer Vorteil der vorliegenden Erfindung ist, dass durch die Retardierung ungebundener Marker zur Reduzierung des Hintergrundsignals die Einfachheit der Probenvorbereitung für die magnetische Durchflusszytometrie erhalten bleibt. Diese ist ein wesentlicher Vorteil der magnetischen Messung überhaupt. Da für eine ausreichend zuverlässige Markierung der zu detektierenden Zellen ein Überschuss an magnetischen Markern der Probe zugegeben werden muss, ist diese Reduktion des Hintergrunds für eine Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses von noch wesentlicherer Bedeutung.

Als magnetische Marker kommen insbesondere superparamagnetische Label in Frage, die Antikörper aufweisen, über die die superparamagnetischen Label an die Isotope auf der Zelloberfläche selektiv anbinden können. An die Antikörper ist dann z. B. jeweils ein superparamagnetischer Nanopartikel angehängt. Die Nanopartikel weisen insbesondere Durchmesser zwischen 20 und 200 nm auf.

**[0022]** Magnetische Label sind typischerweise sehr klein. Sind diese nicht an Zellen gebunden, weisen sie hydrodynamische Durchmesser von weniger als 500 nm auf. Die einmal am Kanalboden angereicherten derart kleinen magnetischen Einheiten können daher gut über die magnetischen Kräfte retardiert werden, besonders, da am Kanalboden die geringsten Durchflussgeschwindigkeiten herrschen. Gewählte Durchflussgeschwindigkeiten liegen typischerweise unter 5 mm/s. Im Gegensatz zu den ungebundenen Markern weisen markierte Zellen oder größere Magnetbeads Durchmesser von beispielsweise 3 bis 20 µm auf, Zellaggregate weisen dementsprechend noch größere hydrodynamische Durchmesser auf. Je weiter die Partikel in den Mikrofluidikkanal hineinreichen, desto höher die Flussgeschwindigkeit und desto eher werden sie von der laminaren Strömung mitgerissen.

**[0023]** Die magnetische Einheit zur magnetophoretischen Ausrichtung der magnetisch markierten Zellen weist vorteilhafterweise eine fischgrätenartige Struktur auf. Derartige Strukturen haben sich als besonders effektiv erwiesen, magnetisch markierte Zellen zweidimensional an einem Kanalboden so auszurichten, dass sie entlang einer Achse einzeln nacheinander verlaufen und somit auch einzeln über eine Sensoreinheit, wie beispielsweise einen magneto-resistiven Sensor, geführt werden können. Die Zellmesseinrichtung ist beispielsweise als Wheatstone'sche Brückenschaltung ausgeführt und weist mindestens einen, insbesondere mehrere magneto-resistive Sensoren als Brückenelemente auf.

**[0024]** Darüber hinaus ist die fischgrätenartige Struktur nicht ungeeignet, auch ein dementsprechend mechanisches Hindernis für den Fluss der ungebundenen magnetischen Partikel darzustellen und die Retardierung dadurch noch zu unterstützen. Insbesondere bedecken die "Fischgräten" der magnetischen Einheit die gesamte Kanalbreite.

**[0025]** Der Durchflusskanal ist insbesondere ein Mikrofluidikkanal. Der Durchmesser des Kanals ist insbesondere auf die jeweilige Zellprobe angepasst. Je nach zu detektierender Zellart variiert der charakteristische Zelldurchmesser, der jedoch für den Einfluss des Strömungsprofils auf Zellen und Partikel der Suspension von Bedeutung ist.

**[0026]** Ein wesentlicher Bestandteil des Verfahrens ist also insbesondere eine gezielt dynamische Anreicherung von Zellen in einem kleinen Suspensionsvolumen. Die Anreicherung erfolgt in Richtung Mikrofluidikboden über einen externen Magneten. Die wesentlichen Parameter für die stringente Anreicherung der magnetisch markierten Zellen sind neben der Art der magnetischen Marker und deren magnetischem Streufeld, die Durchflussgeschwindigkeit sowie die Mikrofluidikdimensionierung, außerdem die Ausführung der magnetophoretischen Führungslinien, wie beispielsweise deren Winkel zur Flussrichtung und deren magnetisches Moment, sowie das externe magnetische Gradientenfeld.

**[0027]** Durch den vorteilhaften Einsatz einer fischgrätenartigen Magnetophorese wird eine Einzelzell-detektion gewährleistet, indem die Anreicherung in drei Dimensionen erfolgt sowie die zeitgleiche in-situ-Filterung nicht gebundener Marker aus der Suspension. Grenzbedingungen für die in-situ-Filterung sind die Rückhaltekräfte der ferromagnetischen Linien, das externe Magnetfeld sowie die Durchflussgeschwindigkeit und der hydrodynamische Durchmesser der Marker in Relation zum hydrodynamischen Durchmesser des Analyts, d.h. der magnetisch markierten Zelle oder etwa eines magnetischen Beads.

**[0028]** Von besonderem Vorteil ist die Kombination der magnetischen Retardierung der ungebundenen Marker mit der Filterung der Marker an den ferromagnetischen Linien, die sich insbesondere über die gesamte Breite des Kanalbodens erstrecken. Dadurch können die ungebundenen Marker an keiner Stelle an diesen mechanischen Hindernissen vorbeifließen ohne dass sie sich entgegen des externen Magnetfeldes bewegen müssen. Dadurch ist eine dynamische Filterung der ungebundenen Marker gewährleistet.

