

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 120**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)  
**B01L 3/00** (2006.01)  
**G01N 15/02** (2006.01)  
**C12Q 1/24** (2006.01)  
**G01N 33/49** (2006.01)  
**C12N 5/09** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14159725 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2790020**

54 Título: **Métodos para la separación de partículas utilizando un aparato con un elemento de separación por discriminación del tamaño que tiene un borde de ataque alargado**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361794468 P**  
**12.11.2013 US 201314077811**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.06.2016**

73 Titular/es:

**ANGLE NORTH AMERICA, INC. (100.0%)**  
**3711 Market Street**  
**Philadelphia, PA 19104-5504, US**

72 Inventor/es:

**HVICHIA, GEORGI**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 573 120 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**

Métodos para la separación de partículas utilizando un aparato con un elemento de separación por discriminación del tamaño que tiene un borde de ataque alargado

Antecedentes de la divulgación

5 Se han descrito dispositivos mecánicos destinados a la manipulación de células biológicas y otras pequeñas partículas y que tienen elementos estructurales con dimensiones que van desde decenas de micrómetros (las dimensiones de las células biológicas) a nanómetros (las dimensiones de algunas macromoléculas biológicas). Por ejemplo, la patente US número 5,928,880, la patente US número 5,866,345, la patente US número 5,744,366, la patente US número 5,486,335, y la patente US número 5,427,946 describen dispositivos para la manipulación de células y moléculas biológicas.

10 La patente US 7,993,908 y las solicitudes PCT publicadas no. WO 03/008931, WO 2009/131645 y WO 2011/066497, todos las cuales tienen la misma titularidad que la invención ahora reivindicada, describen dispositivos a microescala para separar células y otras partículas en función de su tamaño. El tipo de dispositivo descrito en dichas descripciones incluye un elemento de separación escalonada interpuesto entre dos zonas de un espacio hueco formado por una cubierta y un cuerpo, y la separación de partículas dentro del aparato se rige por la capacidad de las partículas, presentes inicialmente en una zona, de atravesar el elemento de separación escalonada para llegar a la otra zona. La materia objeto que se divulga en el presente documento se considera una mejora sobre lo divulgado previamente en tales dispositivos.

15 Vankrunkelsven y otros, "Un nuevo dispositivo de micropasos para la separación por tamaño de las células", Electrophoresis, Wiley Interscience, vol. 25, junio de 2004, páginas 1714-1722 y la solicitud PCT publicada WO 2005/036139 describen también dispositivos para la separación por tamaño de partículas tales como células en un fluido.

20 La materia objeto que se divulga en el presente documento se puede utilizar para separar y manipular células biológicas, orgánulos, conglomerados de células, y otras partículas de poblaciones mixtas de partículas o de células.

25 **Resumen de la divulgación**

La presente invención se basa en lo establecido en las reivindicaciones.

En un aspecto se proporciona por tanto un dispositivo para separar partículas más pequeñas y más grandes, por ejemplo separando células tumorales circulantes de células sanguíneas en una muestra sanguínea completa, comprendiendo el aparato:

30 un cuerpo (2) y una cubierta (4) que definen un espacio hueco (50) entre ellos, el espacio hueco (50) que contiene

35 un elemento (1) de separación que separa una zona (52) de entrada y una zona (58) de salida del espacio hueco (50), el elemento (1) de separación que define, junto con una superficie del espacio hueco (50),

un canal que conecta de forma fluida las zonas de entrada y salida por medio de una porción de separación, teniendo el canal

40 una anchura total en la porción de separación y

una altura definida por la distancia entre el elemento (1) de separación y la superficie del espacio hueco (50),

45 al menos uno de, el cuerpo (2), la cubierta (4), y el elemento (1) de separación portando una etapa de separación dispuesta dentro y que tiene un borde de ataque que se extiende completamente a través de la porción de separación del canal, por lo que el canal está dividido en una porción aguas arriba, en el lado de entrada del borde de ataque y una porción aguas abajo laminar, en el lado de salida del borde de ataque,

la altura de la porción aguas arriba siendo suficiente para facilitar el paso a través suyo tanto de las particulares más grandes como de las más pequeñas,

50 la altura de la porción aguas abajo que es suficientemente grande como para facilitar el paso a través suyo de las partículas más pequeñas y suficientemente pequeña para inhibir el paso a través suyo de las partículas más grandes, y

la longitud del borde de ataque siendo al menos 20 veces mayor que la anchura total del canal en el zona de separación,

5 en el que la porción aguas arriba del canal es laminar en una zona entre la zona (52) de entrada y el elemento (1) de separación y

en el que el borde de ataque tiene una forma ondulada,

mediante el cual las partículas pueden ser separadas haciéndolas pasar a través del canal, y recuperando las partículas basándose en su capacidad para atravesar la etapa de separación.

10 De manera más general, la presente divulgación se refiere por tanto a un aparato para separar partículas más pequeñas y más grandes. El aparato incluye un cuerpo y una cubierta que definen un espacio hueco entre ellos. El espacio hueco contiene un elemento de separación que separa una zona de entrada y una zona de salida del espacio hueco. Junto con uno o más superficies del espacio hueco, el elemento de separación define un canal que conecta de forma fluida las zonas de entrada y de salida por medio de una porción de separación. El canal tiene una anchura total  
15 en la porción de separación y una altura definida por la distancia entre el elemento de separación y la superficie del espacio hueco. Al menos uno de, el cuerpo, la cubierta, y el elemento de separación porta una etapa de separación dispuesta dentro y que tiene un borde de ataque que se extiende, de forma sustancial, por completo a través de la porción de separación del canal. El canal está dividido en una porción aguas arriba, en el lado de entrada del borde de ataque y una porción aguas abajo sustancialmente laminar, en el lado de salida del borde de ataque. La altura de  
20 la porción aguas arriba es suficiente para facilitar el paso a través suyo, tanto de las partículas más grandes como de las más pequeñas. La altura de la porción aguas abajo es suficiente grande para facilitar el paso a través suyo de las partículas más pequeñas y suficientemente pequeño para inhibir el paso a través suyo de las partículas más grandes. La anchura del borde de ataque es sustancialmente mayor que la anchura total del canal, en la zona de separación (la cual tiene normalmente la misma anchura que la de la etapa de separación, lo que significa que el borde de ataque  
25 de la etapa de separación es normalmente más largo que el ancho de esa etapa). Las partículas pueden estar separadas pasándolas a través del canal y recuperando partículas en función de su capacidad para atravesar la etapa de separación.

En un modo de realización, la porción aguas arriba del canal es sustancialmente laminar, lo que significa que se define por dos superficies anchas que son sustancialmente paralelas entre sí.

30 La anchura del borde de ataque puede ser sustancialmente (por ejemplo, al menos 100 veces) mayor que una dimensión característica de las partículas más grandes, por lo que muchas de esas partículas pueden quedar atrapadas en el borde de ataque, sin evitar, de forma sustancial, el flujo de todo el fluido más allá del borde de ataque. La anchura del borde de ataque, en un dispositivo de la invención, también será sustancialmente (es decir, al menos  
35 20, por ejemplo 50, 100, 500, 1000, 10000, o 100000 veces) mayor que la anchura total del canal en la zona de separación (o la anchura de la etapa de separación dentro del canal). A modo de ejemplo, la altura de la porción aguas abajo (es decir, la porción del canal del borde de ataque de la etapa de separación) se puede seleccionar de manera que sea lo suficientemente pequeña para inhibir el paso a través suyo de un tipo de célula seleccionado (por ejemplo, una célula tumoral circulante o células similares a células madre de feto humano), suficientemente grande, que no inhiba el paso a través suyo de un tipo de célula seleccionado (por ejemplo, glóbulos rojos humanos), o una  
40 combinación de éstos.

El borde de ataque de este tipo de etapa de separación en un dispositivo de la invención tendrá una forma ondulada. Esta puede ser de una forma invaginada o irregular. El etapa de separación puede tener, en el lado de entrada, una cara aguas arriba que es sustancialmente perpendicular a la porción de la etapa que define la porción aguas abajo del canal.

45 El elemento de separación puede ser integral con al menos uno de, el cuerpo y la cubierta. También puede ser un elemento separado interpuesto entre el cuerpo y la cubierta. El dispositivo puede tener uno o más soportes para el mantenimiento de la altura del canal. Tales soportes se pueden disponer dentro del canal y se extienden entre el elemento de separación y la superficie del espacio hueco, por ejemplo.

50 La divulgación también se refiere a procedimientos de separación de partículas más grandes y más pequeñas. Estos métodos incluyen proporcionar una suspensión fluida de partículas más grandes y más pequeñas en la entrada del aparato descrito en el presente documento. El fluido se hace pasar a través del canal y se puede recoger por lo menos uno de i) partículas más pequeñas (por ejemplo, glóbulos rojos sanguíneos) en la zona de salida, y ii) partículas más grandes (por ejemplo, células tumorales circulantes) aguas arriba del borde de ataque de la etapa de separación.

55 La divulgación también se refiere a métodos de diagnóstico de la aparición de un tumor en un sujeto vertebrado. Estos métodos incluyen las etapas de i) proporcionar una muestra sanguínea obtenida del sujeto a la zona de entrada del aparato descrito en este documento (la altura de la porción laminar de la porción aguas abajo del canal es menor que el tamaño de un CTC), hacer pasar la muestra a través del canal del aparato, y después examinar la porción del aparato aguas arriba del borde de ataque de la etapa de separación para detectar la presencia de una célula. La

presencia de al menos una célula es una indicación de que hay un tumor en el sujeto. A partir de entonces se pueden emplear una o más pruebas de diagnóstico para evaluar una característica de una célula tumoral para la al menos una célula que estaba presente aguas arriba del borde de ataque de la etapa de separación, después de pasar la muestra a través del canal. Ejemplos de tales pruebas incluyen la unión a la célula o a un extracto de la misma con un anticuerpo específico de tejido o un anticuerpo específico de tumor, ácidos nucleicos obtenidos a partir de dicha célula la cual estaba presente aguas arriba del borde de ataque, o la evaluación de la capacidad proliferativa de la célula.

