

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 483 765**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2009 E 09756171 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2344624**

54 Título: **Cámara de separación**

30 Prioridad:

**02.10.2008 IT BO20080602**

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

**07.08.2014**

73 Titular/es:

**SILICON BIOSYSTEMS S.P.A. (100.0%)  
Via dei Lapidari, 12  
40129 Bologna, IT**

72 Inventor/es:

**GIORGINI, GIUSEPPE;  
PEROZZIELLO, GERARDO;  
CALANCA, ALEX;  
MEDORO, GIANNI y  
MANARESI, NICOLO'**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 483 765 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

Cámara de separación

Campo técnico

5 La presente invención se relaciona con una cámara de separación, un dispositivo de separación, y usos de una cámara y/o dispositivo de separación.

Estado de la técnica

Los dispositivos que se han propuesto hasta ahora para la selección de partículas, en particular células, prevén pasar un flujo, el cual contiene la muestra sobre la cual se va a llevar a cabo la separación, a una presión a través de un aparato de filtración que separa las células de tamaño mayor de las células de tamaño menor.

10 Ejemplos de este tipo de dispositivos están descritos en las solicitudes de Patente Nos. WO2006108101, WO2005047529, y en P. Sethu, A. Sin, M. Toner; Microfluidic diffusive filter for apheresis (leukapheresis); Lab Chip, 2006, 6, 83-86.

15 Dispositivos conocidos para el tipo descrito anteriormente tienen las desventajas de ser relativamente complejos y costosos y de tratamiento de muestra a una presión relativamente alta (la separación, en la práctica, se lleva a cabo explotando la presión a la cual se somete el flujo. La presión relativamente alta puede dañar las células y requiere de equipo que es suficientemente resistente y relativamente complejo. Cuando se van a utilizar estos dispositivos a baja presión, las operaciones de selección pueden ser muy lentas y casi impracticables.

20 La solicitud de patente que tiene número de publicación WO03/056330 describe un dispositivo para seleccionar células de diferentes tamaños. Este documento sin embargo no toma en consideración de ninguna manera la posibilidad de separar eritrocitos de leucocitos y de hacer un dispositivo para este propósito. En particular, la WO03/056330 describe el uso de un dispositivo sobre una muestra sin eritrocitos (véase, por ejemplo, la página 16, líneas 5 y 6 y página 20, líneas 27 – 32).

25 La Patente No. US6190919 describe un dispositivo para mejorar la desglucosilación de células de glóbulos rojos. Por lo tanto, ni este documento de manera alguna tiene en consideración la posibilidad de separar eritrocitos de leucocitos y de hacer un dispositivo para este propósito. El dispositivo descrito en la US6190919 tiene una pluralidad de canales (designados en el texto y en las figuras con los números de referencia 42, 40, 38, 36, 34, 32 y 31), a través de los cuales fluye una solución que contiene partículas; en vez de esto, tiene cavidades, en las cuales puede almacenarse y recolectarse el material.

Resumen

30 El objetivo de la presente invención es proveer una cámara de separación, un dispositivo de separación, y usos de una cámara y/o dispositivo de separación, que permite que las desventajas del estado de la técnica sean superadas al menos parcialmente, y al mismo tiempo será fácil y no costoso de producir.

35 De acuerdo con la presente invención, se proveen una cámara de separación, un dispositivo de separación, y usos de dicha cámara y/o dispositivo de separación de acuerdo con lo que se describe en las reivindicaciones independientes que siguen, y preferiblemente, en cualquiera de las reivindicaciones directa o indirectamente dependientes de las mismas.

Breve descripción de los dibujos

La invención se describe de aquí en adelante con referencia a los dibujos anexos, los cuales ilustran algunos ejemplos no limitativos de una realización de la misma y en los cuales:

40 - la figura 1 es una vista plana superior de una cámara de separación de acuerdo con la presente invención;

- la figura 2 es una vista en sección transversal y esquemática de la cámara de la figura 1;

- la figura 3 ilustra un detalle de la figura 1 en una escala agrandada;

- las figuras 4 a 6 ilustran diferentes realizaciones del detalle de la figura 3;

- las figuras 7 y 8 ilustran diferentes realizaciones de un detalle de la figura 2;

45 - las figuras 9 a 16 ilustran, en una vista en sección transversal, etapas sucesivas de un método para la producción de la cámara de la figura 2;

- la figura 18, ilustra en una vista en sección transversal, un dispositivo de separación de acuerdo con la presente invención;
- las figuras 17, 19 y 20 ilustran, en un vista en sección transversal, diferentes etapas de un uso de la cámara de la figura 2 y del dispositivo de la figura 18;
- 5 - la figura 21 es una fotografía en una escala agrandada de una porción de la cámara de la figura 2, en uso;
- las figuras 22 y 23 son fotografías de detalles de la fotografía de la figura 21 a una escala agrandada;
- la figura 24 es una fotografía de la porción de la figura 21, obtenida utilizando un filtro DAPI (esto es, irradiando con luz UV y recibiendo en azul);
- la figura 25 es una superposición de las fotografías de las figuras 21 y 24;
- 10 - la figura 26 es una vista en sección transversal y esquemática de una realización adicional de una cámara construida de acuerdo con la presente invención, durante una etapa de uso; y
- la figura 27 es una vista en sección transversal y esquemática de una realización adicional de una cámara hecha de acuerdo con la presente invención, durante una etapa de uso.

Realizaciones de la invención

- 15 En las figuras 1 y 2, designada como un todo mediante 1 hay una cámara de separación, la cual puede ser utilizada para separar partículas de diferentes tamaños de una muestra orgánica (sustancialmente líquida, en particular, una solución acuosa) de acuerdo con las reivindicaciones 1 – 18. La cámara 1 puede ser utilizada para separar partículas de un primer tipo de partículas de un segundo tipo, en donde las partículas del primer tipo tienen al menos una dimensión mayor que las dimensiones de las partículas del segundo tipo de acuerdo con las reivindicaciones 1 –
- 20 18. En el presente texto, por “partículas” se entienden un corpúsculo que tiene la mayor dimensión más pequeña de 1000  $\mu\text{m}$  (ventajosamente más pequeña de 260  $\mu\text{m}$ ). Ejemplos no limitantes de partículas son: células, detritos celulares (en particular, fragmentos de células), agregados de células (tales como, por ejemplo, pequeñas aglomeraciones de células derivadas de células madre, tales como neuroesferas o mamosferas), bacterias, liposferas, microesferas (de poliestireno y/o magnéticas), nanosferas complejas (por ejemplo, nanosferas de hasta 100 nm) formadas por microesferas unidas a las células. De acuerdo con algunas realizaciones, las partículas se escogen en el grupo consistente de: células y detritos celulares. Las partículas son células de un primer tipo que son eritrocitos y de un segundo tipo que son leucocitos.

De acuerdo con algunas realizaciones, las partículas (ventajosamente células y/o detritos celulares) tienen la principal dimensión mayor de 60  $\mu\text{m}$ .

- 30 En el presente texto, por “dimensiones de una partícula” se entiende la longitud, la anchura y el espesor de la partícula.

A manera de ejemplo, se hace énfasis en que un eritrocito tiene una longitud promedio y una anchura promedio de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$  y un espesor promedio de aproximadamente 3  $\mu\text{m}$ ; un leucocito tiene una longitud promedio, una anchura promedio, y un espesor promedio de aproximadamente 9 – 12  $\mu\text{m}$  (en otras palabras, el leucocito puede ser considerado en una primera aproximación casi esférico). En este caso, en otras palabras, el eritrocito tiene al menos una dimensión (en particular, el espesor) más pequeña que las dimensiones (longitud, anchura y espesor) del leucocito.

Como ejemplo adicional, debe recordarse que un espermatozoide tiene una cabeza que tiene una longitud promedio de aproximadamente 6 – 10  $\mu\text{m}$ , una anchura promedio y un espesor promedio de aproximadamente 3 – 5  $\mu\text{m}$ . Una célula epitelial tiene dimensiones en la región de 50  $\mu\text{m}$ . En este caso, en otras palabras, el espermatozoide tiene al menos una dimensión (en particular la anchura, y el espesor) más pequeña que las dimensiones (longitud, anchura y espesor) de la célula epitelial.

Como ejemplos adicionales, debe recordarse que tanto las plaquetas como los detritos celulares tienen dimensiones más pequeñas que las de los eritrocitos y leucocitos; las aglomeraciones tienen dimensiones mayores que aquellas de eritrocitos y leucocitos.

45 Típicamente, la cámara 1 tiene una longitud de aproximadamente 50 mm, una anchura de aproximadamente 20 mm y un espesor de aproximadamente 1.2 mm.

La cámara 1 comprende una pared base 2, la cual tiene una superficie interna 3, una pared superior 4 (tapa), la cual tiene una superficie interna 5 sustancialmente de cara a la superficie 3, y un elemento espaciador 6, el cual está fijado entre las paredes 2 y 4 para conectar las paredes 2 y 4 entre sí de una manera fluida hermética de forma que

se mantienen las superficies 3 y 5 a una distancia una de otra. Las paredes 2 y 4 son sustancialmente paralelas y se enfrentan una a otra. El elemento espaciador 6 se extiende sustancialmente a lo largo del perímetro completo de las paredes 2 y 4.