**[0029]** In einer alternativen Ausführungsform sind die ferromagnetischen Führungstreifen z. B. so angeordnet, dass sie beidseitig an den Kanalwänden beginnen und schräg zur Mitte des Kanals hinlaufen, z. B. in einem Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  relativ zur Kanalwand. Dabei weisen die Führungstreifen, insbesondere in Richtung der Durchflussrichtung. In der Mitte des Kanals berühren sich die Führungstreifen jedoch nicht wie im Fall der Fischgrätestruktur, sondern greifen leicht versetzt ineinander.

**[0030]** Des Weiteren können der Magnetophorese beispielsweise noch weitere ferromagnetische Streifen als Filterstreifen vorgeschaltet sein. D.h. in Durchflussrichtung vor der Magnetophorese verlaufen ferromagnetische Filterstreifen quer über den Kanalboden von einer zur anderen Kanalwand. Diese können senkrecht oder auch in einem beliebigen Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  zu den Kanalwänden angeordnet sein.

**[0031]** Die beschriebene Vorrichtung zur magnetischen Durchflusszytometrie hat den zusätzlichen besonderen Vorteil, dass deren Filterwirkung nach Gebrauch erneuert werden kann, indem das Zytometer regeneriert wird. Dazu kann insbesondere das externe Magnetfeld, das durch die erste magnetische Einheit hervorgerufen wird, entfernt oder ausgeschaltet werden. Zusätzlich kann eine Spülung mit einer sehr hohen Durchflussgeschwindigkeit vorgenommen werden, die die gefilterten Partikel herauswäscht.

**[0032]** Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung werden in exemplarischer Weise mit Bezug auf die [Fig. 1](#) bis [Fig. 6](#) der angehängten Zeichnung beschrieben:

**[0033]** [Fig. 1](#) zeigt einen Querschnitt durch den Durchflusskanal der Vorrichtung,

**[0034]** [Fig. 2](#) zeigt einen Ausschnitt des Querschnitts durch den Durchflusskanal mit der Anordnung der magnetischen Führungslinien und das Flussprofil,

**[0035]** [Fig. 3](#) zeigt eine Draufsicht auf die Anordnung der magnetischen Führungslinien,

**[0036]** [Fig. 4](#) zeigt eine Draufsicht auf die Anordnung der Sensoreinheiten mit dem Durchflusskanal,

**[0037]** [Fig. 5](#) zeigt ein erstes Beispiel für eine Kräfteverteilung auf einen nicht gebundenen magnetischen Marker und

**[0038]** [Fig. 6](#) zeigt ein weiteres Beispiel für eine Kräfteverteilung auf einen nicht gebundenen magnetischen Marker.

**[0039]** Die [Fig. 1](#) zeigt einen Querschnitt durch eine schematische Darstellung eines Durchflusskanals **10**. Dieser weist eine obere Begrenzung und einen Kanalboden **11** auf. Auf der linken Seite ist ein Kanaleinlass **12**, auf der rechten Seite ein Kanalauslass **13** gezeigt. Die Pfeile **14** zeigen die Durchflussrichtung an. Im Kanalboden **11** sind zwei Rechtecke eingezeichnet, die die Zellmesseinrichtung, d.h. die Magnetsensoren **20** darstellen. Unterhalb des Kanalbodens **11** ist entlang der gesamten Kanallänge ein Permanentmagnet **22** gezeichnet. Dieser kann aber auch nur die halbe Länge betragen und sich nur auf den vorderen linken Kanalabschnitt beschränken. Im Kanal **10** sind ellipsenförmig die Zellen **30**, **32** gezeichnet. Dabei werden in der Zeichnung nicht markierte Zellen **30** von markierten Zellen **32** durch unterschiedliche Schraffur unterschieden. Nur die magnetisch markierten Zellen **32** erfahren eine magnetische Kraft in dem Gradientenfeld durch den Permanentmagneten **22** und werden am Kanalboden **11** angereichert, so dass sie sich nahe über den Magnet-

sensor **20** hinweg bewegen. Alle anderen Zellen **30** bewegen sich wesentlich weiter vom Kanalboden **11** entfernt über den Sensor **20** hinweg. Je nach Durchflusgeschwindigkeit **41**, Kanaldurchmesser und magnetischem Moment der Zellmarkierung **26** muss die Länge der Anreicherungsstrecke **240** und somit auch die Länge des Permanentmagneten **22** unterhalb des Durchflusskanals **10** gewählt werden um möglichst alle magnetisch markierten Zellen **32** aus der Suspension am Kanalboden **11** anzureichern. Bei der gezeigten Vorrichtung zur magnetischen Durchfluszytometrie geht es also um eine dynamische Messung, der auch eine dynamische Anreicherung der Zellen **32** vorausgeht. Die dynamische Messung in Kombination mit der dynamischen Anreicherung und der einfachen Probenvorbereitung, die im Wesentlichen nur darin besteht, dass der Zellprobe die magnetischen Marker **26** zugesetzt werden müssen, ist einer der großen Vorteile der magnetischen Durchfluszytometrie im Gegensatz zu anderen Messmethoden der Zelldiagnostik, wie etwa der Fluoreszenzdurchfluszytometrie.

[0040] In der [Fig. 2](#) ist ein Ausschnitt des Querschnitts durch den Durchflusskanal **10** gezeigt. Auf der linken Seite ist schematisch das Flussprofil **40** eingezeichnet. Bei einer laminaren Kanalströmung **40** stellt sich ein im Wesentlichen parabelförmiges Profil ein. Die Pfeile **41** stehen für die Fließgeschwindigkeiten, die sich von der Mitte zum Rand des Kanals **10** hin verringern. Die höchste Durchflusgeschwindigkeit **41** herrscht also im Kanalzentrum vor.