La divulgación se refiere además a métodos para evaluar la eficacia de un tratamiento de tumor para un sujeto afectado con un tumor. Estos métodos incluyen el aislamiento de CTCs a partir de muestras sanguíneas obtenidas del sujeto antes y después del tratamiento, utilizando los métodos descritos en el presente documento. Al menos una característica de los CTCs aislado de las muestras es comparada entre las muestras. Una diferencia en las características de los CTCs (por ejemplo, concentración de CTC o número) aislados de las muestras sanguíneas es una indicación de la eficacia del tratamiento.

La divulgación también se refiere a métodos para reducir la carga de CTC en un sujeto vertebrado. Tales métodos incluyen las etapas de i) proporcionar sangre obtenida del sujeto en la entrada del aparato descrito en el presente documento (en el que la altura de la porción laminar de la porción aguas abajo del canal es menor que el tamaño de un CTC), ii) hacer pasar la sangre a través del canal para eliminar CTCs de la sangre, iii) recoger la sangre sin CTC en la zona de salida, y iv) devolver la sangre sin CTC al sujeto.

Breve descripción de las distintas vistas de los dibujos

El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la invención, se comprenderá mejor cuando se lea conjuntamente con los dibujos adjuntos. Estos dibujos se incluyen con el propósito de ilustrar la divulgación. La divulgación no se limita a las disposiciones precisas ni a los instrumentos mostrados.

La figura 1 se compone de las figuras 1A, 1B, 1C y 1D, e ilustra un elemento 1 de separación del estado de la técnica anterior el cual tiene dos etapas en forma de losa rectangular, integrales, que incluyen una etapa 10 de enfoque y una etapa 11 de separación. Dispositivos que tiene un elemento de separación de este tipo se divulgan en la patente US 7,993,908, por ejemplo. La Figura 1A es una vista elevada del elemento 1 de separación en el que la forma rectangular de la cara 20 de la etapa 10 de enfoque se puede ver adyacente la cara 40 ancha de la misma y la forma rectangular de la cara 21 de la etapa 11 de separación se puede ver el adyacente la misma cara 41 ancha. La figura 1B es una vista lateral del elemento 1 de separación mostrado en la figura 1A, que muestra la diferencia de altura entre las etapas de enfoque y de separación (10 y 11, respectivamente). La figura 1C es una vista ortogonal del elemento 1 de separación mostrado en las figuras 1A y 1B. La figura 1D es una vista sección transversal del elemento 1 de separación dispuesto en un canal de fluido definido por el espacio entre una cubierta 4 y el cuerpo 2 de un aparato descrito en este documento. En la figura 1D se muestra la altura ( $h_1$ ) de una porción aguas abajo del canal de fluido, la altura ( $h_0$ ) de una porción aguas arriba del canal de fluido, y la altura ( $h_c$ ) del propio canal de fluido. La altura ( $h_1$ ) de la porción aguas abajo está definida por la distancia entre la etapa 11 de separación y la cubierta 4, y la altura ( $h_0$ ) de la zona aguas arriba está definida por la distancia entre la etapa 10 de enfoque y la cubierta 4.

La figura 2 se compone de las figuras 2A, 2B y 2C e ilustra un elemento de separación 1 y que tiene una etapa 10 de enfoque en forma de losa rectangular y una etapa 11 de separación que tiene una forma de losa pero que tiene una cara 21 ondulada y un borde 31 de ataque. La figura 2A, es una vista elevada del elemento 1 de separación en la cual la forma ondulada de la cara 21 de la etapa 11 de separación se puede ver adyacente a la cara 41 ancha de la misma. La figura 2B es una vista lateral de un elemento 1 de separación mostrado en la figura 2A, la cual muestra la diferencia de altura entre las etapas de enfoque y de separación (10 y 11, respectivamente). La figura 2C es una vista ortogonal del elemento 1 de separación mostrado en las figuras 2A y 2B.

La figura 3 se compone de las figuras 3A, 3B y 3C e ilustra un elemento 1 de separación que tiene una etapa 10 de enfoque en forma de losa rectangular y una etapa 11 de separación que tiene forma de losa pero que tiene una cara irregular y un borde de ataque. La figura 3A es una vista elevada de un elemento 1 de separación en el cual la forma rectangular de la cara de la etapa 10 de enfoque se puede ver adyacente a la cara ancha 40 de la misma y la forma irregular de la cara de la etapa 11 de separación se puede ver adyacente a la cara 41 ancha de la misma. La figura 3B es una vista lateral del elemento 1 de separación mostrado en la figura 3A, mostrando la diferencia de altura entre las etapas de enfoque y de separación (10 y 11, respectivamente). La figura 3C es una vista ortogonal del elemento 1 de separación mostrada en las figuras 3A y 3B.

La figura 4 se compone de las figuras 4A, 4B y 4C, e ilustra un elemento 1 de separación, que tiene una etapa 10 de enfoque rectangular y tres etapas por encima de ella y aguas abajo (con respecto a BFF) a partir del borde de ataque. Cada una de las, primera etapa 11 de separación, segunda etapa 12 separación, y tercera etapa 13 de separación, tiene un borde de ataque en forma de chebrón (bordes de ataque 31,32, y 33, respectivamente). Se indica la dirección de todo el fluido BBF. La figura 4A es una vista elevada de un elemento 1 de separación. La figura 4B es una vista lateral de un elemento 1 de separación mostrado en la figura 4A, que muestra la diferencia de altura entre las etapas. Una porción rebajada del elemento 1 de separación aguas abajo de las etapas 11-13 forma parte de un conducto de paso de salida a través del cual el material que ha atravesado a todas las etapas 10-13 se puede llevar lejos del

- elemento 1 de separación. La figura 4C es una vista en sección transversal del elemento 1 de separación dispuesto en un canal de fluido definido por un espacio hueco entre una cubierta 4 y un cuerpo 2 de un aparato descrito en este documento. En la figura 4C se muestran las alturas ( $h_3$ ,  $h_2$ , y  $h_1$ , respectivamente) de las porciones en serie aguas abajo del canal de fluido, la altura ( $h_0$ ) de una porción aguas arriba del canal de fluido y la altura ( $h_c$ ) del propio canal de fluido. La altura ( $h_3$ ) de la tercera porción aguas abajo está definida por la distancia entre la tercera etapa 13 de separación y la cubierta 4. La altura ( $h_2$ ) de la segunda porción aguas abajo está definida por la distancia entre la segunda etapa 12 de separación y la cubierta 4. La altura ( $h_1$ ) de la primera porción aguas abajo está definida por la distancia entre la primera etapa 11 de separación y la cubierta 4. La altura ( $h_0$ ) de la porción aguas arriba está definida por la distancia entre la etapa 10 de enfoque y la cubierta 4.
- 5 La figura 5 se compone de las figuras 5A y 5B e ilustra a un elemento 1 de separación que tiene una etapa 10 de enfoque y una cara 20 de transición curvada la cual se extiende completamente a través del elemento 1 de separación y de las tres etapas de separación encima de ella aguas abajo (con respecto a BBF) a partir de la etapa 10 de enfoque. Cada una de las, primera etapa 11 de separación, segunda etapa 12 de separación, y tercera etapa 13 de separación tiene un borde de ataque curvado, lo que significa que la anchura del borde de ataque de cada etapa 11-13 de separación es mayor que su anchura (a diferencia de la longitud del borde 30 de ataque de la etapa 10 de enfoque que es igual a su anchura). Se indica la dirección de todo el flujo defluído BBF. La figura 5A es una vista elevada del elemento 1 de separación. La figura 5B es una vista lateral del elemento 1 de separación mostrado en la figura 5A, que muestra la diferencia de alturas entre las etapas. Una porción rebajada del elemento 1 de separación aguas abajo de las etapas 10-13 forma parte de un conducto de paso de salida a través del cual el material que ha atravesado todas las etapas 10-13 se puede llevar lejos del elemento 1 de separación.
- 10 La figura 6 se compone de las figuras 6A y 6B, e ilustra un elemento 1 de separación, el cual tiene una etapa 10 de enfoque rectangular y tres etapas de separación encima de ella y aguas abajo (con respecto a BFF) a partir de su borde de ataque. Cada una de las, primera etapa 11 de separación, segunda etapa 12 de separación, y tercera etapa 13 de separación tienen un borde de ataque en forma serpenteante. Se indica la dirección de todo el fluido BBF. La figura 6A es una vista elevada del elemento 1 de separación. La figura 6B es una vista lateral del elemento 1 de separación mostrado en la figura 6A, que muestra la diferencia de alturas entre las etapas.
- 15 La figura 7 se compone de las figuras 7A, 7B, 7C, y 7D (que se han dibujado a escala aproximada unas con respecto a las otras) e ilustra cuatro configuraciones de etapas que tienen la misma anchura ( $B$ , equivalente a 5 veces el ancho del canal) en un canal de fluido indicado por líneas gruesas. Se indica la dirección del flujo de todo el fluido (BFF), y la altura de la etapa aumenta desde el lado aguas arriba al lado aguas abajo de la etapa, que se indica por una línea que se extiende a través del canal de fluido en las figuras. En la Figura 7A, la altura de la etapa aumenta a través de la mitad del canal de fluido en una posición relativamente aguas arriba y a través de la otra mitad del canal de fluido en una posición relativamente aguas abajo, con la cara de la etapa extendiéndose entre estas dos posiciones. La longitud ( $L$ ) de la cara de la etapa extendida es igual a cuatro veces la anchura ( $W$ ) del canal de fluido en la figura 7A, obteniendo un total  $B$  de la etapa igual a  $5W$ . En la Figura 7B, la etapa tiene dos porciones que se extienden entre una posición aguas arriba y una posición aguas abajo. Aunque la longitud de la extensión de la cara de la etapa en la dirección de BFF es sólo  $2W$ , hay dos de dichas extensiones. Como resultado, la anchura total de la cara en la figura 7B es  $2 \times 2W + W$ , o  $5W$ . Del mismo modo, la etapa mostrada en la figura 7C, que tiene tres porciones que se extienden entre las posiciones aguas arriba y aguas abajo (es decir, cuatro extensiones de la cara de etapa de longitud  $W$ ) presenta una  $B$ , de  $4 \times W + W$ , o  $5W$ . La etapa mostrada en la figura 7D, que tiene cinco porciones que se extienden entre las posiciones aguas arriba y aguas abajo (es decir, ocho extensiones de la cara de etapa de longitud  $W/2$ ) presenta una  $B$ , de  $8 \times W/2 + W$ , o  $5W$ . Es de destacar que  $L$  de las etapas que tienen igual  $B$  disminuye al aumentar la invaginación de los pasos. Esto ilustra que la miniaturización de la funcionalidad de separación de partículas de una etapa se puede lograr mediante el aumento de la complejidad ( $B/L$ ) de la cara de etapa.
- 20 La figura 8 es un modo de realización de un dispositivo de separación de partículas, como el que aquí se reivindica, construido para tener un tamaño de aproximadamente igual a un portaobjetos de microscopio común. Las zonas 52 y 58 de entrada y de salida se muestran, como en la porción 55 de separación del canal que se extiende entre las zonas de entrada y salida 52 y 58.
- 25 La Figura 9 es una imagen ampliada de células de cáncer de próstata PC3 capturada utilizando un aparato de separación descrito en este documento. En cada imagen, las células se pueden ver sobre o aguas arriba (el flujo de todo el fluido es de izquierda a derecha en la figura) de la primera etapa 11 de separación y la segunda etapa 12 de separación, mientras que pocas o ninguna célula están presentes en la etapa 10 de enfoque.
- 30 La Figura 10 se compone de las figuras 10A y 10B. Cada uno de ellas es una imagen ampliada de las células de cáncer de próstata PC3 capturada utilizando un aparato de separación descrito en este documento. En cada imagen, las células se pueden ver sobre o aguas arriba (el flujo de todo el fluido es de izquierda a derecha en la figura) de la primera etapa 11 de separación, la segunda etapa 12 de separación, y la tercera etapa 13 de separación, mientras que pocas o ninguna célula están presentes en la etapa 10 de enfoque.