5 Las paredes 2 y 4 y el elemento espaciador 6 delimitan una cámara interna 7. En particular, el elemento espaciador 6 delimita la cámara 7 lateralmente, y las paredes 2 y 4 delimitan la cámara 7 en el fondo y en la parte superior, respectivamente.

10 La pared 4 tiene dos pasos 8 (en particular, dos orificios), los cuales están diseñados para poner en contacto la cámara 7 con el ambiente externo y tienen una forma preferible (en particular, la de un cono truncado) ahusada hacia adentro. Típicamente, cada paso 8 tiene un diámetro mayor (de cara al exterior) de aproximadamente 1200  $\mu\text{m}$  y un diámetro menor (de cara hacia la cámara 7) de aproximadamente 700  $\mu\text{m}$ .

Nótese que la cámara 7 está puesta en comunicación con el ambiente externo solamente a través de los pasos 8, los cuales están dimensionados de tal manera que no permiten el paso de una solución acuosa como resultado solamente de la fuerza de gravedad.

15 De acuerdo con una realización alternativa (no ilustrada), la pared 4 está sin los pasos 8 y/o orificios, los cuales, en vez de esto están provistos a través del elemento espaciador 6.

De acuerdo con una realización alternativa (no ilustrada), la pared 4 está sin los pasos 8 y/o orificios, los cuales, en vez de esto están provistos a través de la pared 2.

De acuerdo con realizaciones adicionales (no ilustradas), los pasos 8 son más de dos.

20 Con referencia en particular a las figuras 2 y 3, la pared 2 tiene una pluralidad de cavidades 9, las cuales están cerradas hacia el exterior (en particular, hacia abajo) mediante una porción inferior 2' de la pared 2, y cada una tiene al menos una abertura 10 respectiva de cara a la cámara 7 (en particular, hacia arriba). Las cavidades 9 están separadas una de otra por paredes internas 11 sustancialmente lineales sustancialmente paralelas una a otra. En la figura 3, las cavidades 9 están representadas en gris/negro, y las paredes 11 están representadas en blanco.

Cada cavidad 9 es cerrada en un extremo opuesto a la abertura 10 respectivamente.

25 Las figuras 7 y 8 ilustran diferentes realizaciones de las paredes 11. En la variante de la figura 7, las paredes 11 tienen extremos superiores redondeados respectivos. En la variante de la figura 8, las paredes 11 tienen extremos superiores respectivos conformados como una V puesta de arriba hacia abajo.

30 Cada cavidad 9 está configurada de tal manera que recibe y aloja una pluralidad de células de dimensiones más pequeñas (por ejemplo, eritrocitos o espermatozoides), de tal forma que no es posible que células de dimensiones mayores (por ejemplo, leucocitos o células epiteliales) obtengan acceso.

En particular, cada abertura 10 tiene una anchura más pequeña que las dimensiones de las células del segundo tipo y más grande que las dimensión menor de las células del primer tipo; cada abertura 10 (en particular, también cada cavidad 9) tiene una longitud mayor que la dimensión mayor de las células del primer tipo.

35 En el presente texto, por "anchura de la abertura" 10 se entiende el diámetro máximo de una esfera que es capaz de pasar a través de la abertura 10. En el presente texto, por "longitud de la abertura" 10 se entiende la dimensión mayor de la abertura 10 en sí misma.

En este aspecto, nótese que, en la realización donde están las figuras 2 y 3, la anchura de cada abertura 10 corresponde a la distancia entre dos paredes adyacentes 11. En este caso, la longitud de cada abertura 10 es la dimensión de la abertura 10 misma sustancialmente perpendicular a la anchura.

40 La figura 5 ilustra una realización alternativa en la cual la pared 2 comprende una pluralidad de cavidades 9 (representadas en gris/negro) sustancialmente en la forma de una cruz y delimitadas por una pared 11 conformada para este propósito. En este caso específico, la anchura de una abertura 10 corresponde a la distancia entre los bordes agudos designados por los números 12 y 12'. En este caso, la longitud de cada abertura 10 es la dimensión de la abertura 10 misma sustancialmente a 45° de la anchura.

45 La figura 4 ilustra una realización alternativa, en la cual la parte 2 comprende una cavidad 9 (representada en gris/negro) y una pluralidad de elementos de columna 13 sustancialmente cilíndricos que se proyectan desde la porción inferior 2' a través de la pared 4. Los elementos de columna 13 están dispuestos en filas y columnas en orden disperso. En este caso específico, la anchura de la abertura 10 corresponde a la distancia entre los elementos de columna 13'y 13'', los cuales están en filas y columnas adyacentes.

- 5 La figura 6 ilustra una realización alternativa, en la cual la parte 2 comprende una cavidad 9 (representada en gris/negro) y una pluralidad de elementos de columna 13 con una sección transversal cuadrada, los cuales se proyectan desde la porción inferior 2' hacia la pared 4, dispuestos en un arreglo de filas y columnas. En este caso específico, la anchura de la abertura 10 corresponde a la distancia entre los bordes agudos enfrentados de los elementos de columna 13' y 13'', los cuales no están en la misma fila y en la misma columna, sino en filas y columnas adyacentes.
- 10 De acuerdo con realizaciones alternativas, la pared 2 está estructurada de tal manera que tenga una pluralidad de cavidades 9 conformadas como las partes representadas en blanco en la figura 4 y/o figura 6. De acuerdo con una realización de alternativa, la pared 2 está estructurada de tal manera que tenga una cavidad 9 conformada como la parte representada en blanco en la figura 5.
- Las paredes 11 y/o los elementos de columna 13 funcionan como elementos delimitantes; a saber, delimitan las cavidades 9 al menos parcialmente.
- La anchura de las aberturas 10 es generalmente menor de 250  $\mu\text{m}$ .
- 15 Ventajosamente, cada abertura 10 tiene una anchura de menos de 40  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con algunas realizaciones, cada abertura 10 tiene una anchura de menos de 22  $\mu\text{m}$ , en particular, desde 20  $\mu\text{m}$  a 100 nm.
- 20 Ventajosamente, cada abertura 10 tiene una anchura de menos de 8  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con algunas realizaciones, cada abertura 10 tiene una anchura desde 3 a 8  $\mu\text{m}$ . Ventajosamente, cada abertura 10 tiene una anchura que va de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , en particular de 4 a 5  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con realizaciones específicas, cada abertura 10 tiene una anchura de aproximadamente 5  $\mu\text{m}$ . Estas anchuras son particularmente útiles, por ejemplo, en el caso en donde el objetivo es separar eritrocitos de leucocitos, o espermatozoides de células epiteliales.
- 25 Ventajosamente, cada abertura 10 tiene una anchura de menos de 3  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con algunas realizaciones, cada abertura 10 tiene una anchura de menos de 1  $\mu\text{m}$ . Ventajosamente, cada abertura 10 tiene una anchura desde 1  $\mu\text{m}$  hasta 100 nm, en particular de 0.5  $\mu\text{m}$  a 150 nm. Estas anchuras son particularmente útiles, por ejemplo, en el caso donde el objetivo es separar detritos celulares de una suspensión celular (a saber, células contenidas en una solución).
- De acuerdo con algunas realizaciones, cada abertura 10 tiene una longitud de al menos 9  $\mu\text{m}$ . Ventajosamente, cada abertura 10 tiene una longitud de al menos 11  $\mu\text{m}$ .
- De acuerdo con algunas realizaciones, cada cavidad 9 tiene una longitud al menos 9  $\mu\text{m}$ . Ventajosamente, cada cavidad 9 tiene una longitud de al menos 11  $\mu\text{m}$ .
- 30 De acuerdo con algunas realizaciones, cada cavidad 9 tiene una profundidad de al menos 1  $\mu\text{m}$ , ventajosamente al menos 3  $\mu\text{m}$ . Estas profundidades son particularmente útiles, por ejemplo, en el caso en donde el objetivo es separar detritos celulares o plaquetas de otras células (por ejemplo, leucocitos y/o eritrocitos).
- 35 Para atrapar partículas de una forma sustancialmente esférica la profundidad de la cavidad es sustancialmente más de la mitad de la anchura, ventajosamente más grande que la anchura. Para atrapar partículas de forma no esférica (tales como, por ejemplo, eritrocitos) ventajosamente cada cavidad 9 tiene una profundidad que es al menos dos veces su propia anchura.
- 40 De acuerdo con algunas realizaciones, cada cavidad 9 tiene una profundidad de al menos 10  $\mu\text{m}$ . Ventajosamente, cada cavidad 9 tiene una profundidad que va desde 10  $\mu\text{m}$  hasta 50  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con realizaciones específicas, cada cavidad 9 tiene una profundidad de aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ . Estas profundidades son particularmente útiles, por ejemplo, en el caso donde el objetivo es separar eritrocitos de leucocitos, o espermatozoides de células epiteliales.
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones, cada cavidad 9 tiene una profundidad de al menos 250  $\mu\text{m}$ . Ventajosamente, cada cavidad 9 tiene una profundidad de al menos 50  $\mu\text{m}$ . Estas profundidades son útiles particularmente, por ejemplo, para separar pequeños agregados de células madre (tales como, por ejemplo, neuroesferas o mamosferas) a partir de una suspensión celular.
- Los elementos delimitantes (a saber, las paredes 11 y/o los elementos de columna 13) están fijados a una distancia de la pared 4. En particular, de acuerdo con algunas realizaciones ventajosas, la distancia entre los elementos delimitantes y la pared 4 va de 10 a 500  $\mu\text{m}$ .
- 50 De acuerdo con algunas realizaciones, los elementos (o elemento) delimitantes tienen una anchura de al menos 1  $\mu\text{m}$ . De acuerdo con algunas realizaciones, los elementos (o elemento) delimitantes tiene una anchura de hasta 5  $\mu\text{m}$ . En particular, los elementos (o elemento) delimitantes tienen una anchura que va de 1 a 5  $\mu\text{m}$ .