[0041] Im linken Bereich des Kanalabschnitts ist die sogenannte Anreicherungs- und Ausrichtungsstrecke **240** gezeigt. Diese ist also in Flussrichtung **44** vor den Detektionsbereich **20** geschaltet. In diesem vorderen Kanalabschnitt **240** sind also die magnetischen Einheiten, der Permanentmagnet **22** sowie die magnetischen Führungslinien **24** angeordnet. Die magnetischen Führungslinien **24** sind insbesondere ferromagnetische Metallstreifen, z. B. aus Nickel. In der [Fig. 2](#) sind diese Streifen **24** so auf den Kanalboden **11** aufgesetzt, dass sie in den Durchflusskanal **10** hineinragen. In Durchflussrichtung **44** nach diesem vorderen Kanalabschnitt **240** sind die Magnetsensoren **20** gezeigt, über die die magnetisch markierten Zellen **32** geführt werden.

[0042] Die magnetisch markierten Zellen **32** sind wieder schraffiert dargestellt. Es ist jedoch zu unterscheiden, ob es sich um eine sozusagen korrekt magnetisch markierte Zelle **32** handelt, die mehrere magnetische Marker **26** aufweist und sich als einzelne markierte Zelle **32** in der komplexen Suspension bewegt oder ob sich Zellen **30** fälschlicherweise an einen einzelnen magnetischen Marker **26** anhängen und über diesen agglomerieren. Ein derartiges Agglomerat von mehreren Zellen **34**, die über magnetische Marker **26** aneinandergebunden sind, weist ei-

nen wesentlich größeren hydrodynamischen Durchmesser auf als eine einzelne markierte Zelle **32**. Dies ist entscheidend für das unterschiedliche Fließverhalten von einzelnen Zellen **32** und Zellaggregaten **34**. Durch den wesentlich größeren hydrodynamischen Durchmesser weist ein solches Aggregat **34** immer sehr viel weiter in die Kanalmitte hinein, wo die höhere Durchflusgeschwindigkeit **41** vorherrscht. Von dieser hohen Durchflusgeschwindigkeit **41** werden die großen Aggregate **34** mitgerissen und somit vom Kanalboden **11** wieder weiter entfernt, so dass sie in einem zu weiten Abstand **200** vom Sensor **20** an diesem vorbeifließen und daher nicht detektiert werden können. Dies schließt also falschpositive Signale durch Zellagglomerate **34** aus. Somit kann also durch Parameter wie den Durchflusskanaldurchmesser und das Durchflussprofil **40** bzw. die Durchflusgeschwindigkeit **41** die Zellmessung spezifiziert werden. Die Sensitivität des Sensors **20** nimmt mit  $1/d^3$  ab, wobei  $d$  für den Abstand vom Sensor steht.

[0043] Das bei der Messung störende Hintergrundsignal wird im Wesentlichen durch nicht gebundene Marker **26** verursacht, die im Überfluss der Zellprobe zugegeben werden um eine vollständige Markierung aller zu detektierenden Zellen **32** in der Probe zu gewährleisten. Bei den magnetischen Markern **26** handelt es sich beispielsweise um superparamagnetische Label, welche über Antikörper an Isotope auf der Zelloberfläche anbinden. Bei den Magnetsensoren **20** handelt es sich beispielsweise um GMR-Sensoren, wobei GMR für Giant Magneto Resistance steht.

[0044] Die [Fig. 2](#) zeigt schematisch das Filterprinzip der Vorrichtung. Die kleinen ungebundenen Marker **26** weisen nur sehr kleine hydrodynamische Durchmesser auf und nähern sich durch die magnetische Anreicherung nahe dem Kanalboden **11** an. Dort können sie von den ferromagnetischen Streifen **24** sozusagen aus dem Fluss gefiltert und aufgehalten werden. Dabei wirken die ferromagnetischen Streifen **24** zunächst als mechanisches Hindernis im Durchfluss. Die magnetischen Marker **26** müssten sich entgegen des magnetischen Gradientenfeldes des Permanentmagneten **22** bewegen um sich aus dem Magnetfilter zu befreien. Zusätzlich herrschen auch magnetische Haltekräfte  $F_M$  an diesen ferromagnetischen Streifen **24** vor, die die magnetischen Marker **26** retardieren. Die Filtration ist also eine Kombination eines Magnetkraft-  $F_M$  und eines Scherkraftfilters  $F_S$ .

[0045] Die [Fig. 3](#) zeigt nun eine Draufsicht auf den in [Fig. 2](#) gezeigten Kanalausschnitt. Die Durchflussrichtung **44** ist wieder mit einem Pfeil gekennzeichnet. Im vorderen, d.h. in Durchflussrichtung vorderen Bereich des Kanals **10** ist wieder die Anreicherungsstrecke **240** gezeigt. In diesem Bereich verlaufen die ferromagnetischen Führungslinien **24** für die magnetophoretische Anreicherung und Ausrichtung der

magnetisch markierten Zellen **32**. Die magnetischen Führungslinien **24** sind in einem besonders vorteilhaften Fischgrätenmuster angeordnet, welches von den Kanalwänden **14** zur Kanalmitte hin spitz zuläuft. Dabei ist es von besonderem Vorteil für einen effektiven Filter für die ungebundenen magnetischen Marker **26**, dass die magnetischen Führungstreifen **24** die komplette Kanalbreite **100** abdecken und keine Lücke offenlassen. Auch der Permanentmagnet **22**, der in der Figur nicht explizit gezeigt ist, da er sich unterhalb des Kanalbodens **11** befindet, erstreckt sich insbesondere über die gesamte Kanalbreite **100**, so dass auf der gesamten Kanalbreite **100** ein gleichförmiges Gradientenfeld auf die magnetischen Partikel **26** in der Suspension wirkt. Besonders vorteilhaft ist es wenn sich der Permanentmagnet **22** über die Kanalbreite **100** hinaus erstreckt, beispielsweise bis zu der gestrichelten Linie, die in der Kanalwand **14** verläuft, so dass dieser innerhalb des Kanals **10** ein gleichmäßiges Gradientenfeld hervorruft.