Descripción detallada

La divulgación se refiere a un aparato de etapas de separación de partículas basándose en su capacidad para atravesar un conducto de paso. Las partículas (por ejemplo, partículas en suspensión en un fluido líquido o gaseoso o partículas en un vacío) se mueven a través de un conducto de paso 55 escalonado definido por un elemento 1 de separación en el aparato. Los conductos de paso 55 escalonado conectan porciones de un espacio hueco 50 definido por un cuerpo 2 y una cubierta 4, y el elemento 1 de separación está presente dentro del espacio hueco 50 y separa las zonas de entrada y salida (52 y 58, respectivamente) que son zonas del espacio hueco 50. El elemento 1 de separación puede ser un elemento discreto, o puede estar unido a o integral a uno de, el cuerpo 2 y la cubierta 4.

El conducto de paso 55 escalonado se conecta de forma fluida a la zona 52 de entrada y a la zona 58 de salida del espacio hueco 50, y contiene al menos un conducto de paso 101 de separación que tiene una dimensión estrecha definida por la distancia entre la cara 41 de una etapa (primera) 11 de separación y otra porción del conducto de paso 101 (primero) de separación, tales como la cara del cuerpo 2 o de la cubierta 4. Sólo algunas partículas en el fluido son capaces de moverse dentro del conducto de paso 101 de separación. El resultado neto es que algunas partículas pueden moverse a través del conducto de paso 55 escalonado, mientras que otras partículas son retenidas dentro del aparato, tal como aguas arriba del conducto de paso 101 de separación. La separación de las partículas es por lo tanto alcanzada. El movimiento de las partículas puede estar motivado por el flujo de fluido, la gravedad, la vibración, o cualquier combinación de éstos, por ejemplo.

En contraste con los dispositivos análogos descritos, por ejemplo, en la patente US 7,993,908 (que se ilustra en la figura 1), el borde 31 de ataque y la cara 41 de transición de por lo menos una de las etapas de separación de un dispositivo de la invención, tiene una anchura sustancialmente mayor (en un factor de al menos 20, por ejemplo 25) que la anchura de la etapa de separación (es decir, mayor que la anchura del conducto de paso 55 escalonado en el que está dispuesto la etapa 11 de separación.) Debido a la separación de las partículas en todo el fluido fluyendo, una etapa 11 de separación tiende a ocurrir sobre todo en el borde de ataque y en la cara 21 de la etapa, aumentando la anchura de estos, con respecto a la anchura de la etapa 11 de separación y el conducto de paso puede tener varios efectos beneficiosos.

Las partículas que fluyen más allá de una etapa 11 de separación, en todo el fluido tendrán necesariamente un tamaño, en al menos una dimensión, no mayor que la altura del conducto de paso 101 de separación, por encima de la etapa 11 de separación (es decir, la dimensión estrecha del conducto de paso de separación; de lo contrario las partículas serían incapaces de pasar a través del mismo con todo el fluido). Del mismo modo, las partículas que tienen dimensiones mayores que la altura del conducto de paso 101 de separación, por encima de la etapa 11 de separación, dejarán de fluir con todo el fluido en o cerca del borde 31 de ataque o de la cara 21 de transición de la etapa 11 de separación y tenderán a acumularse allí. Aumentando la anchura de la cara 21 de transición y del borde 31 de ataque más allá de la anchura total del conducto de paso en el que se dispone la etapa 11 de separación, se permite que múltiples partículas se puedan alojar en el borde 31 de ataque o en cualquier lugar a lo largo de la cara 21 de transición (por ejemplo, si la cara está inclinada). Por tanto, el aparato en el que el borde de ataque tiene una anchura mayor que la anchura total del conducto de paso 101 de separación, puede ser utilizado para capturar una o más partículas separadas por tamaño en o cerca del borde 31 de ataque de la etapa 11 de separación. A medida que la anchura del borde 31 de ataque de la etapa 11 de separación aumenta, un mayor número de partículas separadas por tamaño puede ser capturado en la cara 21 de transición del mismo sin obstruir el dispositivo. Como se ha indicado anteriormente, se consigue mediante un dispositivo de la invención que la relación de la anchura de una etapa de separación sea sustancialmente mayor (por lo menos 20, por ejemplo 50, 100, 500, o 1000 veces mayor) que la anchura del conducto de paso que limita los extremos del borde de ataque de la etapa de separación.

Con el fin de adaptar un borde 21 de ataque que tiene una anchura mayor que la anchura del conducto de paso 101 de separación, el borde 21 de ataque y la cara 31 de transición de una etapa 11 de separación no deben extenderse en línea recta a través del anchura más estrecha del conducto de paso 101 de separación. El borde de ataque puede ser recto (por ejemplo, extendiéndose oblicuamente a través del conducto de paso 101 en una dirección distinta a la dimensión más estrecha del mismo) o compuesto de una recta de múltiples segmentos (ver las figuras 4 y 7). El borde 21 de ataque también puede ser curvado (ver la figura 5), invaginado (ver las figuras 2, 3, y 6), o en forma de meandro (ver la figura 3), lo que aumenta su anchura (y la de su correspondiente etapa 11 de separación y su cara 21 de transición) con relación a la anchura del conducto de paso 101 de separación. Como resultado de que el borde de ataque tenga formas onduladas ahora enseñado por una etapa separación de un dispositivo de la invención, se puede aumentar la capacidad de captura, en relación con los dispositivos de la técnica anterior en los que las etapas 11 de separación se extendían directamente a través de la anchura del conducto de paso 101 de separación.

En un modo de realización, el borde de ataque de la cubierta es muy curvado (por ejemplo, tiene muchas invaginaciones, tales como la invaginación que se muestra en las etapas 11-13 de separación en la figura 6), de modo que su anchura es significativamente mayor que toda la anchura del conducto de paso en el que está contenida la etapa. A modo de ejemplo, las figuras 4, 5, y 6 ilustran un elemento 1 de separación de cuatro etapas que puede ser dispuesto dentro de un conducto que tiene una sección transversal sustancialmente rectangular. En las figuras 4, 5 y 6, el elemento 1 de separación tiene una anchura total igual a la anchura (es decir, en la dirección perpendicular al flujo de todo el fluido BBF) del conducto de paso 101 de separación. El elemento 1 de separación en cada una de estas figuras incluye una etapa 10 de enfoque que se extiende directamente a través del conducto de paso 101 de

separación (como las etapas en los dispositivos de la técnica anterior) y por tanto, tiene una anchura igual a la anchura total del conducto de paso.

5 En la Figura 4, el borde de ataque de cada una de las etapas 11-13 de separación tiene una anchura mayor que la anchura total del conducto de paso 101 de separación - si el vértice del borde de ataque en forma de chebrón de cada etapa es de ángulo recto, entonces la longitud del borde de ataque de cada etapa es (por aplicación de la ecuación de Pitágoras) igual al doble de la raíz cuadrada de (el cuadrado de la anchura del conducto de paso dividido por dos) (es decir, si la anchura del conducto de paso 101 de separación es una unidad, entonces la anchura de cada paso es de aproximadamente 1,4 unidades).

10 En la figura 5, la anchura del borde de ataque de cada una de las etapas 11-13 de separación es mayor que la anchura total del conducto de paso 101 de separación a causa de la curvatura del borde de ataque de cada etapa.

En la figura 6, la anchura del borde de ataque de cada una de las etapas 11-13 de separación es más larga todavía, debido a la curvatura y a la invaginación de cada etapa.

15 Las geometrías mostradas en las figuras 4-6 son para fines ilustrativos. Los bordes de ataque de la etapa pueden tener innumerables formas geométricas. Las formas que se muestran en estas figuras simplemente ilustran el concepto de que el aumento de la complejidad (especialmente 'plegado' o invaginación) del borde de ataque puede provocar que la anchura del borde de ataque de cualquier etapa sobrepase ampliamente la anchura total del conducto de paso dentro de la cual se produce la etapa. En otro modo de realización del elemento de separación mostrado en las figuras 4-6, el elemento de separación carece de etapa 10 de enfoque y las etapas 11-13 de separación son integrales con tres paredes adyacentes de los conductos de paso 101-103 de separación sustancialmente rectangulares, en los que está dispuesto el elemento 1 de separación.