Ventajosamente, los elementos (o elemento) delimitantes tienen una anchura de hasta 3  $\mu\text{m}$ . En particular, los elementos (o elemento) delimitantes, tienen una anchura que va de 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Típicamente, los elementos (o elemento) delimitantes tienen una anchura de 3  $\mu\text{m}$ .

5 Se ha encontrado sorprendentemente por vía experimental que estas dimensiones de los elementos o elemento delimitantes en combinación con las dimensiones de la cavidad o cavidades 9 permiten una separación de los eritrocitos a partir de los leucocitos que es particularmente efectiva y delicada.

Las diversas dimensiones indicadas en este texto (por ejemplo, las dimensiones de las partículas y/o de las aberturas y/o de los elementos delimitantes) pueden ser medidas con microscopios con escala graduada o con microscopios normales usados con portaobjetos.

10 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se provee un dispositivo 14 de separación equipado con una cámara de separación 1, la cual a su vez comprende: una pared base 2, la cual tiene una superficie interna 3; una pared superior 4, la cual tiene una superficie interna 5 y está conectada de una manera fluida hermética con la pared 2; una cámara interna 7, la cual está al menos delimitada parcialmente por las paredes 2 y 4; al menos un paso 8, el cual pone la cámara 7 en comunicación con el mundo exterior; y al menos una cavidad 9, la cual tiene al menos una abertura 10 hacia la cámara interna 7 y se cierra hacia el mundo exterior. Ventajosamente, la cámara 1 tiene las características geométricas y dimensionales definidas anteriormente sin referencia a las partículas del primero y/o segundo tipo (esto es, sin referencia en las dimensiones de las partículas mismas).

20 Con referencia particular a la figura 18, de acuerdo con algunas realizaciones, el dispositivo 14 incluye además una unidad de bombeo 15, en particular, que comprende una jeringa con un actuador de control numérico, estando conectada la jeringa a la cámara 1 por medio de un ducto 16.

El dispositivo 14 además comprende una empaquetadura 17 (preferiblemente hecha de material elastomérico) equipada con un número de orificios 18 para conectar el ducto 16 y posiblemente un reservorio 19 (por ejemplo, la punta de una pipeta) a la cámara 1.

De acuerdo con algunas realizaciones, el reservorio 19 es parte del dispositivo 14.

25 Con referencia particular a las figuras 9 a 16 se describe de aquí en adelante una metodología provista a manera de ejemplo no limitante para producir las cámaras 1 descritas anteriormente.

30 Sobre la parte superior de una capa de silicio 20 (figura 9) se aplica una capa 21 de material fotopolimerizable (por ejemplo, SU8 o alguno más que contenga PMMA); la aplicación fue llevada a cabo por medio de una técnica conocida escogida de: laminación, recubrimiento por rotación o aspersión, deposición de vapor química (CDV), deposición de vapor física (PVD).

Se fija una máscara 22 (figura 10) sobre la capa 21, la cual es irradiada entonces desde arriba con luz UV de tal manera que solamente las porciones expuestas de la capa 21 fueron polimerizadas.

Alternativamente, es posible utilizar un lente y un patrón (del negativo del grabado que se desea obtener) en una escala agrandada posicionada entre una fuente UV y la capa 21.

35 Una vez que la polimerización se ha llevado a cabo selectivamente, el material no polimerizado se retiró (figura 11). En este punto (figura 12), la capa 20 fue grabada utilizando DRIE (grabado con iones reactivos en profundidad) [está metodología de grabado y metodologías alternativas para obtener la cámara 1 están descritas en O. Geschke, H. Klan, P. Telleman (Eds.) "Microsystem Engineering of Lab-on-a-chip devices" (segunda edición) ISBN: 978-3-527-31942-8, Wiley-VCH 2008; Marc. J. Madou, "Fundamentals of Microfabrication, the Science of Miniaturisation", (segunda edición) CRR, ISBN: 0849308267, cuyo contenido se cita íntegramente aquí con el fin de completar la descripción]. El polímero (capa 21) fue retirado entonces (figura 13) utilizando ácido fosfórico y peróxido de hidrógeno (solución conocida como piraña) de tal manera que se obtenga la pared 2.

45 Depositado por medio de laminación sobre la pared 2 (figura 14) estaba una capa 23 Dry resist® (en particular, Ordyl SY300 – Elga Europe). En este punto, se posiciona una máscara 24 (por ejemplo, una transparencia impresa o un vidrio cromoplateado selectivamente) (figura 15) sobre la capa 23, la cual ha sido irradiada con luz UV.

El Dry resist® no solidificado fue retirado con un solvente (por ejemplo, desarrollador BMR, el cual es una mezcla basada en xileno con acetato de butoxoetilo) (figura 16) de tal manera que se obtenga el elemento espaciador 6.

En este punto, la pared 4 (generalmente hecha de vidrio) se conectó de manera hermética fluida con el espaciador 6 aplicando presión y/o calentando de tal manera que se obtenga la cámara 1 ilustrada en las figuras 1 y 2.

50 De acuerdo con otro proceso, la cámara 1 puede hacerse a partir de un polímero termoplástico por medio de "gofrado en caliente". En este caso, se obtiene un molde que reproduce el negativo de la parte 2 y el espaciador 6

en una pieza individual, la cual es presionada en caliente sobre una placa del polímero termoplástico para imprimir la forma, sobre la cual se aplica entonces, por engomado en caliente o utilizando procesos asistidos por solventes o adhesivos, la pared superior 4 hecha de vidrio (obtenida utilizando tecnología similares a las descritas previamente) o de polímero (obtenido a través de grabado por láser, gofrado en caliente, moldeo por inyección, molienda, etc.).

- 5 De acuerdo con otros procesos, la cámara 1 puede hacerse a partir de material polimérico por medio de moldeo por inyección. En este caso, la pared 2 y el espaciador 6 son hechos de una pieza individual extruyendo el polímero fundido en caliente en un molde cerrado. La pared superior 4 se hace en goma, como en el proceso descrito previamente.
- 10 De acuerdo con otros procesos, la cámara 1 puede hacerse de material polimérico por medio de fundición. En este caso, la pared 2 y el espaciador 6 se hacen de una sola pieza vertiendo el polímero en fase de polimerización en un molde abierto. La pared superior 6 se hace y engoma como en el proceso descrito previamente.
- De acuerdo con otros procesos, la cámara 1 puede ser sometida a tratamientos antiadherentes de superficie (PEG o polímeros fluorados) para reducir la adherencia de las partículas.
- 15 De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se provee un uso de una cámara 1, como se describió anteriormente (o adicionalmente un dispositivo 14 como se describió anteriormente) para separación de partículas (en particular, células) de un primer tipo de partículas (en particular, células) de un segundo tipo, en donde las partículas de primer tipo tienen al menos una dimensión mayor que las dimensiones de las partículas del segundo tipo.
- 20 De acuerdo con la presente invención, las partículas de primer tipo son eritrocitos y las partículas del segundo tipo son leucocitos.
- De acuerdo con realizaciones alternativas, las partículas del primer tipo son espermatozoides y las partículas del segundo tipo son células epiteliales.
- 25 Ventajosamente, el uso comprende una etapa de inserción, durante la cual se inserta una muestra en la cámara 1. Una etapa de movimiento, durante la cual se induce un movimiento relativo recíprocante (ventajosamente horizontal) entre la cámara 1 y la muestra (ventajosamente por agitación del fluido); y una etapa de toma de muestra, durante la cual se toma una parte de la muestra. La etapa de toma de muestra es subsecuente a la etapa de movimiento.
- De acuerdo con algunas realizaciones, el movimiento recíprocante se obtiene agitando la cámara y/o ejerciendo una presión ligeramente negativa alternativamente a una presión positiva sobre la muestra.
- 30 Nótese que durante el uso, una vez que la muestra ha sido insertada, las partículas de primer tipo por la fuerza de gravedad caen dentro de la cavidad/cavidades 9 mientras que las partículas de segundo tipo permanecen en la cámara 7 sobre la parte superior de la cavidad/cavidades 9. Cuando la parte de la muestra es retirada de la cámara 1, la gran mayoría de las partículas del primer tipo permanecen "atrapadas" en la cavidad/cavidades 9 mientras que casi todas las partículas del segundo tipo son retiradas junto con la parte antes mencionada de la muestra.
- 35 El hecho de explotar la fuerza de gravedad y, por lo tanto, de no aplicar una presión para separar las partículas del primer tipo de las partículas del segundo tipo determina ventajas importantes en comparación con el estado de la técnica, entre las cuales pueden citarse: simplicidad y economía (también los materiales no tienen que ser tales que soporten altas presiones) de la cámara 1, reduciendo el riesgo de daño a las células durante la separación, mejor separación de las células del primer tipo de las células del segundo tipo, y posible uso de la cámara 1 como un elemento desechable, con consecuente reducción de los riesgos de contaminación.
- 40 El uso descrito anteriormente puede ser aplicado ventajosamente cuando hay interés en la recuperación de las partículas del segundo tipo. Ejemplos, en este aspecto, son: separación de eritrocitos de leucocitos (estos últimos son usualmente las células de interés efectivo); separación de detritos celulares de matrices celulares (siendo los últimos usualmente de interés efectivo).
- 45 De acuerdo con algunas realizaciones, el uso comprende una etapa de centrifugación, la cual es subsecuente a la etapa de toma de muestra y durante la cual la cámara 1 experimenta la centrifugación de tal manera que las partículas de primer tipo salen de la cavidad/cavidades 9; una etapa de recuperación, la cual es subsecuente a la etapa de centrifugación y durante la cual una parte adicional de la muestra que contiene las partículas del primer tipo es tomada de la cámara 1.
- 50 Este tipo de uso puede ser explotado ventajosamente cuando es de interés recuperar las partículas del primer tipo. Un ejemplo en este aspecto, es la separación de espermatozoides a partir de células epiteliales. Ejemplos adicionales son separación de: células a partir de aglomeraciones; y células a partir de microesferas de poliestireno y/o magnéticas (enlazadas a las células).