[0046] Des Weiteren ist in der [Fig. 3](#) eine zentral verlaufende magnetische Führungslinie **24** gezeigt, die die Kanalmitte markiert, und die als die beschriebene Achse angesehen werden kann, auf die die magnetisch markierten Zellen **32** ausgerichtet werden. In gedanklicher Verlängerung dieser Achse befinden sich dann im Durchflusskanal **10** die Magnetsensoren **20**, über die die magnetisch markierten Zellen **32** fließen. Die Figur 3 zeigt auch unmarkierte magnetische Zellen **30**, welche von den magnetischen Maßnahmen unbeeinflusst sind.

[0047] Anstelle magnetisch markierter Zellen **32** können auch Magnetbeads auf diese Weise angereichert und ausgerichtet werden. Auch andere Analyte die magnetisch markiert werden können, kommen für eine derartige Messmethode in Frage.

[0048] Auch in der Fluoreszenzdurchflusszytometrie werden in der Probenvorbereitungsphase fluoreszente Marker im Überfluss zugegeben, welche dann durch Zentrifugations- und Waschschriffe dekantiert werden müssen. Derartige Schritte sind für die magnetische Durchflusszytometrie nicht notwendig, wenn die Parameter der magnetischen Einheiten sowie des Durchflussverhaltens auf die Größe der zu detektierenden magnetischen Zelle geeignet eingestellt werden.

[0049] Die [Fig. 4](#) schließlich zeigt die Anordnung der magnetischen Sensoreinheit mit den magneto-resistiven Elementen **20**, die in einer Wheastone'schen Brückenschaltung miteinander verbunden sind. Dabei sind auch die elektrischen Zuleitungen **21** zu den Magnetowiderständen **20** gezeigt. Der Pfeil zeigt wieder die Durchflussrichtung **44** durch den Durchflusskanal **10** an.

[0050] Die [Fig. 5](#) und [Fig. 6](#) schließlich sollen noch schematisch die auf den nicht gebundenen magnetischen Marker **26** wirkenden Kräfte darstellen. Dafür ist lediglich ein Ausschnitt des Kanalbodens **11** mit einem ferromagnetischen Streifen **24** gezeigt. In der [Fig. 5](#) ist ein magnetischer Marker **26** mit einem Antikörper und einem magnetischen Partikel gezeigt, der über die magnetische Haltekraft  $F_M$  am Kanalboden **11** gehalten wird verursacht durch den ferromagnetischen Streifen **24** zusammen mit dem Gradientenfeld des Permanentmagneten **22**, der sich unterhalb des Kanalbodens **11** befindet. Diese magnetische Kraft  $F_M$  wirkt auf den magnetischen Marker **26** senkrecht in Richtung Kanalboden **11**, und hält diesen an dem Streifen **24** fest. Auf den magnetischen Marker **26** wirken aber auch die Scherkräfte des Flusses der komplexen Suspension  $F_S$ . Diese greifen parallel zum Kanalboden **11**, also in Flussrichtung **44**, an. Die magnetischen Haltekraft  $F_M$  müssen daher größer als die Scherkraft  $F_S$  sein um den magnetischen Marker **26** festzuhalten.

[0051] Die [Fig. 6](#) zeigt schließlich, dass auch die Anordnung des ferromagnetischen Streifens **24** am Kanalboden **11** zur Filterwirkung beiträgt. Der ferromagnetische Streifen **24** ragt in den Durchflusskanal **10** so hinein, dass sich magnetische Marker **26** in Flussrichtung **44** hinter den ferromagnetischen Streifen **24** verfangen können. Dort wirkt die magnetische Kraft  $F_M$  des Permanentmagneten **22**, der sich unterhalb des Kanalbodens **11** befindet, senkrecht zum Kanalboden **11** auf den magnetischen Marker **26**. Die angreifende Scherkraft  $F_S$  des Durchflusses **44** der komplexen Suspension hat so schon eine geringere Angriffsfläche des magnetischen Markers **26** zur Verfügung. Zusätzlich bietet der ferromagnetische Streifen **24** ein Strömungshindernis, was eine zusätzliche Rückhaltekraft  $F_R$  für den magnetischen Marker **26** bedeutet.

[0052] In einem Fluidikkanal **10** von  $0,105 \mu\text{m}^2$  Querschnittsfläche bei einer Durchflussrate von etwa  $1 \mu\text{l/s}$  beträgt die Durchflussgeschwindigkeit **41** in etwa  $1500 \mu\text{m/s}$  und die komplexe Suspension überstreicht die Magnetsensoren **20**. Die Nickelstreifen **24** halten die magnetischen Nanobeads **26** zurück. Nach der Messung soll das Nickelstreifensystem **24** von diesen Nanobeads **26** wieder befreit werden. Dazu wird der Durchflusskanal **10** z. B. mit einer Durchflussrate von  $4 \mu\text{l/s}$  gespült. Dann bewegen sich auch die ungebundenen magnetischen Nanobeads **26** aus dem Filter **24** durch den Kanal **10** hindurch. Zusätzlich zur höheren Durchflussrate kann dazu das externe Magnetfeld minimiert oder ausgeschaltet werden.