20 Las partículas incapaces de atravesar una etapa de separación se pueden hacer pasar en la dirección del flujo de todo el fluido a lo largo del borde de ataque de la etapa de separación. Así, por ejemplo, las partículas que son capaces de atravesar el conducto de paso, pero son incapaces de atravesar etapas de separación del dispositivo mostrado en la figura 6 tienden a ser empujadas por el flujo de todo el fluido hacia la invaginación central de las etapas de separación y hacia los bordes periféricos de esas etapas. Aunque no se muestra, las formas de los bordes de ataque de las etapas de separación ilustradas en las figuras 4 y 5 pueden estar invertidas con relación a la dirección de BFF que se muestra en esas figuras (es decir, de modo que los vértices de las etapas en forma de chebrón y las etapas curvas se encuentran aguas abajo a partir de los bordes de las etapas). Las etapas, de este modo, se pueden conformar para facilitar o promover la acumulación de partículas en lugares seleccionados a lo largo de sus bordes de ataque.

25 Las partículas capturadas en el borde 31 de ataque o a lo largo de la cara 21 de transición de una etapa 11 de separación (es decir, una etapa mas allá cuyas algunas, pero no todas, partículas en todo el fluido se pueden mover con todo el fluido fluyendo más allá de la etapa) tenderán a ocluir de flujo de fluido más allá de la etapa en o sobre la cual han sido capturadas (es decir, en la posición en la que su movimiento con todo el fluido se detiene o se inhibe sustancialmente). Si las partículas capturadas ocluyen el flujo de fluido más allá de una porción sustancial (por ejemplo, >0,01% ,>0,1% ,>1% ,>10% ,>50% ,>90% , o >99%) del conducto de paso escalonado, esto disminuirá el rendimiento del conducto de paso 101 de separación (es decir, el volumen de fluido que se puede pasar a través del conducto de paso estrecho en una unidad de tiempo a una caída de presión del fluido seleccionada a través de la etapa) se puede disminuir de manera significativa.

30 Mediante el aumento de la anchura del borde 31 de ataque de al menos una etapa 11 de separación (es decir, con relación a la anchura total del espacio dentro del cual está contenida la etapa 101 de separación), las partículas capturadas ocuparán individualmente un porcentaje más pequeño del área de flujo del conducto de paso 101 de separación, reduciendo la oclusión de flujo y aumentando la capacidad del aparato para mantener un caudal casi constante. El rendimiento constante puede reducir la necesidad de equipos de control del flujo de fluido, complicados o costosos, ya que la caída de presión en el aparato debe permanecer sustancialmente constante siempre que el rendimiento siga siendo sustancialmente constante. Un borde 31 de ataque muy ancho puede, por tanto reducir, de manera significativa, la tendencia del aparato a experimentar una disminución de rendimiento para las muestras con cantidades importantes de partículas capturadas. Dicho aparato también puede capturar un mayor número de partículas separadas por tamaño sin exhibir un rendimiento significativamente disminuido.

35 La invención reivindicada en el presente documento es complementaria a la materia objeto divulgada en solicitudes internacionales de patente nos. PCT/US2002/022689, PCT/US2009/002421, PCT/US2010/046350 y PCT/US2010/058172 publicadas como WO 03/008931, WO 2009/131645, WO 2011/066497 y WO 2011/028483 respectivamente.

#### Definiciones

55 Como se emplean en este documento, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado con él en esta sección.

Para el fluido que fluye a través de un conducto de paso en el que está dispuesto un elemento 1 de separación como el que se describe en el presente documento, la "altura" del conducto de paso es la distancia mínima entre las superficies del conducto de paso entre los cuales está intercalado el elemento 1 de separación. Por ejemplo, en cada una de las figuras 1D y 4C, un elemento 1 de separación está intercalado entre un cuerpo 2 y una cubierta 4. La distancia mínima entre las caras paralelas del cuerpo 2 y de la cubierta 4 definen la altura ( $h_c$ ) del conducto de paso. También es visible en estas figuras la altura ( $h_0$ ) de los conductos de paso por encima de la etapa 10 de enfoque de los elementos 1 de separación y las alturas ( $h_1$ ,  $h_2$ , y  $h_3$ ) de los conductos de paso 101, 102, y 103 de separación por encima de las etapas 11, 12, y 13 de separación, respectivamente. No es crítico que la dimensión "altura" esté orientada verticalmente con respecto a la gravedad durante el funcionamiento de los dispositivos descritos en este documento.

Una etapa "de enfoque" no es más que una etapa que está dispuesta en (y preferiblemente se extiende en la mayor parte del camino o completamente a través) el canal en el lado de entrada de una etapa de separación. Una etapa de enfoque dirige esencialmente el flujo de fluido a través del canal hacia la porción del conducto de paso estrecho definido por la etapa de separación, reduciendo las posibles áreas de "volumen muerto" en las que se produce poco o ningún flujo de fluido local. El canal debería tener una mayor altura en el lado de entrada de la etapa de enfoque que en su lado de salida, tal y como con una etapa de enfoque inclinada, o la etapa de enfoque puede tener una conformación más similar a una escalera, que incluye múltiples etapas. Dispositivos descritos en este documento no es necesario que incluyan una etapa de enfoque, pero la inclusión de una etapa de separación puede ser importante en modos de realización en los que se desea la minimización de volumen muerto (y la retención deseada de partículas en el mismo destinadas a pasar más allá de la etapa(s) de separación).

La "anchura" de un conducto de paso en el que se dispone el elemento 1 de separación como el descrito en este documento es la mínima distancia, en la dirección perpendicular a la dirección del flujo de todo el fluido, a través del conducto de paso (es decir, la dirección general global de dicho flujo, haciendo caso omiso de la redirección de flujo localizado inducido por las geometrías de la etapa) y perpendicular a la altura del conducto de paso, entre las caras opuestas del conducto de paso. Por ejemplo, la anchura de un conducto de paso se indica como "W" en la figura 7 para cada uno de las cuatro etapas que contienen etapas de diversas geometrías. Además a modo de ejemplo, la dimensión de anchura de los conductos de paso 55 escalonados representados en las figuras 1D y 4C se extiende perpendicularmente hacia fuera de la figura. La "anchura" de una etapa se considera en la misma dirección que la anchura de un conducto de paso en el que está dispuesto la etapa; Por lo tanto, la anchura de una etapa que se extiende completamente a través de la anchura de un conducto de paso es igual a la anchura del conducto de paso (a pesar de que la anchura del borde de ataque de la etapa puede ser significativamente mayor que la anchura de la etapa debido, por ejemplo, a la curvatura o invaginación del borde de ataque).

La "anchura" del borde 31 de ataque de una etapa 11 de separación es la longitud del borde 31 de ataque, medida siguiendo la curvatura de la etapa. Si el borde 31 de ataque se concibe como un cable inflexible, la anchura de los bordes de ataque es la longitud de la cuerda cuando se tensa. Por lo tanto, la anchura del borde de ataque de una etapa curvada o invaginada puede ser significativamente mayor que la anchura de la etapa. Esto se ilustra en las figuras 7A-7D, en las que cuatro bordes 31 de ataque que tiene una longitud 5W están configurados en una variedad de conformaciones, excediendo cada borde de ataque, de forma sustancial, la anchura (W) del conducto de paso 55 escalonado en el que está dispuesto.

La "cara ancha" de una etapa es la porción de una etapa que existe a una altitud topográficamente más alta que una superficie de referencia con respecto a la cual existe la etapa. La cara ancha de una etapa descrita en este documento será, generalmente, pero no necesita, serlo, plana.

La "cara de transición" de una etapa es la porción de la etapa que conecta su cara ancha y la superficie de referencia. La cara de transición tiene preferiblemente un contorno liso o plano, y puede ser una superficie perpendicular tanto a la superficie de referencia como a la cara 41 ancha, como se muestra para la cara 21 de transición en la figura 1. Las caras de transición también pueden ser superficies planas inclinadas (ver la cara 20 de transición en la figura 6) o curvadas (ver la cara 20 de transición en la figura 5).

El "borde 31 de ataque" de una etapa es la porción de la etapa en la que su cara 41 ancha coincide con su cara 21 de transición, por ejemplo como se muestra en la figura 1.

El "área de flujo" de un conducto de paso es una sección transversal del conducto de paso tomada en un plano perpendicular a la dirección del flujo de todo el fluido en el conducto de paso.

#### Descripción detallada

La divulgación se refiere a un aparato para la separación de partículas basándose en su habilidad de fluir a través de un conducto de paso 101 de separación que tiene una dimensión mínima (altura) definida por la separación entre etapa 11 de separación de un elemento 1 de separación y una superficie de un espacio hueco 50 en el que está dispuesto el elemento de separación. El aparato incluye un elemento 1 de separación dispuesto en un espacio hueco 50 formado por un cuerpo 2 y la cubierta 4. En el espacio hueco 50, el elemento 1 de separación separa una zona 52

5 de entrada del espacio hueco de una zona 58 de salida del espacio hueco. Las zonas de entrada y salida están en comunicación fluida por medio de un conducto de paso 55 escalonado definido por el elemento 1 de separación y uno o ambos de, el cuerpo 2 y la cubierta 4. Una o más etapas 11 de separación formadas en el elemento 1 de separación definen uno o más conductos de paso 101 de separación. El fluido que fluye entre las zonas de entrada y de salida pasa a través del conducto de paso 55 escalonado, incluso a través de al menos un primer conducto de paso 101 de separación.

10 En funcionamiento, las partículas en una zona 52 de entrada del espacio hueco 50 pasan dentro del conducto de paso 55 escalonado y, si son capaces, dentro del conducto de paso 101 de separación. Las partículas en el conducto de paso 101 de separación pueden pasar a la zona 58 de salida del espacio hueco 50. Las células que no son capaces de pasar a lo largo del conducto de paso 101 de separación no llegan a la zona 58 de salida. De este modo, las partículas capaces de llegar a la zona 58 de salida están separadas de las partículas que no son capaces de alcanzar la zona 58 de salida. Las dos poblaciones de partículas se pueden recuperar por separado del aparato. Por ejemplo, las partículas de la zona 58 de salida se pueden recuperar en una corriente de líquido retirado de la zona 58 de salida (por ejemplo, a modo de una toma de salida o por medio de un catéter insertado en la zona 58 de salida). Las partículas que no pueden pasar a través del conducto de paso 101 de separación a la zona 58 de salida se pueden recuperar lavándolas, en la dirección inversa, a través del conducto de paso 55 escalonado y en la zona 52 de entrada. Dichas partículas pueden ser retiradas de la zona 52 de entrada. Alternativamente, las partículas que no pueden pasar a través del conducto de paso 101 de separación a la zona 58 de salida se pueden dejar en el aparato o recuperar mediante el desmontaje del aparato.