Este tipo de uso también puede ser explotado ventajosamente cuando hay interés en la recuperación tanto de partículas del primer tipo como de partículas del segundo tipo. Un ejemplo, en este aspecto, es la separación de células unidas a microesferas funcionalizadas a partir de una suspensión de células.

5 De acuerdo con algunas realizaciones, la etapa de toma de muestra (o la etapa de recuperación) prevé la recuperación de la parte (o de la parte adicional) de la muestra dentro del reservorio 19.

10 De acuerdo con realizaciones alternativas, cuando al menos uno de los pasos 8 está provisto a través de la pared 2 (figura 26) y no a través de la pared 4, después de la etapa de centrifugación, la cámara 1 se mantiene de tal forma que la pared 2 se orienta hacia arriba (a saber, de tal manera que la pared 2 este sobre la parte superior de la pared 4). De esta manera, hay una reducción del riesgo, antes o durante la etapa de recuperación, de que las partículas del segundo tipo caigan en la cavidad/cavidades 9.

15 Cuando la cámara 1 tiene la estructura ilustrada en la figura 26, es posible llevar a cabo la etapa de toma de muestra inclinando la cámara 1 en un ángulo  $\alpha$  y girando la cámara 1 sobre si misma alrededor de un eje A (las flechas C indican la dirección de la fuerza centrífuga que se aplica consecuentemente la cual se fija entre las paredes 11 y la pared 4, en el caso en cuestión, a los leucocitos 26). De esta manera, la parte de la muestra que se va a tomar (en el ejemplo ilustrado, que contiene los leucocitos 26) fluye a través del paso 8 provisto a través de la pared 2.

20 De acuerdo con las realizaciones alternativas, cuando al menos uno de los pasos 8 está provisto a través del elemento espaciador 6 y no a través de la pared 4, es posible recuperar la parte (o la parte adicional) de la muestra por medio de centrifugación de la cámara 1 o más por inclinación de la cámara 1 misma de tal manera que se oriente al menos un paso 8 hacia abajo.

25 Cuando la cámara 1 tiene la estructura ilustrada en la figura 27, es posible llevar a cabo la etapa de toma de muestra manteniendo la cámara 1 sustancialmente plana y girando la cámara 1 en si misma alrededor de un eje A (las flechas C indican la dirección de la fuerza centrífuga que se aplica consecuentemente la cual se fija entre las paredes 11 y la pared 4, en el caso en cuestión, a los leucocitos 26). De esta manera, la parte de la muestra que se va a tomar (en el ejemplo ilustrado, que contiene los leucocitos 26) fluye a través del paso 8 provisto a través del espaciador 6.

Al menos que se indique explícitamente de otra manera, los contenidos de las referencias (artículos, textos, solicitudes de patente, etc.) citados en este texto se invocan integralmente aquí con el motivo de completar la descripción. En particular, las referencias antes mencionadas se incorporan aquí como referencia.

30 La presente solicitud de patente reivindica la prioridad de una solicitud de patente italiana (específicamente, No. BO2008A000602). En particular, la solicitud de patente italiana antes mencionada se incorpora aquí como referencia.

Características adicionales de la presente invención surgirán de la descripción que sigue de algunos ejemplos meramente ilustrativos y no limitantes del uso del dispositivo 14 y de la cámara 1.

### 35 **Ejemplo 1**

40 En el dispositivo 14 ilustrado en la figura 18, se hace primero fluir una solución de etanol en agua (70% en etanol) y luego un regulador salino (en particular SPB – regulador salino de fosfato) (aproximadamente 5 ml) en la dirección indicada por las flechas de la figura 17 de tal manera que se llene en una dirección sustancialmente completa la cámara 1 con el regulador salino mismo. La cámara 1 utilizada fue como se ilustra en las figuras 1, 2 y 3 y presentaba las siguientes dimensiones:

Volumen interno: aproximadamente  $74 \text{ mm}^3$

Longitud: aproximadamente 50 mm

Anchura: aproximadamente 20 mm

Anchura de las cavidades 9: aproximadamente  $5 \mu\text{m}$

45 Profundidad de las cavidades 9: aproximadamente  $20 \mu\text{m}$

Anchura de las paredes 11: aproximadamente  $3 \mu\text{m}$ .

En este punto, el reservorio 19 (en particular, una pipeta) que contenía  $40 \mu\text{l}$  de la muestra (la cual contenía concentraciones de  $150000$  eritrocitos/ $\mu\text{l}$  y  $1500$  leucocitos/ $\mu\text{l}$ ) para ser separados fue insertado en la

empaquetadura 17 y se hizo fluir la muestra misma (100  $\mu$ l/minuto) en la cámara 1 operando la unidad de bombeo 15 (figura 18).

5 A continuación, el ducto 16 fue movido como se indica mediante las flechas de doble cabeza que aparecen en la figura 19 durante algunos minutos (los tiempos involucrados pueden ser reducidos posiblemente de manera considerable si se utiliza un vórtex) de tal manera que haga que la cámara 1 vibre y permita que los eritrocitos 25 se acoplen en las cavidades 9 mientras que los leucocitos 26 permanecen sobre la parte superior de las cavidades 9 mismas.

10 La figura 21 es una fotografía a una escala agrandada tomada desde la parte superior de una porción de la cámara 1 al final de las vibraciones. Las figuras 22 y 23 muestran, respectivamente, un leucocito (colocado por encima de las cavidades 9) y dos eritrocitos (dispuestos dentro de una cavidad 9).

La figura 24 es una fotografía de la misma porción de la cámara 1 obtenida con un filtro DAPI (a saber, iluminando la muestra con luz UV y recibiendo en azul). Con dicho filtro es posible resaltar las células nucleadas (esto es, los leucocitos). La figura 25 es una superimposición de las fotografías de las figuras 21 y 24.

15 En este punto, la muestra fue extraída de la cámara 1 (volumen extraído: 200  $\mu$ l; flujo de extracción: 40  $\mu$ l/minuto) de acuerdo con lo que se ilustra en la figura 20. La muestra extraída presentaba concentraciones de 2500 eritrocitos/ $\mu$ l (eliminación de 98.3%) y 1350 leucocitos/ $\mu$ l (recuperación del 90%). La separación demostró ser extremadamente eficiente.