[0053] Die [Fig. 7](#) schließlich zeigt noch eine alternative Ausführungsform des Kanals **10** mit versetzten ferromagnetischen Führungstreifen **24**, die sich in der Mitte des Kanals **10** nicht berühren, sondern wie ein Reißverschluss ineinandergreifen. Auch die-

se sind bevorzugt in einem Winkel um die  $45^\circ$  zu den Kanalwänden **14** angeordnet und weisen in Richtung der Durchflussrichtung **44**. Der Magnetophorese **240**, unabhängig von der genauen Ausgestaltung, kann noch ein zusätzlicher Filter **250** vorangehen. Dieser ist also in Durchflussrichtung **44** weiter vorne im Kanal **10** angeordnet, in der **Fig. 7** weiter links. Dazu verlaufen ferromagnetische Streifen **25** quer über den Kanalboden **11** von einer bis zur anderen Kanalwand **14**. Diese sind insbesondere senkrecht oder in einem Winkel zwischen  $0^\circ$  und  $90^\circ$  zu den Kanalwänden **14** angeordnet.

### Patentansprüche

1. Vorrichtung zur magnetischen Durchflusszytometrie mit
  - einem Durchflusskanal (**10**),
  - einer ersten magnetischen Einheit (**22**) zur Anreicherung und
  - einer zweiten magnetischen Einheit (**24**) zur Ausrichtung magnetisch markierter Zellen (**32**) sowie
  - wenigstens einer Zellmesseinrichtung (**20**), wobei die magnetischen Einheiten (**22**, **24**) in einem bezüglich der Durchflussrichtung (**44**) vorderen Kanalabschnitt (**240**) angeordnet sind und der Durchflusskanal (**10**) hinsichtlich Kanaldurchmesser (**100**) und Oberflächenbeschaffenheit der Kanalinnenwand so ausgestaltet ist, dass ein Fluss einer komplexen Suspension in dem Durchflusskanal (**10**) mit lamina-rem Strömungsprofil (**40**) erzeugbar ist, so dass die durch die magnetischen Einheiten (**22**, **24**) bewirkbaren ( $F_M$ ) und die durch den Fluss bewirkbaren Kräfte ( $F_S$ ) derart auf nicht an Zellen gebundene magnetische Marker (**26**) wirken, dass diese nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker (**26**) im vorderen Kanalabschnitt (**240**) zurückhaltbar sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, wobei die erste magnetische Einheit (**22**) so im vorderen Kanalabschnitt (**240**) angeordnet ist, dass dadurch ein magnetisches Gradientenfeld erzeugbar ist, welches magnetisch markierte Zellen (**32**) sowie nicht an Zellen gebundene magnetische Marker (**26**) innerhalb des Durchflusskanals (**10**) am Kanalboden (**11**) anreichert.
3. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei die zweite magnetische Einheit (**24**) so im vorderen Kanalabschnitt (**240**) angeordnet ist, dass dadurch magnetisch markierte Zellen (**32**) innerhalb des Durchflusskanals (**10**) entlang einer Achse ausgerichtet werden, auf welcher die Zellmesseinrichtung (**20**) im weiteren Verlauf des Durchflusskanals (**10**) angeordnet ist.
4. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die zweite magnetische Einheit (**24**) zur Ausrichtung magnetisch markierter Zellen (**32**) am Kanalboden (**11**) angeordnet ist, insbesondere so dass sie in den Durchflusskanal (**10**) hineinragt.
5. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die zweite magnetische Einheit (**24**) magnetische Führungstreifen aufweist, insbesondere ferromagnetische Führungstreifen, wobei sich die magnetischen Führungstreifen über die gesamte Breite des Kanalbodens erstrecken.
6. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die zweite magnetische Einheit (**24**) zur Ausrichtung magnetisch markierter Zellen (**32**) so ausgestaltet ist, dass durch diese zweite magnetische Einheit (**24**) eine magnetische Kraft ( $F_M$ ) sowie eine zusätzliche Rückhaltekraft ( $F_R$ ) auf die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker (**26**) bewirkbar sind, die der Scherkraft ( $F_S$ ) des Flusses der komplexen Suspension richtungs- und betragsmäßig entgegen wirken.
7. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Durchflusskanal (**10**) hinsichtlich Kanaldurchmesser (**100**) so ausgestaltet ist, dass Zellaggregate (**34**) von mehreren über magnetische Marker (**26**) aneinander gebundene Zellen (**30**) so weit in die Kanalmitte ragen können, dass durch die auf die Zellaggregate (**34**) bewirkbaren Kräfte ( $F_M$ ,  $F_S$ ) diese Zellaggregate (**34**) mit der in der Kanalmitte vorherrschenden Durchflussgeschwindigkeit (**41**) abtransportierbar sind.
8. Vorrichtung nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei der Durchflusskanal (**10**) hinsichtlich Kanaldurchmesser (**100**) so ausgestaltet ist, dass von Zellaggregaten (**34**) von mehreren über magnetische Marker (**26**) aneinander gebundene Zellen (**30**), die in der Kanalmitte fließen, ein Abstand (**200**) zur Zellmesseinrichtung (**20**) einhaltbar ist, in dem keine Detektion des Zellaggregates (**34**) hervorrufbar ist.
9. Verfahren zur magnetischen Durchflusszytometrie bei dem
  - ein laminarer Fluss einer Zellprobe (**40**) mit magnetisch markierten Zellen (**32**) sowie nicht an Zellen gebundenen magnetischen Markern (**26**) erzeugt wird,
  - die magnetisch markierten Zellen (**32**) sowie die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker (**26**) in einem magnetischen Gradientenfeld dynamisch angereichert werden,
  - die magnetisch markierten Zellen (**32**) magnetophoretisch entlang einer Achse ausgerichtet werden, wobei die Magnetfeldstärke des magnetischen Gradientenfeldes und die Durchflussgeschwindigkeit (**41**) so gewählt werden, dass die auf nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker (**26**) wirkenden Kräfte ( $F_M$ ,  $F_S$ ) diese im Fluss zurückhalten.