20 El aparato descrito en el presente documento se puede usar en una amplia variedad de aplicaciones. Además de con partículas separadas a partir de una población mixta de partículas, el dispositivo se puede utilizar en aplicaciones en las que una o más de las poblaciones de partículas separadas se identifican o se manipulan adicionalmente, por ejemplo. La construcción y el funcionamiento del aparato resisten la obstrucción por las partículas que están siendo separadas, con respecto a los dispositivos utilizados previamente para la separación de partículas.

25 A modo de ejemplo, el aparato se puede utilizar para aislar las células tumorales de una suspensión mixta de células, tal como para aislar las células tumorales circulantes (CTCs) presentes en la sangre de un ser humano u otro sujeto vertebrado. El aparato también se puede utilizar para aislar células fetales de la sangre de una mujer portadora (o que ha portado previamente) un feto. El aparato, además, se puede utilizar para aislar, a partir de una suspensión mixta de células, sustancialmente cualquier célula(s) que pueda ser diferenciada de las otras en la suspensión basándose en su tamaño, su compresibilidad, o una combinación de éstos.

30 Partes y porciones del aparato se discuten ahora separadamente con mayor detalle.

#### El cuerpo y la cubierta

35 El aparato tiene un cuerpo 2 y una cubierta 4 que define un espacio hueco 50 entre los mismos. Una porción del espacio hueco 50, que se define en parte por el elemento 1 de separación, es un conducto de paso 55 escalonado. El conducto de paso 55 escalonado también está definido por una superficie del cuerpo 2, una superficie de la cubierta 4, o por una combinación de éstos, que se opone a una o más superficies escalonadas (por ejemplo, 31 y 32) del elemento 1 de separación. Con el fin de simplificar la construcción del aparato, la mayoría o todas las superficies que definen el conducto de paso escalonado se pueden conformar o mecanizar en un elemento 1 de separación que sea una parte integral formada en un rebaje de la cubierta 4 o del cuerpo 2, la parte rebajada está rodeada por una superficie plana, de modo que la superficie opuesta al cuerpo 2 o a la cubierta 4 solamente tiene que ser otra superficie plana con el fin de formar el espacio hueco 50 y encerrar al elemento 1 de separación en el mismo, tras el contacto entre las superficies planas del cuerpo 2 y de la cubierta 4.

40 La forma general del cuerpo 2 y de la cubierta 4 que tiene un elemento 1 de separación intercalado, se discute en general en los documentos del estado de la técnica anterior descrito previamente más arriba y, de forma sustancial cualquier disposición descrita en el mismo se puede utilizar para la aparato descrito en este documento. Descritos en este documento hay elementos del elemento 1 de separación que no se dan a conocer en los documentos.

45 El cuerpo 2, la cubierta 4, o ambos pueden definir una toma de entrada a través de la cual el fluido se puede introducir en o retirar del espacio hueco 50. Por ejemplo, el cuerpo 2 puede definir una toma de entrada que de manera fluida se comunica con la zona 52 de entrada. El fluido introducido en una toma de entrada puede fluir en la zona 52 de entrada, desplazando el fluido que ya está allí (porque el espacio hueco está sellado) dentro del conducto de paso escalonado, y de allí de forma secuencial dentro del primer conducto 51 de paso, el segundo conducto 52 de paso, y la zona 58 de salida. Las partículas suspendidas en el líquido en una de estas zonas y conductos de paso se pueden llevar a una zona o conductos de paso aguas abajo, si la partícula puede fluir a través de los conductos de paso presentes y que intervienen y de las zonas. Del mismo modo, la retirada de líquido de la zona 58 de salida a través de una toma de salida formado en el cuerpo 2 puede inducir el flujo de fluido desde los conductos de paso en comunicación fluida con la zona 58 de salida y desde los conductos de paso y zonas en comunicación fluida con el mismo.

Las tomas pueden ser simples agujeros que se extienden a través de la cubierta o del cuerpo, o pueden tener accesorios (rebabas, anillos, conectores, u otros accesorios) asociados con ellos para facilitar la conexión de un dispositivo de flujo de fluido a la toma. El cuerpo 2, la cubierta 4, o ambos pueden definir una toma de entrada en la zona 52 de entrada del espacio hueco 50, una toma de salida en la zona 58 de salida del espacio hueco 50, o tanto una toma de entrada como una toma de salida. El fluido puede ser introducido en la zona 52 de entrada a través de la toma de entrada. El fluido puede ser retirado de la zona 58 de salida a través de una toma de salida. La introducción continua de fluido en la zona 52 de entrada y la retirada simultánea o emisión de fluido desde la zona 58 de salida puede crear un flujo continuo de fluido a través del aparato. De forma similar, la retirada continua de fluido desde la zona 58 de salida y el flujo de entrada simultáneo a la introducción de fluido dentro de la zona 52 de entrada puede crear un flujo continuo.

#### El espacio hueco

El cuerpo 2 y la cubierta 4 forman un espacio hueco 50 cuando son ensamblados. El espacio hueco 50 tiene una zona 52 de entrada, una zona 58 de salida y una zona de separación intercalada entre la zona 52 de entrada y la zona 58 de salida. Se dispone un elemento 1 de separación dentro de la zona de separación y, junto con el cuerpo 2, la cubierta 4, o ambos, se define un conducto de paso 55 escalonado. El conducto de paso 55 escalonado incluye al menos un primer conducto de paso 101 de separación definido por al menos una primera etapa 11 de separación en el elemento 1 de separación. El conducto de paso 55 escalonado puede incluir cualquier número de etapas de separación adicionales, cada una de las cuales puede definir un conducto de paso de separación adicional en el espacio hueco. De forma preferente, el único camino de fluido que conecta a las zonas 52 y 58 de entrada y de salida es el conducto de paso 55 escalonado, aunque el conducto de paso escalonado puede estar dividido en múltiples conductos de paso escalonado dispuestos en serie, en paralelo, o en alguna combinación de los mismos. Asimismo, dispositivos múltiples como los descritos en este documento se pueden hacer funcionar en serie (por ejemplo, para capturar de forma selectiva partículas en el rango de tamaños seleccionados) o en paralelo (por ejemplo, para mejorar la capacidad de captura de células).

Durante el funcionamiento del dispositivo, al menos la zona 52 de entrada, la zona 58 de salida, y el conducto de paso escalonado del espacio hueco 50 se llena de un fluido. Preferiblemente, todo el espacio hueco 50 se llena de fluido durante el funcionamiento. En una realización, la única vía de fluido que conecta la zona 52 de entrada y la zona 58 de salida es la vía del conducto de paso escalonado. Las partículas presentes en la zona 52 de entrada pueden entrar en el conducto de paso 55 escalonado. El espacio hueco (es decir, tal como se define por uno o más del cuerpo, la cubierta, y el elemento de separación) se puede formar de manera que se estrechan en la dirección de (o lado) mayor flujo de fluido desde la zona de entrada hacia el conducto de paso escalonado. Tales formas huecas pueden encaminar a partículas a fluir hacia el conducto de paso escalonado, mantener la velocidad de flujo lineal de fluido a través de la zona conformada dentro de un rango deseado (por ejemplo, sustancialmente constante), facilitar la visualización de las partículas que pasan a través suyo, o tener otras consecuencias beneficiosas.

Las partículas presentes en el conducto de paso 55 escalonado pueden entrar y pasar a través del primer conducto de paso 101 de separación a menos que sean excluidas por la altura (es decir, la dimensión estrecha) del primer conducto de paso 101 de separación, o a menos que su movimiento a través del primer conducto de paso 101 de separación sea inhibido por partículas que bloquean ese paso (por ejemplo, células inmobilizadas en o aguas arriba a partir del borde 31 de ataque del primer conducto de paso 101 de separación). Las partículas que pasan a través del primer conducto de paso 101 de separación pueden entrar en la zona 58 de salida y desde allí ser recuperadas. El movimiento de las partículas dentro del aparato puede ser inducido por el flujo de fluido a través del aparato, por la motilidad intrínseca de las células, o una combinación de ambas. Con el tiempo, las partículas incapaces de entrar en el primer conducto de paso 51 se separarán en la zona 52 de entrada; las partículas capaces de atravesar el primer conducto de paso 101 de separación se separarán en o aguas arriba del conducto de paso 55 escalonado; las partículas capaces de entrar en el primer conducto de paso 101 de separación pero incapaces de moverse libremente a través de él se separarán en el primer conducto de paso 101 de separación; y las partículas capaces de moverse a través del primer conducto de paso 101 de separación se separarán en la zona 58 de salida (o en el fluido retirado o emitido desde la zona 58 de salida).

Las partículas separadas de esta manera se pueden recuperar (usando cualquier variedad de métodos conocidos, incluyendo algunos descritos en este documento) a partir de sus respectivas ubicaciones. A modo de ejemplo, un catéter se puede insertar en una zona o conducto de paso (por ejemplo, la zona 52 de entrada o el primer conducto de paso 101 de separación) del aparato, y las partículas presentes en el mismo pueden ser retiradas mediante la inducción de succión en el lumen del catéter. Además a modo de ejemplo, el lavado a contracorriente (es decir, el flujo de fluido desde la zona 58 de salida en la dirección de la zona 52 de entrada) se puede utilizar para recoger partículas presentes en una o más de, la zona 52 de entrada o el primer conducto de paso 101 de separación.