### Ejemplo 2

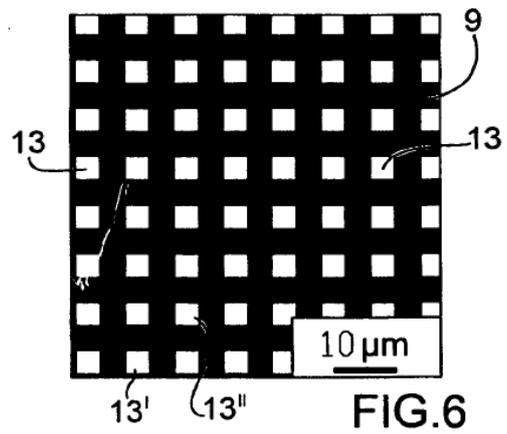
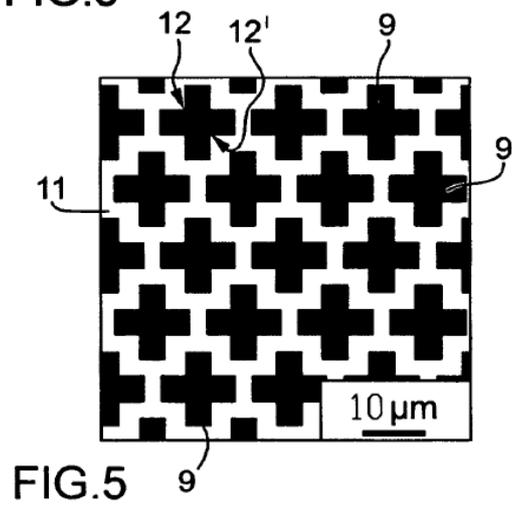
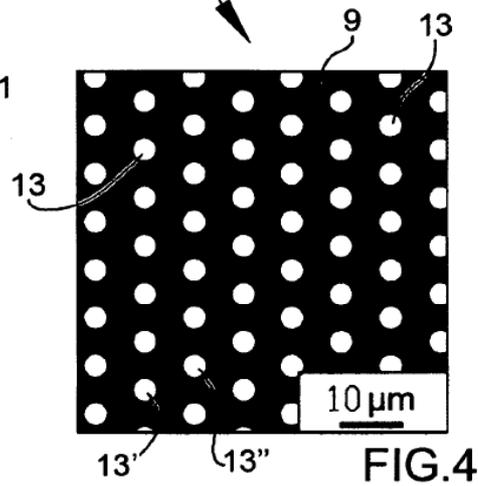
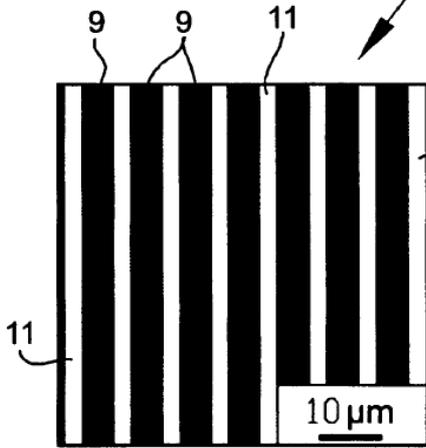
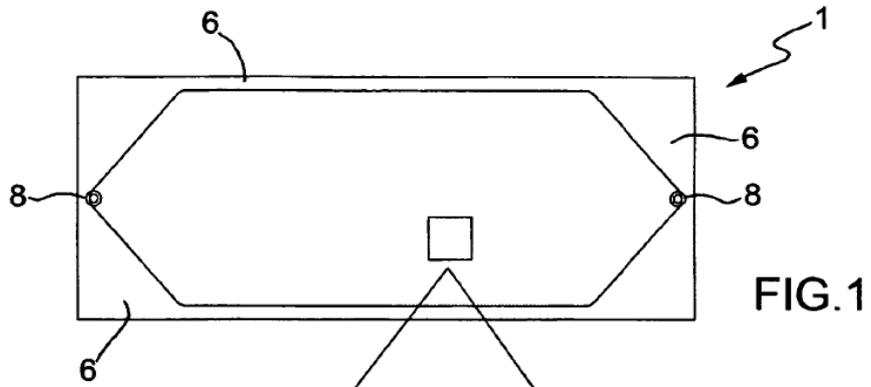
20 Para separar espermatozoides de células epiteliales la metodología descrita en el ejemplo 1 fue adoptada (obviamente utilizando una muestra que contenía dicha células), al final de la cual la cámara 1 (que contenía el regulador) fue sometida a centrifugación de tal manera que permitiera que los espermatozoides salieran de las cavidades 9. La centrifugación fue llevada a cabo fijando la cámara 1 dentro de un contenedor que podía ser adaptado a una centrifuga comercial. La cámara 1 fue fijada de tal manera que permanecía perfectamente vertical durante la rotación de la centrifuga y presionada sobre el lado de la pared 4 contra una empaquetadura integrada en el contenedor y diseñada para cerrar los pasos 8. En particular, la cámara 1 debe ser posicionada de tal manera que la fuerza centrífuga tenga una dirección perpendicular al plano de la cámara 1 misma y un sentido orientado desde la pared 2 a la pared 4. De esta manera, la fuerza centrífuga favorece la presión de los pasos 8 sobre la empaquetadura, no permitiendo que el líquido salga del dispositivo y al mismo tiempo permite que las células salgan de las cavidades 9 y vengán a descansar sobre la tapa.

30 En este punto, el regulador salino que contienen los espermatozoides fue extraído de la cámara 1. El porcentaje de recuperación de los espermatozoides fue alto.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cámara de separación para separar partículas de un primer tipo de partículas de un segundo tipo presentes en una muestra; siendo las partículas del primer tipo eritrocitos y teniendo al menos una dimensión menor que las dimensiones de las partículas del segundo tipo, las cuales son leucocitos; teniendo las partículas del primer tipo y del segundo tipo dimensiones mayores respectivas más pequeñas que 1000  $\mu\text{m}$ ;
- 5 comprendiendo la cámara de separación (1): una pared base (2), la cual tiene una primera superficie interna (3); una pared superior (4), la cual tiene una segunda superficie interna (5) y está conectada en una forma fluida hermética con la pared base (2); una cámara interna (7), la cual es delimitada al menos parcialmente por la pared base (2) y la pared superior (4); y al menos un paso (8) el cual pone en comunicación la cámara interna (7) con el ambiente externo; la pared base (2) comprende: al menos una cavidad (9), la cual tiene al menos una abertura (10) hacia la cámara interna (7), es cerrada hacia el ambiente exterior y está diseñada para recibir y alojar al menos una partícula del primer tipo; al menos un elemento de delimitación (11; 13), en particular una pluralidad de elementos delimitantes, delimitando dicho elemento delimitante (11; 13) al menos parcialmente la cavidad (9) y teniendo una anchura de hasta 5  $\mu\text{m}$ , en particular, desde 1  $\mu\text{m}$  a 5  $\mu\text{m}$ ;
- 10
- 15 teniendo dicha abertura (10) una anchura que va desde 3  $\mu\text{m}$  hasta 8  $\mu\text{m}$ .
2. La cámara de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el elemento delimitante tiene una anchura de al menos 1  $\mu\text{m}$ , en particular de 1  $\mu\text{m}$  a 3  $\mu\text{m}$ .
3. La cámara de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, en donde dicha abertura tiene una anchura que va de 4 a 6  $\mu\text{m}$ .
- 20
4. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde dicha cavidad (9) tiene una profundidad de al menos 10  $\mu\text{m}$ .
5. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cavidad (9) tiene una profundidad que va de 10  $\mu\text{m}$  a 50  $\mu\text{m}$ .
- 25
6. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cavidad tiene una profundidad de al menos dos veces la anchura.
7. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la abertura (10) tiene una longitud de al menos 9  $\mu\text{m}$ .
8. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cavidad (9) está diseñada para alojar una pluralidad de partículas del primer tipo.
- 30
9. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la distancia entre el elemento delimitante (11; 13) y la segunda superficie interna va de 10 a 300  $\mu\text{m}$ .
10. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y que comprende una pluralidad de cavidades (9).
- 35
11. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y que comprende una pluralidad de elementos delimitantes.
12. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, y que comprende: un elemento espaciador (6), el cual delimita lateralmente la cámara interna (7) y conecta la pared base (2) y la pared superior (4) de tal manera que mantiene la primera superficie interna (3) y la segunda superficie interna (5) separadas una de otra; y al menos dos pasos (8).
- 40
13. La cámara de separación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cámara interna (7) tiene un volumen que va de 50 a 100  $\text{mm}^3$ .
14. Uso de una cámara de separación para separar leucocitos de eritrocitos; siendo la cámara de separación (1) de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 45
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende: una etapa de inserción, durante la cual se inserta una muestra en la cámara (1); una etapa de movimiento, durante la cual se induce un movimiento recíprocante relativo entre la cámara (1) y la muestra; y una etapa de toma de muestra, durante la cual una parte de la muestra es tomada; la etapa de toma de muestra es subsecuente a la etapa de movimiento.

- 5 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 15, que comprende: una etapa de centrifugación, la cual es subsecuente a la etapa de toma de muestra y durante la cual la cámara (1) experimenta centrifugación de tal manera que las partículas de primer tipo salen de la al menos una cavidad (9) de la cámara (1); y una etapa de recuperación, la cual es subsecuente a la etapa de centrifugación durante la cual una parte adicional de la muestra que contiene las partículas del primer tipo es tomada de la cámara (1).
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la cámara (1) comprende al menos un paso (8) provisto a través de la pared base (2); después de la etapa de centrifugación, siendo mantenida la cámara (1) de tal manera que la pared base (2) está orientada hacia arriba.
- 10 18. Uso de una cámara de separación para separar partículas de un primer tipo de partículas de un segundo tipo presentes dentro de una muestra; teniendo las partículas de primer tipo al menos una dimensión más pequeña que las dimensiones de las partículas de segundo tipo; teniendo las partículas del primer tipo y del segundo tipo dimensiones principales respectivas menores de 1000  $\mu\text{m}$ ; comprendiendo la cámara de separación (1): una pared base (2), la cual tiene una primera superficie interna (3); una pared superior (4), la cual tiene una segunda superficie interior (5) y está conectada de una manera fluida hermética con la pared base (2); una cámara interna, la cual está 15 al menos parcialmente delimitada por la pared base (2) y la pared superior (4); y al menos un paso (8), el cual pone en comunicación la cámara interna (7) con el ambiente externo; comprendiendo la pared base (2) al menos una cavidad (9), la cual tiene al menos una abertura (10) hacia la cámara interna (7), está cerrada hacia el ambiente externo y está diseñada para recibir y alojar al menos una partícula del primer tipo; teniendo dicha abertura (10) una anchura menor que las dimensiones de las partículas del segundo tipo y mayor que la dimensión menor de las 20 partículas del primer tipo; estando definida la cámara de separación (1) como en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13;
- 25 el uso comprende: una etapa de inserción, durante la cual se inserta una muestra en la cámara (1); una etapa de movimiento durante la cual se induce un movimiento recíprocante relativo entre la cámara (1) y la muestra; y una etapa de toma de muestra, durante la cual se toma una parte de la muestra; la etapa de toma de muestra es subsecuente a la etapa de movimiento.