10. Verfahren nach Anspruch 9 bei dem die magnetischen Marker (26) im Überschuss zu der Zellprobe gegeben werden.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10 bei dem

- die Erzeugung des laminaren Flusses der Zellprobe (40) in einem Durchflusskanal (10) erfolgt,
- die dynamische Anreicherung zur Kanalinnenwand des Kanalbodens (11) hin erfolgt und
- die magnetophoretische Ausrichtung entlang einer Achse erfolgt, wobei die Achse in Flussrichtung (44) entlang der Kanalinnenwand des Kanalbodens (11) verläuft, so dass die magnetisch markierten Zellen (32) entlang dieser Achse über eine Zellmesseinrichtung (20) geführt werden,

wobei die Zellprobe (40) so an einer magnetischen Einheit (24) an der Kanalinnenwand des Kanalbodens (11) vorbeigeführt wird, dass die nicht an Zellen gebundenen magnetischen Marker (26) an dieser magnetischen Einheit (24) zurückgehalten werden.

12. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 11, in dem als magnetische Marker (26) superparamagnetische Marker verwendet werden.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 12, wobei die Magnetfeldstärke des magnetischen Gradientenfeldes und die Durchflussgeschwindigkeit (41) so gewählt werden, dass die auf Zellaggregate (34) von mehreren über magnetische Marker (26) aneinander gebundene Zellen (30) wirkenden Kräfte ( $F_M$ ,  $F_S$ ) bewirken, dass diese Zellaggregate (34) mit der in der Kanalmitte vorherrschenden Durchflussgeschwindigkeit (41) abtransportiert werden.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13 bei dem eine Zellprobe in eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 injiziert wird.

15. Herstellungsverfahren für eine Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8 bei dem die zweite magnetische Einheit (24) zur Ausrichtung magnetisch markierter Zellen (32) im Durchflusskanal (10) am Kanalboden (11) angeordnet wird, insbesondere so dass sie in den Durchflusskanal (10) hineinragt.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG 1