#### El elemento de separación

El elemento 1 de separación de los dispositivos reivindicados en este documento se distingue de los descritos anteriormente en la patente US número 7,993,908, en la publicación PCT WO 2011/066497, o en otro lugar. El elemento 1 de separación de la dispositivos de la invención incluye al menos una etapa 11 de separación que tiene

un borde 31 de ataque ondulado con una anchura significativamente mayor que (al menos 20 veces mayor que) la anchura total de un conducto de paso dentro del cual ocurre la etapa de separación. Dicho de otra manera, la forma del borde de ataque de al menos una etapa del elemento 1 de separación es tal que la anchura de borde de ataque es sustancialmente mayor que la anchura total de la etapa. Puesto de otra manera distinta, la anchura del borde de ataque de la etapa, evaluada a lo largo de su contorno, es mayor que la distancia lineal más corta entre los dos puntos finales del borde de la etapa (es decir, independientemente de si el borde de la etapa sigue la línea más corta). A modo de ejemplo, el borde de ataque puede ser invaginado (véase por ejemplo la figura 6), por ejemplo, de forma serpenteante (ver figura 8). El límite superior de la relación de la anchura de etapa con respecto a la anchura de paso está limitado sustancialmente sólo por la tolerancia de los métodos de fabricación utilizados para formar la etapa y por el tamaño de las partículas que pasan la etapa.

El conducto de paso 55 escalonado es el orificio a través del cual se mueven las partículas, los flujos de fluidos, o ambos, desde la zona 52 de entrada a la zona 58 de salida, durante el funcionamiento del aparato. El elemento 1 de separación tiene una estructura escalonada, que define la forma escalonada de al menos un lado del conducto de paso 55 escalonado. El elemento 1 de separación tiene por lo menos una etapa 11 de separación, y puede tener múltiples etapas de separación (por ejemplo, 11-13 en las figuras 6-8). El fluido debe fluir a través conducto de paso 101 de separación definido en parte la etapa 11 de separación correspondiente, con el fin de atravesar el conducto de paso 55 escalonado desde la zona 52 de entrada a la zona 58 de salida cuando se ensambla el aparato.

Durante el funcionamiento del aparato descrito en el presente documento, una mezcla de partículas que tienen diferentes tamaños se puede hacer fluir a través del conducto de paso 55 escalonado, que incluye al menos un conducto de paso 101 de separación. El paso de las partículas que tienen un tamaño característico en exceso respecto a la dimensión estrecha (es decir, la altura) del conducto de paso 101 de separación es impedido en o cerca del borde de 31 ataque de la etapa 11 de separación que limita el conducto de paso de separación, y tales partículas tenderán a acumularse en o cerca del borde 31 de ataque en lugar de pasar a través del conducto de paso de separación. En tanto que el conducto de paso 101 de separación no está completamente ocluido por las partículas impedidas más allá de la anchura total de la etapa 11 de separación, el flujo del fluido y las partículas de alrededor o el paso de las células impedidas pueden continuar. El desarrollo de la materia objeto descrita en este documento surgió, al menos en parte, como resultado de los intentos por diseñar un aparato menos susceptible a las incrustaciones y obstrucciones por las partículas impedidas que los aparatos del estado de la técnica anterior. Preferiblemente, la anchura de los bordes 31 de ataque de la etapa 11 de separación se selecciona de manera que, para una mezcla prevista de las partículas, la parte(s) del conducto de paso 101 de separación, en el que se impide el paso de partículas, tenga un área de flujo suficiente para que el flujo de fluido a través de dicha parte(s) no sea impedido significativamente (es decir, no más de 50%, 20%, 10%, 5%, 1%, 0,33%, o 0,1% o menos) cuando un número previsible deseable de partículas está albergado en la parte(s).

El elemento 1 de separación puede incluir una etapa 10 de enfoque (como se ilustra en las figuras 1-6), que sirve para desviar el flujo de fluido dentro del conducto de paso 55 escalonado hacia el primer conducto de paso 101 de separación, para llenar "espacios muertos" aguas arriba de la primera etapa 11 de separación, para proporcionar una base estructuralmente sólida para llevar a las etapas de separación en el elemento de separación, o alguna combinación de éstos. La separación no necesita incluir una etapa de enfoque.

Las etapas del elemento 1 de separación pueden tener cualquiera variedad de formas. En un modo de realización (por ejemplo, en el aparato representado en la figura 1), tanto la etapa 10 de enfoque como la primera etapa 11 de separación tienen una estructura escalonada similar a una escalera común, es decir, dos superficies planas que se cruzan en un ángulo recto. Es decir, la cara 20 de transición de la etapa 10 de enfoque y la cara 40 ancha de la etapa de enfoque 10 se cortan en ángulo recto, al igual que la cara 21 de transición de la primera etapa 11 de separación y cara 41 ancha de la misma. Alternativamente, las caras de transición y ancha de las etapas pueden cortarse en un ángulo de entre 90 y 180 grados, por ejemplo. Las caras de transición y ancha de las etapas también pueden cortarse en un ángulo entre 0 y 90 grados, formando un voladizo. Para un dispositivo de la invención, sin embargo, al menos una etapa 11 de separación tiene un borde de ataque ondulado coherente con una longitud de al menos 20 x mayor que la anchura total del canal en la zona de separación, por ejemplo, un borde 31 de ataque invaginado y la cara 21 de transición, de manera que la anchura de la etapa es significativamente mayor que la anchura de la etapa.

Las etapas que tienen caras de transición y anchas que se cortan en un ángulo de entre 90 y 180 grados pueden ocluir el paso de partículas que tienen una variedad de tamaños (es decir, los que tienen tamaños intermedios entre la dimensión estrecha del conducto de paso definido por la cara ancha de la etapa y la dimensión estrecha del espacio aguas arriba de la etapa). Al detener el paso de partículas que tienen tamaños ligeramente diferentes en diferentes posiciones de la cara de transición de la etapa, una etapa que tiene las caras de transición y ancha que se cortan en un ángulo entre 90 y 180 grados puede prevenir la obstrucción en el conducto de paso definido por la cara ancha de la etapa en un mayor grado que una etapa que tiene las caras de transición y ancha que se cortan en un ángulo de 90 grados o menos.

La obstrucción del flujo de fluido más allá de una etapa por partículas que ocluyen el conducto de paso definido por la cara ancha de la etapa, también puede reducirse o evitarse aumentando la anchura de la etapa, como se reconoce en e estado de la técnica. Debido a que cada partícula ocluye el flujo de fluido sólo para el área de flujo oculta por la

partícula, una etapa más ancha será ocluida necesariamente por un mayor número de partículas de oclusión. Sin embargo, el aumento de la anchura de una etapa no siempre es práctico, especialmente cuando se requiere un ensanchamiento significativo para colocar numerosas partículas o cuando se desea la miniaturización.

5 Un aspecto importante de la materia objeto divulgada en este documento es el reconocimiento por los presentes inventores de que la capacidad de una etapa 11 de separación para colocar partículas impedidas se puede aumentar significativamente sin aumentar la anchura de la etapa. En lugar de (o además de) aumentar la anchura de una etapa 11 de separación, se puede aumentar la capacidad de retención de partículas mediante el aumento de la anchura del borde 31 de ataque de la etapa (es decir, donde se produce el impedimento de las partículas), por ejemplo por la disminución de la rectitud de la etapa.

10 A modo de ejemplo, en un canal de fluido que tiene una sección transversal rectangular, una etapa que se extiende directamente a través (es decir, en ángulo recto con los lados) del canal tiene un borde de ataque con una anchura directamente igual a la anchura del canal (véase, por ejemplo, la figura 1). Si la forma de la etapa es en forma de hemiciclo, con el arco del hemiciclo extendiéndose de tal manera que el centro del hemiciclo se encuentra aguas abajo a partir del borde que está más aguas arriba del hemiciclo, entonces, la anchura del borde de ataque de la cubierta es  
15 igual al perímetro del hemiciclo, que es el número pi multiplicado por la anchura del canal y dividido por dos (es decir, aproximadamente 1,57 x la anchura del canal). Del mismo modo, los pasos que tienen bordes de ataque con una forma similar a un arco de un círculo o elipse, como chebrones (es decir, como la letra V), como zig-zags, como líneas serpenteantes, o como líneas irregulares (ver las figuras 2-6) tendrán todos valores de la anchura superiores a la anchura de una etapa que simplemente se extiende de forma perpendicular a través del canal de fluido que tiene una  
20 sección transversal rectangular

Como se indicó anteriormente, una característica esencial de un dispositivo de la invención es la provisión de un borde 31 de ataque de la etapa 11 de separación conformada de tal modo que la anchura del borde 31 de ataque es sustancialmente mayor (al menos 20 veces mayor) que la anchura total del conducto de paso 101 de separación definido por la etapa. Esto se puede lograr, por ejemplo, mediante la formación de la etapa de tal manera que su borde  
25 de ataque tiene una forma de borde ondulado o muy irregular, como se ilustra en las figuras 2 y 3, que son representaciones de las etapas que tienen bordes ondulantes e irregulares, respectivamente. En la figura 2, la etapa 11 de separación es una losa plana que tiene proyecciones en forma de dedos en su cara 21 de transición. La anchura del borde 31 de ataque de la etapa formada por el perímetro de las proyecciones en forma de dedo es sustancialmente mayor que la anchura de la etapa, como se puede ver claramente en la figura 2A. Del mismo modo, las ondulaciones e irregularidades en el borde de ataque de la etapa 11 de separación ilustrada en la figura 3 provoca que la anchura del borde de ataque sea sustancialmente mayor que la anchura total de la etapa, como puede verse claramente en la  
30 figura 3A.