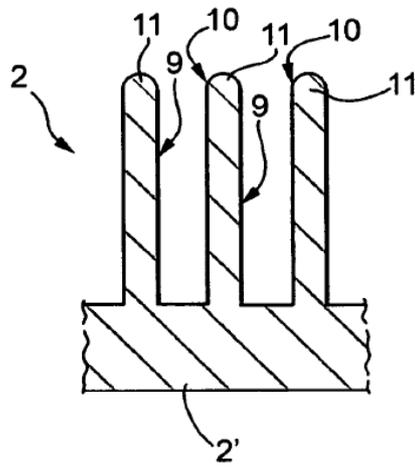
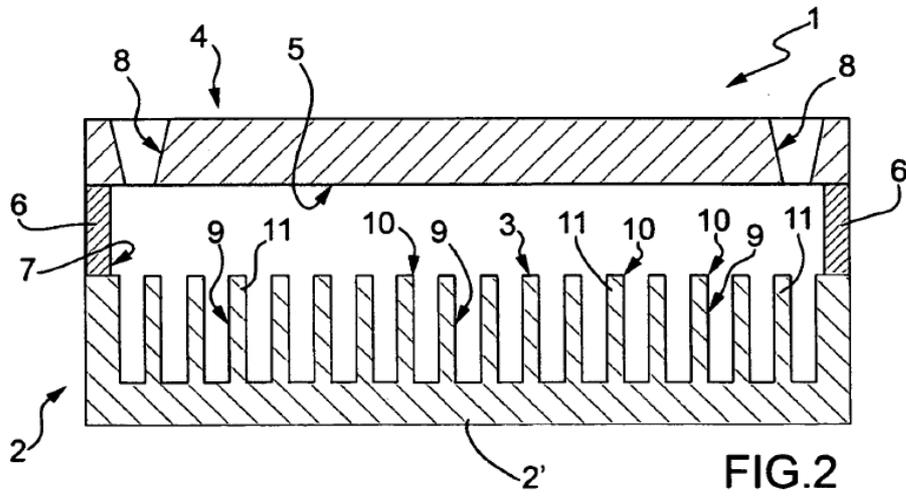