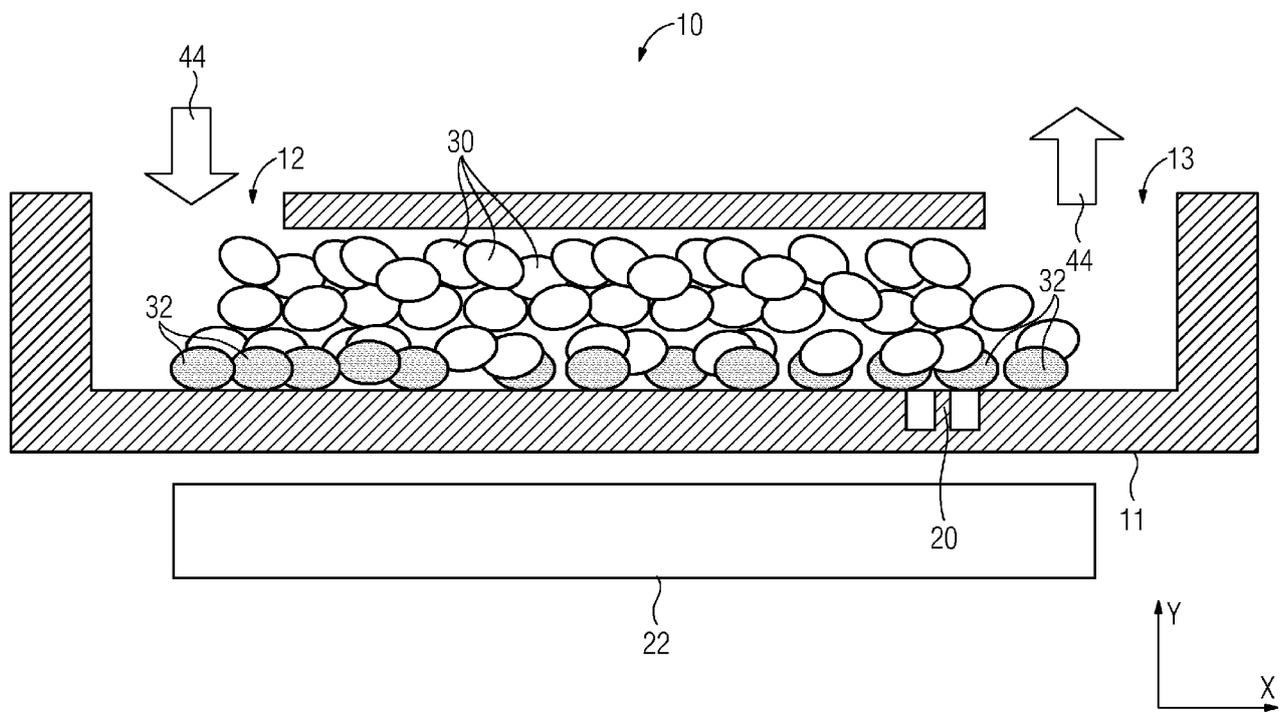


FIG 2

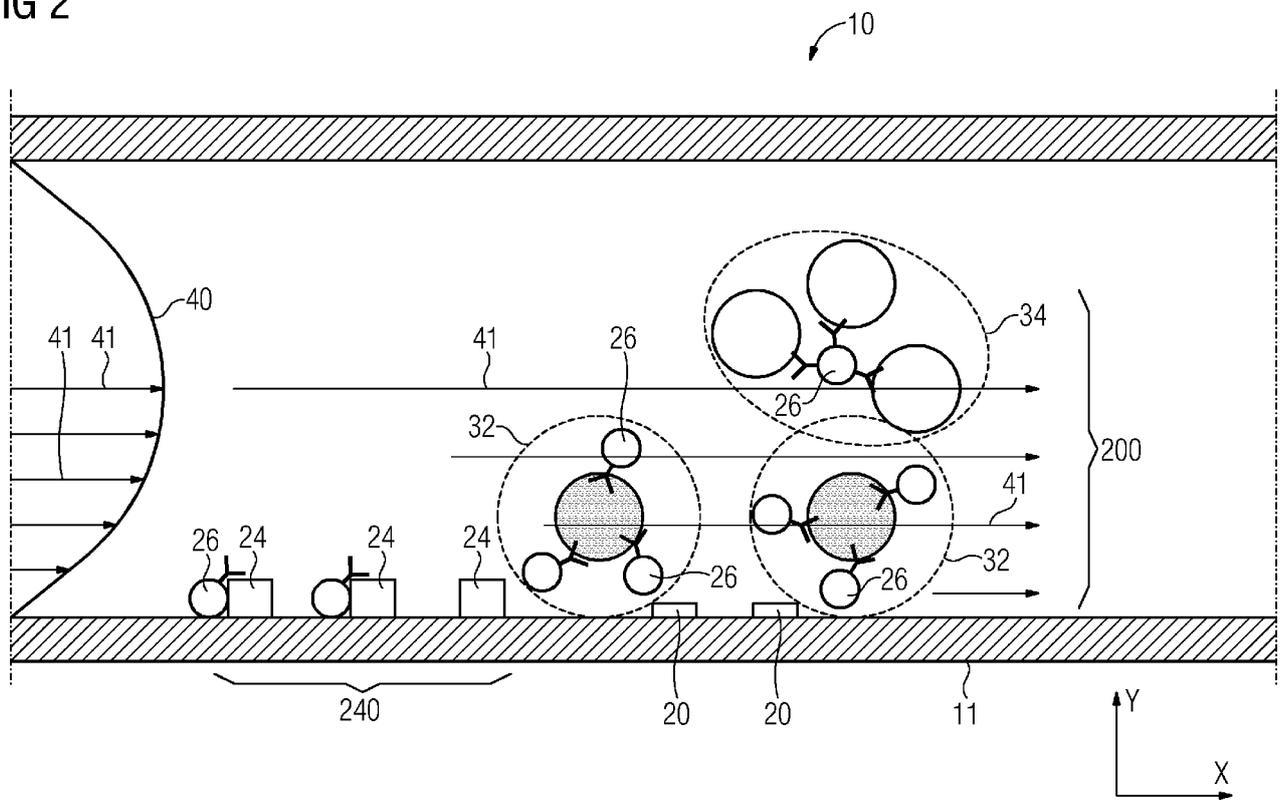


FIG 3

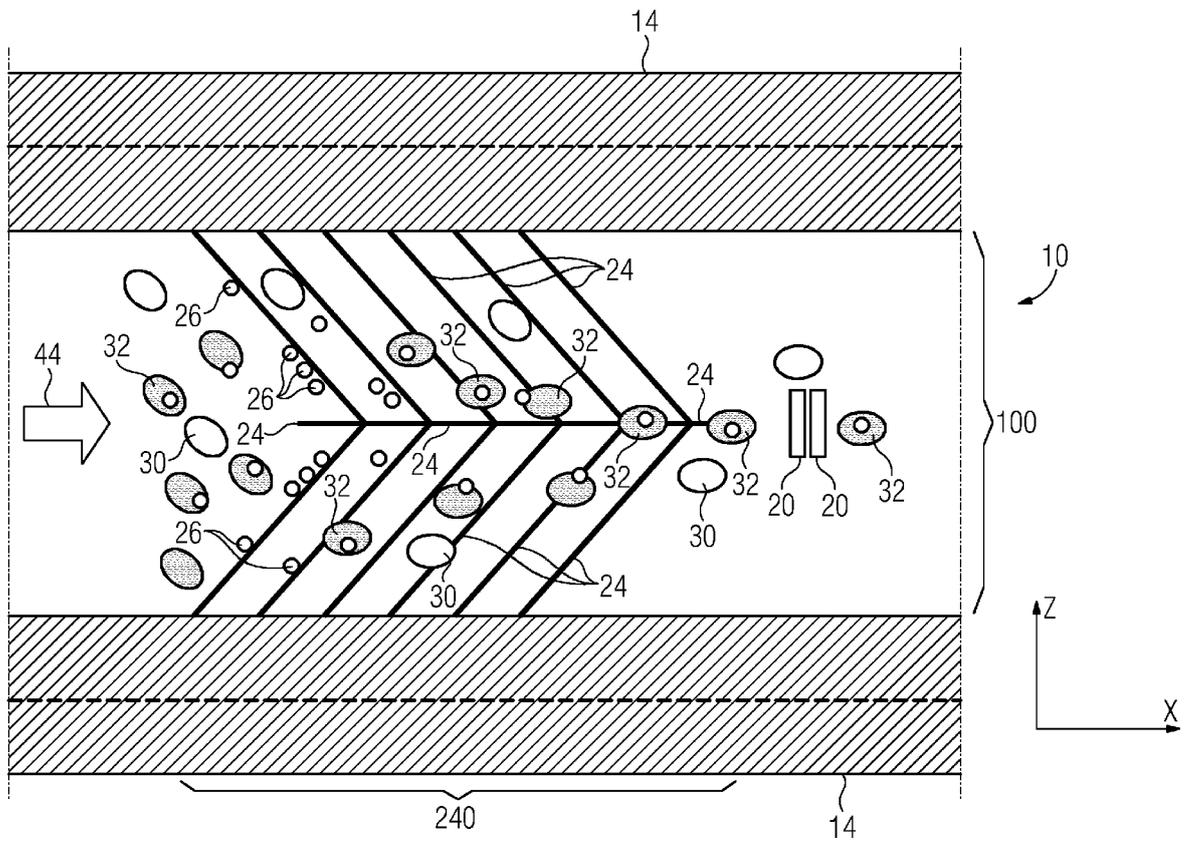


FIG 4