Varias etapas pueden tener similar o diferente forma de los bordes de ataque. Las figuras 4-6, por ejemplo, ilustran elementos 1 de separación en los que la etapa 10 de enfoque (que no necesariamente impide el paso de las partículas) es de forma diferente para cada una de las etapas 11-13 de separación. En estas ilustraciones las etapas 11-13 de  
35 separación tienen la misma o similares formas, pero no es necesario. Independientemente de la forma del borde 31 de ataque de una etapa 11 de separación, lo que es importante, para el paso de las células u otras partículas a través del conducto de paso 101 de separación delimitado por las etapas, es la dimensión estrecha (altura; por ejemplo,  $h_1$  en la figura 1D) definida por cada etapa 11 de separación. Las partículas incapaces de pasar a través de la dimensión estrecha definida por una etapa 11 de separación no atravesarán la etapa (a menos que sea capaz de deformarse y la caída de presión a través del paso sea suficiente para inducir dicha deformación).  
40

Una serie etapas de separación que tienen conductos de paso que se estrechan progresivamente definidos de esta manera, una etapa de separación que tiene una cara ancha inclinada (es decir, de modo que el conducto de paso estrecho definido por las mismas se estrecha en la dirección de todo el flujo de fluido a través del mismo), o una  
45 combinación de éstos se pueden utilizar para capturar células deformables (es decir, células que se pueden deformar para ajustarse dentro de, pero no pasar a través de, el conducto de paso definido por una etapa de separación) y para separarlos a partir de células que o son lo suficientemente pequeñas o lo suficientemente deformables para pasar la etapa(s) de separación.

La anchura de cada etapa 11 de separación se puede seleccionar basándose en la acumulación prevista de partículas en la etapa, teniendo en cuenta la composición de partículas de la muestra prevista que va a ser procesada, utilizando el aparato y la dimensión estrecha de cada conducto de paso 101 de separación correspondiente. La anchura de una  
50 etapa 11 de separación se puede seleccionar para ser significativamente (por ejemplo, 10, 1.000, o 100.000 veces) mayor que la dimensión estrecha del correspondiente conducto de paso 101 de separación. A modo de ejemplo, para la separación de células como las fetales de la sangre materna, una anchura de aproximadamente al menos 1000 (mil), y preferiblemente 10.000 (diez mil), veces la dimensión estrecha del correspondiente conducto de paso, se considera deseable. Las etapas 11 de separación que tienen una anchura relativamente grande permiten la  
55 acumulación de partículas dentro de un conducto de paso 101 de separación al tiempo que limita la obstrucción del conducto de paso 101 de separación.

Aunque el aparato ha sido descrito en este documento con referencia a una sola etapa 11 de separación (figuras 1-3 y 7) y con referencia a tres etapas 11 de separación (figuras 4-6), sustancialmente cualquier número de etapas 11 de separación (por ejemplo, dos, cuatro, diez, o cien pasos) se puede incluir en el aparato, definiendo cada etapa 11 de separación un correspondiente conducto de paso 101 de separación dentro del conducto de paso 55 escalonado y teniendo una dimensión estrecha característica.

#### 5 Materiales y métodos de construcción

Los materiales y métodos utilizados para hacer que los dispositivos descritos en este documento pueden ser sustancialmente los mismos que los descritos previamente en la patente US número 7,993,908 y en la publicación PCT WO 2011/066497, o en otro lugar, siempre que el borde 31 de ataque de al menos una etapa 11 de separación del aparato puede estar constituido como se describe aquí - por ejemplo, teniendo una anchura significativamente mayor que su anchura, tal como un borde 31 de ataque que tenga una forma ondulada). Es decir, los métodos deben ser capaces de fabricar un dispositivo que tenga por lo menos una etapa 11 de separación que tenga una anchura de borde 31 de ataque mayor que la anchura total de la etapa (por ejemplo, mayor que la anchura de un conducto de paso dentro del dispositivo en el que ocurre la etapa).

#### 15 Las partículas separables

Los dispositivos descritos en el presente documento se pueden utilizar para separar sustancialmente los mismos tipos de partículas que las descritas previamente la patente US número 7,993,908 y en la publicación PCT WO 2011/066497. Los atributos de las partículas que afectan a su capacidad para atravesar el conducto(s) de paso 101 de separación del aparato descrito en este documento incluyen el tamaño, la forma, las propiedades de superficie, y la deformabilidad de las partículas.

En un modo de realización importante, el aparato se utiliza para separar las células tumorales (que tienden a ser significativamente mayores que las correspondientes células no tumorales del mismo tipo de células) de las células no tumorales. Se sabe que las células tumorales circulan en el torrente sanguíneo de muchos seres humanos individuales (así como de otros animales vertebrados), incluso para los tumores que se consideran tumores unitarios sólidos, tales como los de ovario, de próstata, y cánceres de mama. La detección y/o la enumeración de las células tumorales circulantes (CTCs) puede ser un indicador importante de la presencia, de la naturaleza (por ejemplo, etapa o grado), de la malignidad, y de la respuesta al tratamiento de un tumor. Además, el aislamiento de las CTC permite la identificación del tipo de tumor que está presente. Estas características pueden ser significativamente importantes para el diagnóstico, el tratamiento y la prevención de la metástasis de tumores.

En un modo de realización, la sangre obtenida de un sujeto individual (por ejemplo, humano), se procesa utilizando un aparato descrito en este documento para separar CTCs de la sangre. Los CTCs separados pueden ser recuperados y analizados por cualquier método conocido para obtener información de diagnóstico importante, terapéutica y preventiva específica del sujeto individual. Debido a que se cree que los CTCs están presentes en las primeras etapas de la formación de tumores, la detección y la caracterización de los CTC puede permitir de forma temprana, una intervención eficaz para prevenir el desarrollo y la propagación del tumor.

Sustancialmente cualquier procedimiento de diagnóstico susceptible de utilizar células aisladas se puede realizar empleando células que son obtenidas a partir del dispositivo descrito en el presente documento. Ejemplos de tales métodos incluyen la evaluación de la afinidad de la preparación de un anticuerpo con dichas células o un extracto preparado a partir de ellas, la evaluación de los ácidos nucleicos contenidos dentro de tales células, o la evaluación de la capacidad de las células para crecer en presencia de un medio seleccionado o para interactuar con otras células. Las células obtenidas utilizando los dispositivos descritos en este documento por lo tanto se pueden emplear para evaluar la expresión génica, los cambios genéticos, la monitorización de un biomarcador, u otras características morfológicas o bioquímicas de las células (o cambios de dichas características).

En otro modo de realización, el aparato descrito en el presente documento se utiliza para separar las células endoteliales circulantes (CEC) a partir de una muestra que incluye dichas células, tal como una muestra sanguínea tomada de un paciente. Los CECs que tienen un tamaño agrandado (con respecto a los CECs normales) también pueden ser separados mediante la selección de las dimensiones estrechas apropiadas del conducto de paso en el aparato. A modo de ejemplo, se puede utilizar un aparato que tenga dimensiones estrechas seleccionadas del conducto de paso para separar CECs agrandados de los CECs normales. Además a modo de ejemplo, se puede utilizar un aparato que tenga dimensiones estrechas seleccionadas del conducto de paso para separar todos los CECs (o sólo CECs agrandados) de las células normalmente presentes en la sangre. Los CECs son conocidos por ser indicativos de la presencia o aparición de trauma en un individuo, y la presencia de CECs agrandados puede ser particularmente indicativa de ciertas condiciones, tales como el infarto de miocardio agudo o inminente (véase, por ejemplo, Damani y otros, 2012, Sci. Trad. Med. 4: 126ra33). Los CECs aislados utilizando el aparato descrito en el presente documento también se pueden recuperar como se ha descrito en este documento y/o ser analizados por métodos convencionales (por ejemplo, mediante la detección de marcadores de la superficie celular inmunológicos) para identificar su tejido de origen y por lo tanto indicando además el tipo y/o la ubicación en el cuerpo del trauma que indujo su circulación. A modo de ejemplo, el aislamiento de CECs agrandados de origen cardíaco es indicativo de que

el paciente ha sufrido recientemente, está sufriendo actualmente, o está en riesgo inminente de aparición de un infarto de miocardio.

Dispositivos de desplazamiento de fluido

5 El aparato descrito en el presente documento puede ser empleado utilizando sustancialmente los mismos tipos de dispositivos de desplazamiento de fluido a los descritos anteriormente en la patente US número 7,993,908 y en la publicación PCT WO 2011/066497, o en la literatura relativa a otros dispositivos de microfluidos.

Utilizando el aparato

10 El uso y el funcionamiento del aparato descrito en el presente documento son sustancialmente los mismos que los descritos anteriormente en los documentos mencionados en el presente documento. El aparato descrito en el presente documento tiene la importante ventaja de exhibir una menor susceptibilidad a la obstrucción, el deterioro del flujo/caudal y a otros fenómenos indeseables atribuibles a la captura de células en una etapa 11 de separación de las mismas.

Ejemplos

La materia objeto de esta divulgación se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

15 Un dispositivo como el anterior se construye con un conducto de paso escalonado que tiene una anchura total de 2,5 centímetros y que incluye una segunda etapa 62 que tiene un borde de ataque ondulado que tiene una anchura de 8,0 centímetros. La dimensión estrecha del segundo conducto de paso entre la segunda etapa 62 y la cubierta 4 opuesta es de 10 micrómetros.

20 Cuando una suspensión de células (por ejemplo, 10 mililitros de sangre humana que tienen un número seleccionado de células tumorales incluido en la misma) se hace pasar a través del conducto de paso escalonado, seguido de una solución de lavado que no lise las células tumorales, sustancialmente todas las células sanguíneas pasan a través del aparato y la mayoría o la totalidad de las células tumorales son retenidas dentro de él.