FIG. 7

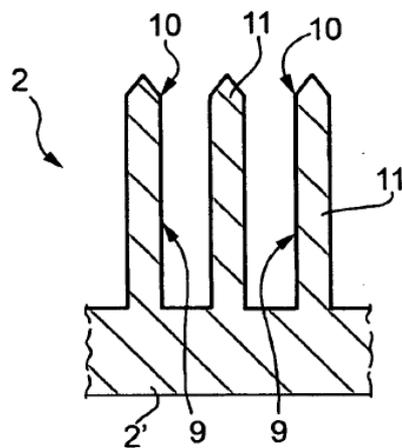


FIG. 8

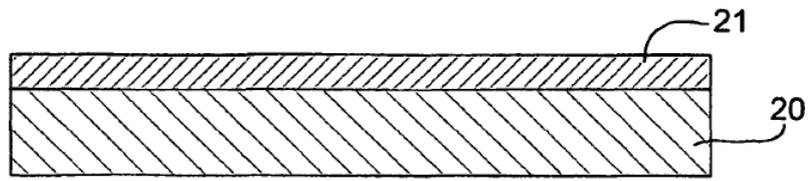


FIG. 9

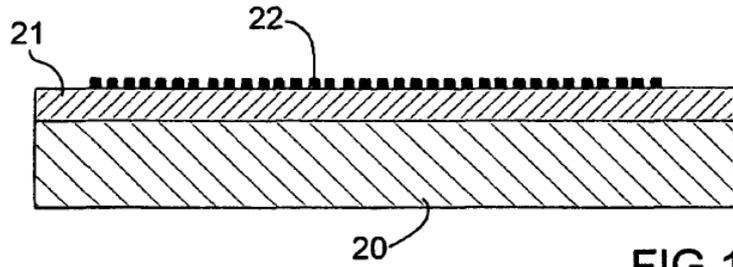


FIG. 10

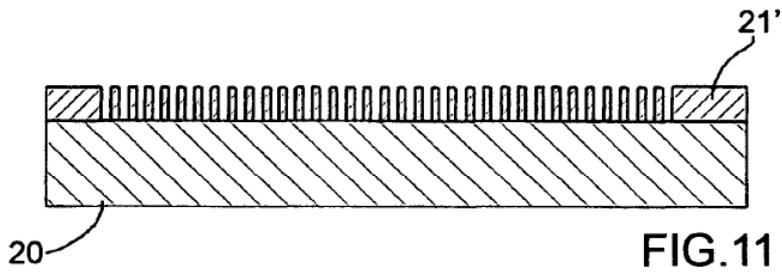


FIG. 11

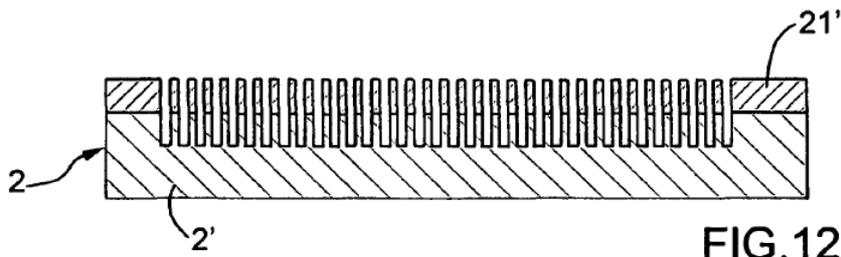


FIG. 12

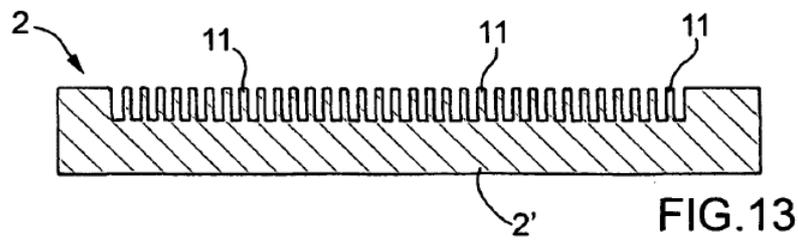
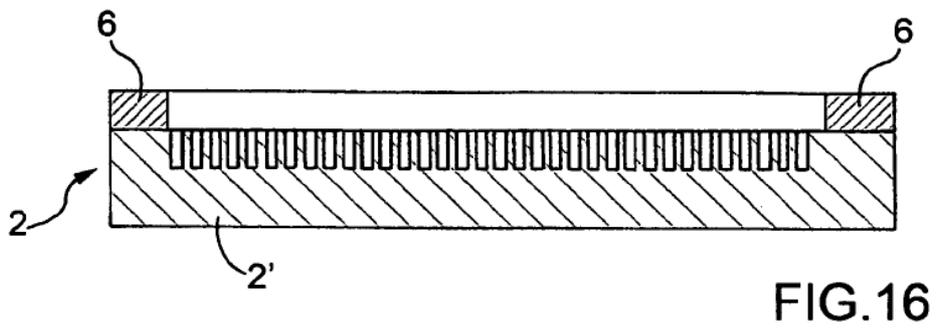
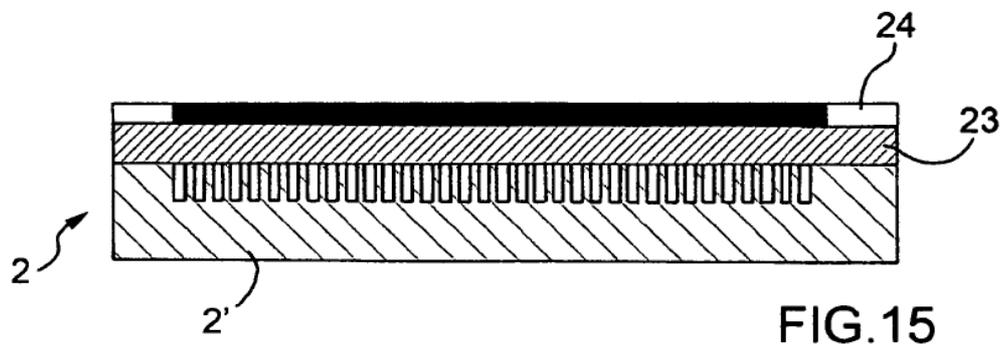
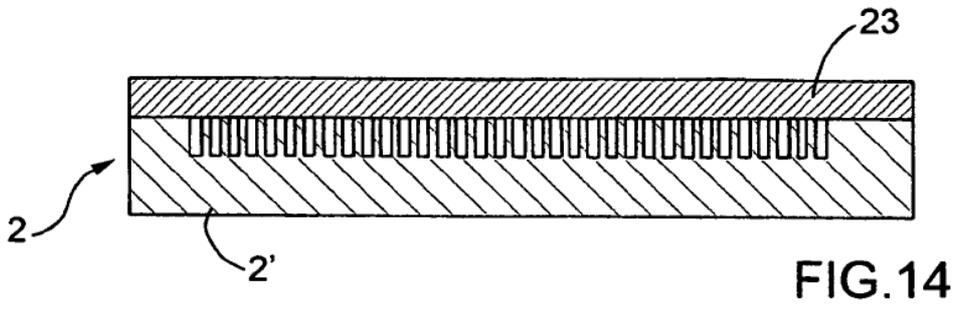
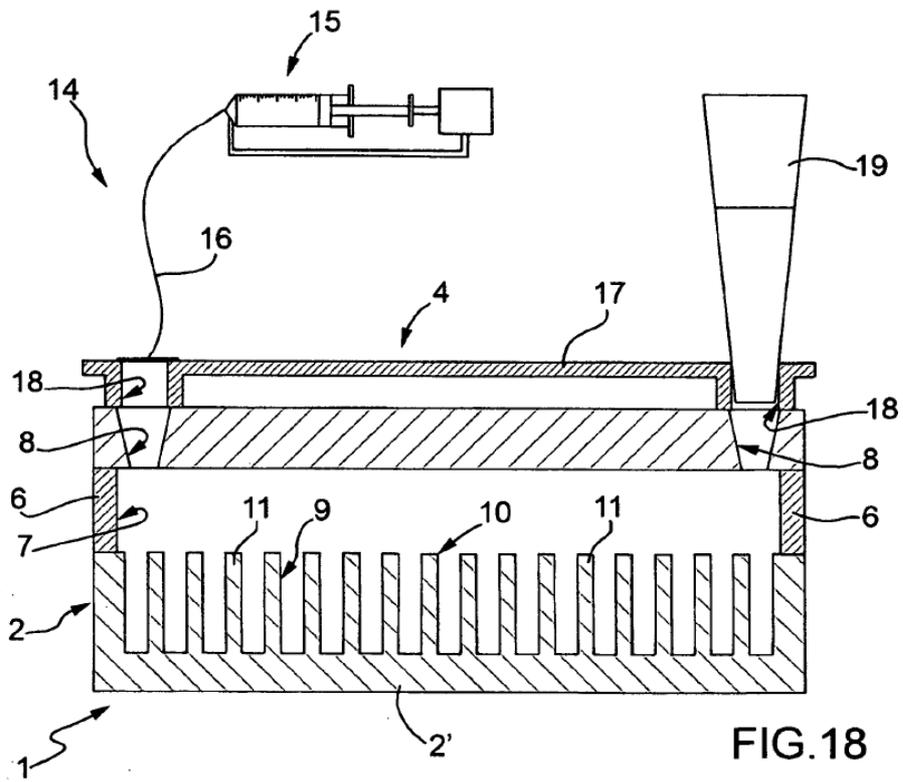
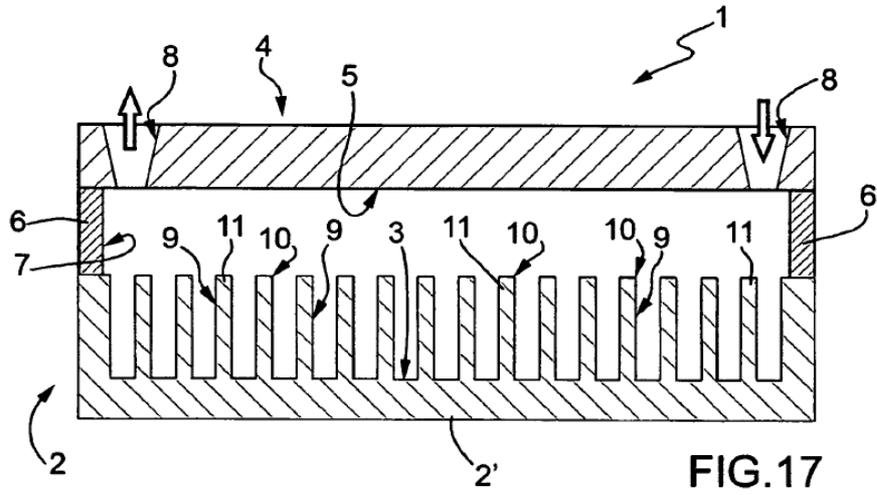
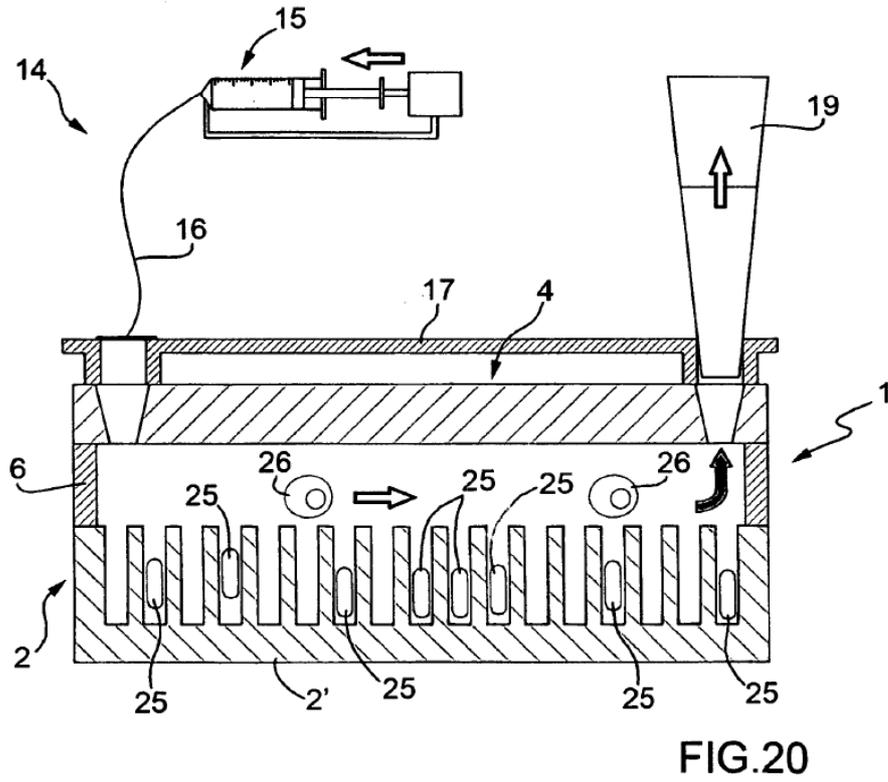
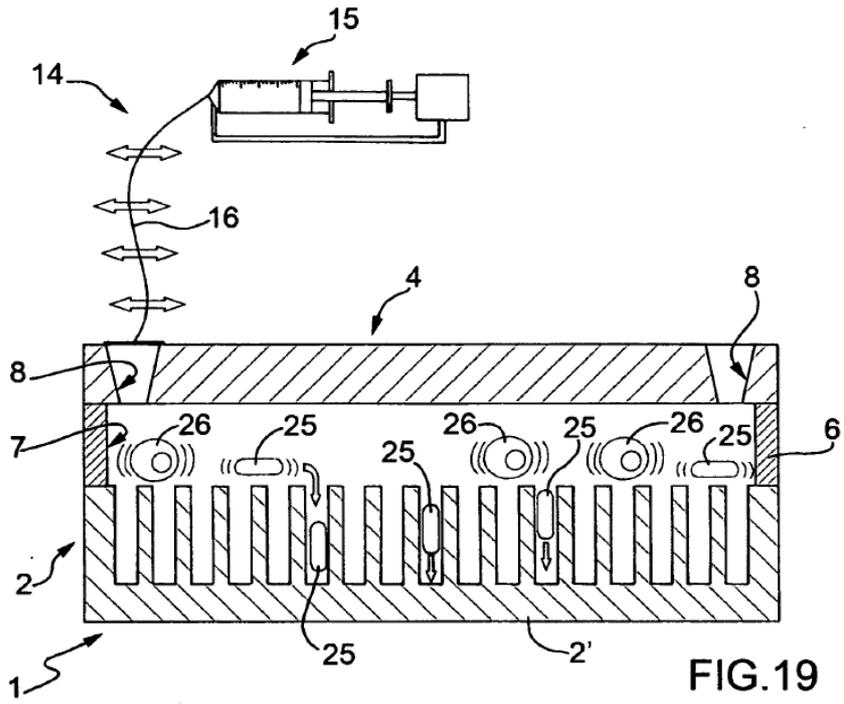
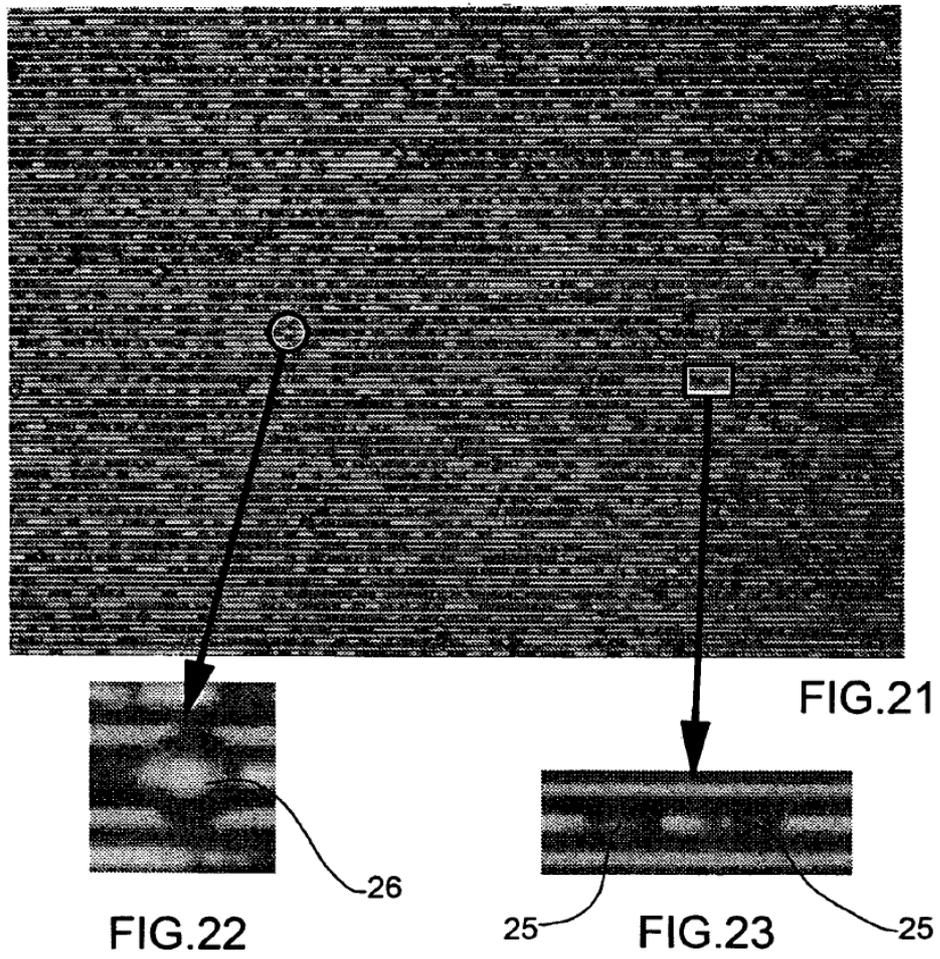