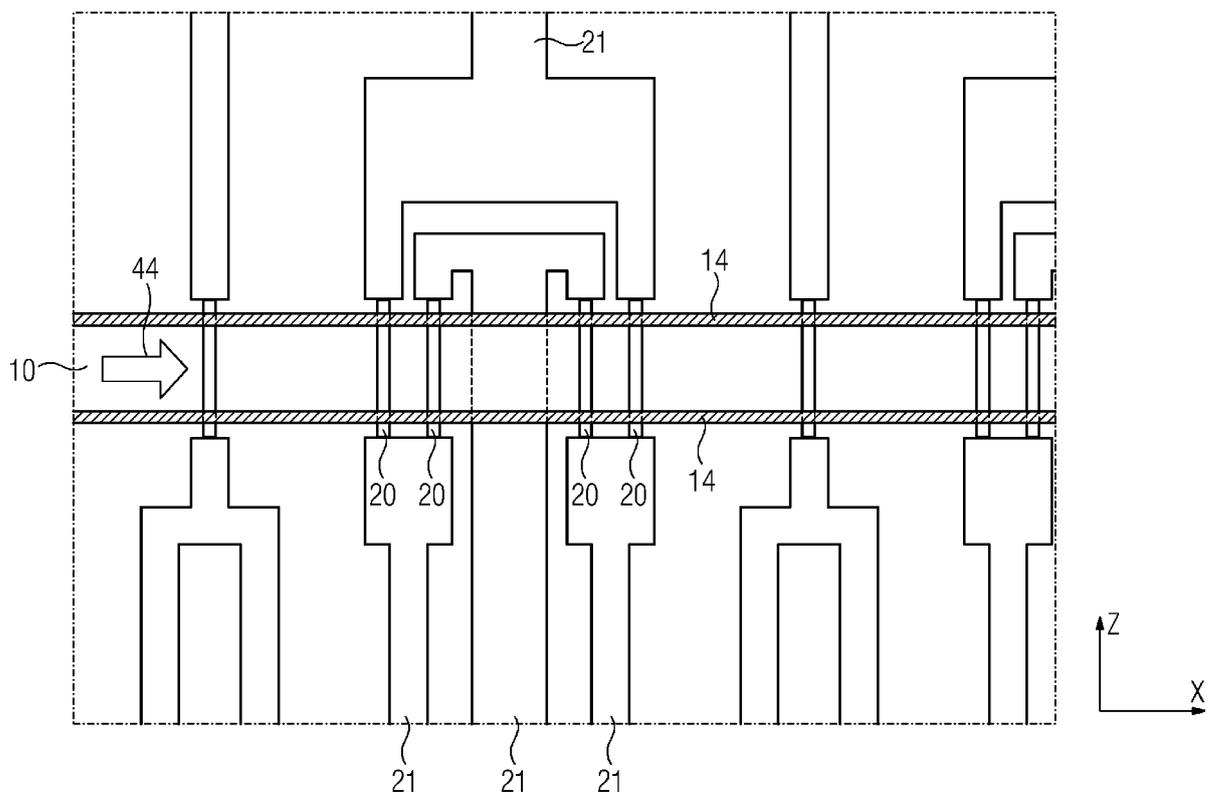


FIG 5

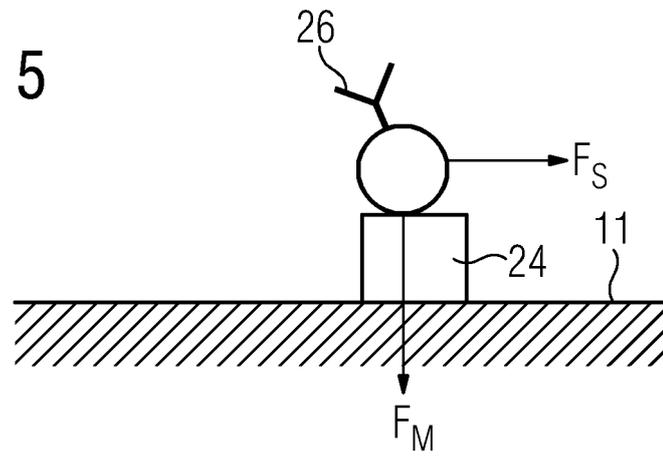


FIG 6

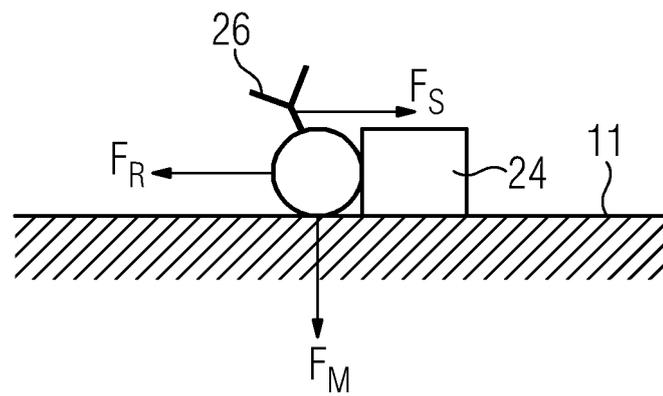


FIG 7