FIG. 13









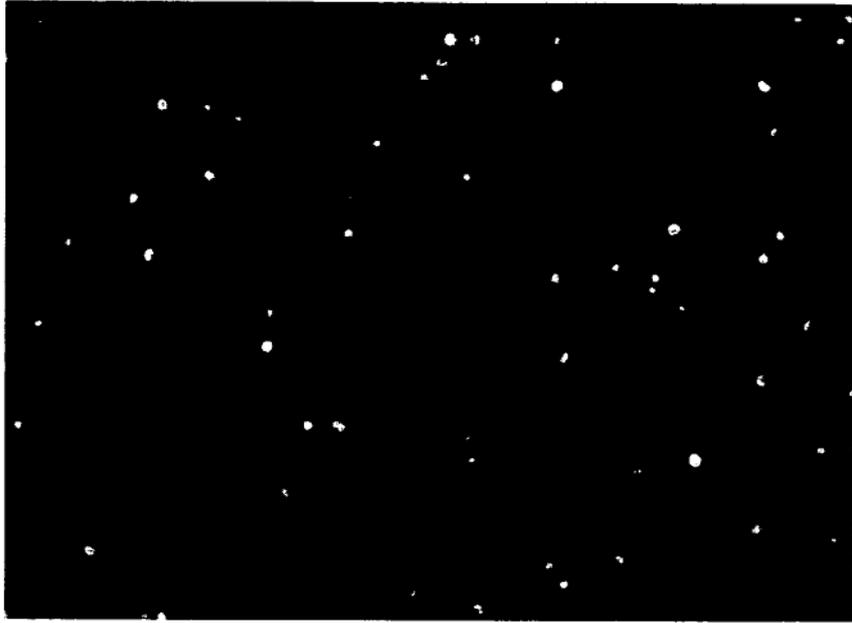


FIG.24



FIG.25

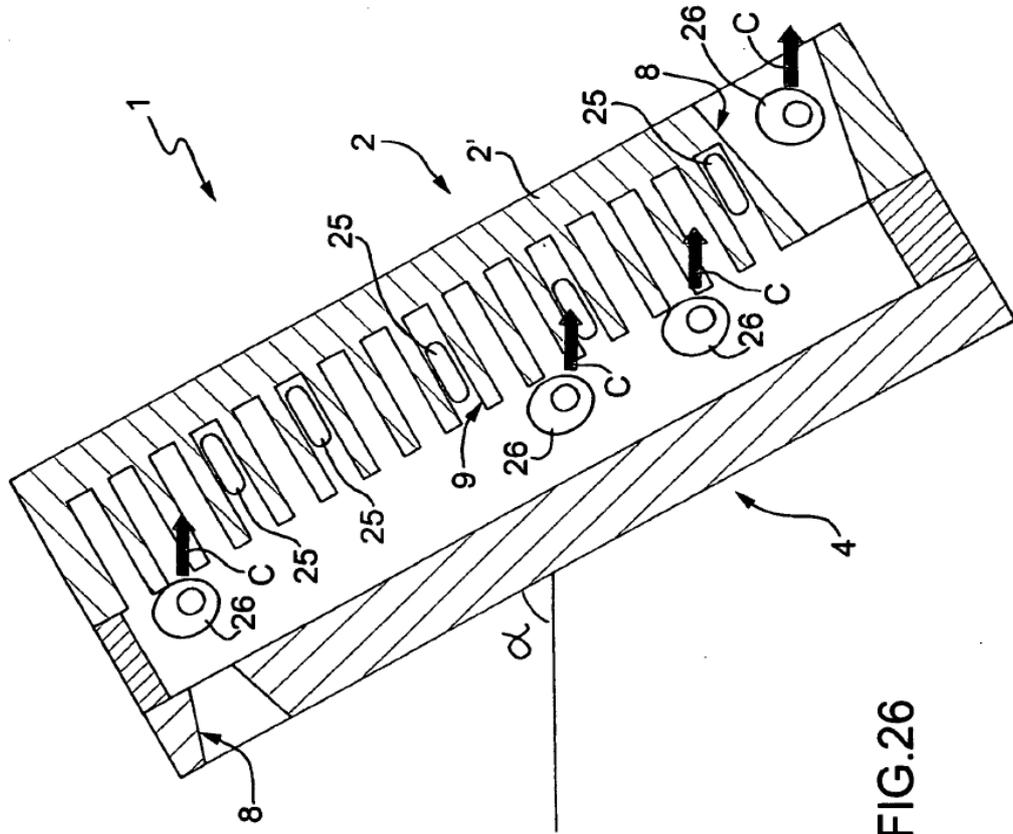
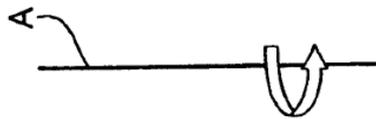


FIG. 26



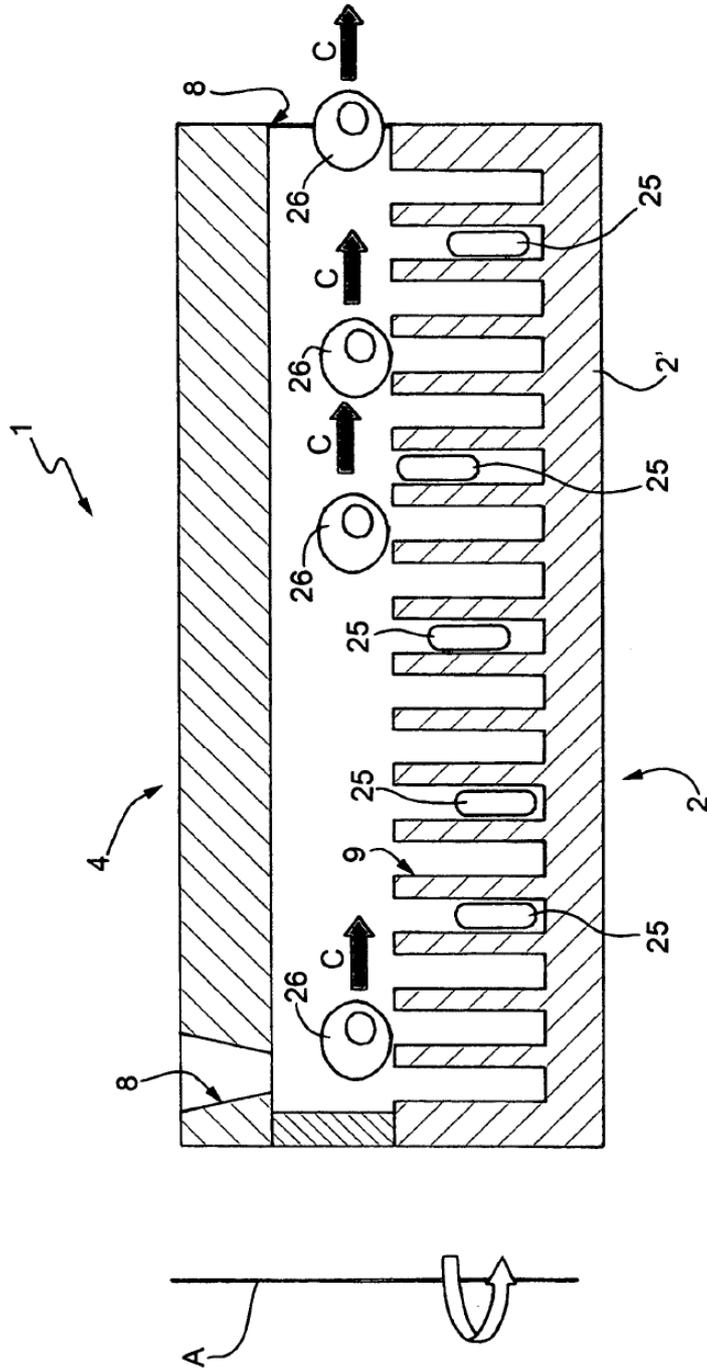


FIG.27