Tabla 1. Lista de partes

25	1	Elemento de separación
	2	Cuerpo
	4	Cubierta
	10	Etapas de enfoque
	11	(Primera) etapa de separación
	12	Segunda etapa de separación
30	32	Borde de ataque de la segunda etapa de separación
	13	Tercera etapa de separación
	20	Cara de transición de la etapa de enfoque
	21	Cara de transición de la (primera) etapa de separación
	22	Cara de transición de la segunda etapa de separación
35	23	Cara de transición de la tercera etapa de separación
	30	Borde de ataque de la etapa de enfoque
	31	Borde de ataque de la (primer) etapa de separación
	32	Borde de ataque de la segunda etapa de separación
	33	Borde de ataque de la tercera etapa de separación
40	40	Cara ancha de la etapa de enfoque
	41	Cara ancha de la (primera) etapa de separación
	42	Cara ancha de la segunda etapa de separación
	43	Cara de la tercera etapa de separación
	50	Espacio hueco definido por el cuerpo y la cubierta
45	52	Zona de entrada del espacio hueco
	53	Porción aguas arriba del canal
	54	Canal de conexión de las zonas de entrada y de salida del espacio hueco
	55	Porción de separación del canal
	56	Porción aguas abajo del canal
50	58	Zona de salida del espacio hueco
	60	Parte de la porción de separación limitada por la etapa de enfoque
	61	Parte de la porción de separación limitada por la (Primera) etapa de separación
	62	Parte de la porción de separación limitada por la segunda etapa de separación
	63	Parte de la porción de separación limitada por la tercera etapa de separación
55	101	(Primer) conducto de paso de separación
	102	Segundo conducto de paso de separación

103 Tercer conducto de paso de separación

Tabla 2. Lista de abreviaturas

	BFF	Flujo de todo el fluido
	hc	Altura del Canal
5	h0	Altura del canal en la porción limitada por la etapa de enfoque
	h1	Altura del canal en la porción limitada por la (primera) etapa de separación
	h2	Altura del canal en la porción limitada por la segunda etapa de separación
	h3	Altura del canal en la porción limitada por la tercera etapa de separación
	W	Ancho total del canal en la etapa de separación
10	L	Longitud de la porción de separación
	B	Anchura del borde de ataque de una etapa de separación
	D	relación B/L
	W	Ancho de una etapa de separación

15 La figura 8 ilustra un dispositivo de acuerdo con las reivindicaciones en donde el borde de ataque de la etapa de separación tiene una forma serpenteante y como se indica más arriba tiene un tamaño aproximadamente igual que el de un portaobjetos de microscopio común.

Reivindicaciones

1. Un dispositivo de separación de partículas más pequeñas y más grandes, el dispositivo comprendiendo:
- un cuerpo (2) y
- 5 una cubierta (4) que definen un espacio hueco (50) entre ellos, el espacio hueco (50) que contiene un elemento (1) de separación que separa una zona (52) de entrada y una zona (58) de salida del espacio hueco (50), el elemento (1) de separación que define, junto con una superficie del espacio hueco (50),
- 10 un canal que conecta de forma fluida las zonas de entrada y de salida por medio de una porción de separación, teniendo el canal una anchura total en la porción de separación y una altura definida por la distancia entre el elemento (1) de separación y la superficie del espacio hueco (50),
- 15 al menos uno de, el cuerpo (2), la cubierta (4), y el elemento (1) de separación portando un etapa de separación dispuesta dentro y que tiene un borde de ataque que se extiende completamente a través de la porción de separación del canal, por lo que el canal está dividido en una porción aguas arriba, en el lado de entrada del borde de ataque y una porción aguas abajo laminar, en el lado de salida del borde de ataque,
- 20 la altura de la porción aguas arriba siendo suficiente para facilitar el paso a través suyo tanto de las particulares más grandes como de las más pequeñas,
- la altura de la porción aguas abajo siendo suficientemente grande como para facilitar el paso a través suyo de las partículas más pequeñas y suficientemente pequeña para inhibir el paso a través suyo de las partículas más grandes, y
- 25 la longitud del borde de ataque siendo al menos 20 veces mayor que la anchura total del canal en el zona de separación,
- 30 en el que la porción aguas arriba del canal es laminar en una zona entre la zona (52) de entrada y el elemento (1) de separación y en el que el borde de ataque tiene una forma ondulada,
- por lo que las partículas pueden ser separadas haciéndolas pasar a través del canal y recuperando las partículas basándose en su capacidad para atravesar la etapa de separación.
- 35 2. El dispositivo de la reivindicación 1, en el que la altura de la porción aguas abajo inhibe el paso a través suyo de células tumorales circulantes y facilita el paso a través suyo de glóbulos rojos humanos.
3. El dispositivo de la reivindicación 2, en el que las células tumorales circulantes se derivan de un tumor sólido tal como un tumor de ovarios, de próstata o de cáncer de mama.
- 40 4. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el altura de la porción aguas abajo inhibe el paso a través suyo de al menos una de: células de feto humano; células similares a células madre de feto humano; células endoteliales circulantes; y células endoteliales circulantes agrandadas de origen cardiaco, y facilita el paso a través suyo de glóbulos rojos.
5. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que al menos uno de, el cuerpo (2), la cubierta (4), y el elemento (1) de separación porta una etapa de enfoque dispuesta en y que se extiende completamente a través del canal, en el lado de entrada de la etapa de separación, teniendo el canal una altura mayor en el lado de entrada de la etapa de enfoque que en su lado de salida; opcionalmente, en donde la etapa de enfoque se extiende perpendicularmente a través del canal.
- 45 6. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos uno de, el cuerpo (2), la cubierta (4), y el elemento (1) de separación porta una pluralidad de etapas de separación dispuestas en serie dentro de la porción de separación, cada etapa de separación:
- 50 a) teniendo un borde de ataque que se extiende a través de la porción de separación y que tiene una longitud mayor que la anchura total del canal en la pared de separación; y

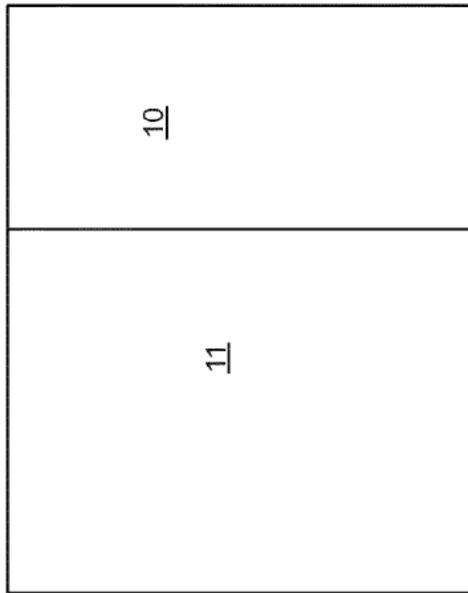
b) dividiendo el canal en una porción aguas arriba y una porción aguas abajo laminar con respecto al borde de ataque de la etapa de separación, la altura del canal en la porción aguas abajo que sigue inmediatamente a la etapa de separación siendo menor que la altura del canal en la porción aguas arriba que precede inmediatamente a la etapa de separación.

- 5 7. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el borde de ataque tiene una forma serpenteante.
8. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa de separación tiene una cara aguas arriba en su lado de entrada que es perpendicular a la porción de la etapa que define la porción aguas abajo.
9. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el elemento (1) de separación es integral con al menos uno de, el cuerpo y la cubierta.
- 10 10. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que además comprende un soporte para mantener la altura del canal, estando dispuesto el soporte dentro del canal y extendiéndose entre el elemento de separación y la superficie del espacio hueco.
11. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el dispositivo tiene un tamaño aproximadamente igual a un portaobjetos de microscopio común.
- 15 12. Un método de separación de partículas más grandes y más pequeñas, comprendiendo el método proporcionar una suspensión de fluido de partículas más grandes o más pequeñas en la entrada del dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, haciendo pasar el fluido a través del canal y separando las partículas basándose en su habilidad para atravesar la etapa de separación, y opcionalmente recuperando las partículas más grandes por tanto separadas que son incapaces de pasar a la zona (58) de salida.
- 20 13. El método de la reivindicación 12, en el que el método además comprende un fluido de lavado a contracorriente desde la zona de salida en la dirección de la entrada del dispositivo para recuperar las partículas más grandes.
14. El método de la reivindicación 12 o de la reivindicación 13, en el que el fluido es una muestra sanguínea.
15. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que las partículas más grandes son células tumorales circulantes (CTCs) y las partículas más pequeñas son células sanguíneas.
- 25 16. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que las partículas más grandes y las partículas más pequeñas son células sanguíneas.
17. El método de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en el que las partículas más grandes son células endoteliales circulantes y las partículas más pequeñas son células sanguíneas.
- 30 18. El método de la reivindicación 17, en el que las células endoteliales circulantes son células endoteliales circulantes agrandadas de origen cardíaco.
19. El método de cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en el que las células sanguíneas son glóbulos rojos.
20. Un método para evaluar la eficiencia de un tratamiento de tumor para un sujeto afectado con un tumor, el método comprendiendo aislar CTCs de muestras de sangre obtenidas del sujeto antes y después del tratamiento utilizando el método de las reivindicación 15 o de la reivindicación 19 cuando depende de la reivindicación 15 y comparando al menos una característica de los CTCs aislados de las muestras, por lo que una diferencia en las características de los CTCs aislados de las muestras de sangre es una indicación de la eficacia del tratamiento; opcionalmente, en el que la característica es la concentración de CTC en la muestra.
- 35 21. Un método para diagnosticar la aparición de un tumor en un sujeto vertebrado, el método comprendiendo la separación de células tumorales circulantes (CTCs) de una muestra de sangre obtenida del sujeto utilizando el método de la reivindicación 15 o de la reivindicación 19 cuando depende de la reivindicación 15, en el que la altura de la porción aguas abajo inhibe el paso a través suyo de un CTC,
- 40 por lo que la presencia de al menos una célula tumoral circulante separada es una indicación de que un tumor ocurre en el sujeto.
- 45 22. El método como se reivindica en la reivindicación 21, que además comprende examinar la porción aguas arriba del aparato del borde de ataque de la etapa de separación para la presencia de al menos un CTC segregado.
23. El método de la reivindicación 21 o de la reivindicación 22, que además comprende, a continuación, realizar una prueba de diagnóstico que evalúe una característica de una célula tumoral en al menos una célula tumoral circulante separada que estaba presente.

24. El método como el reivindicado en la reivindicación 23, en el que la prueba de diagnóstico está unida a un anticuerpo específico de tejido; Y/O, en el que la prueba de diagnóstico está unida con un anticuerpo específico de tumor; Y/O
- 5 en el que la prueba de diagnóstico comprende analizar ácidos nucleicos obtenidos de al menos una célula tumoral circulante separada que estaba presente; Y/O
- en el que la prueba de diagnóstico está evaluando la capacidad proliferativa de una célula tumoral circulante separada; Y/O
- en el que la prueba de diagnóstico es una observación microscópica de la morfología de una célula tumoral circulante segregada.
- 10 25. El método como el reivindicado en cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que al menos una célula tumoral circulante se deriva de un tumor sólido tal como un tumor de ovario, de próstata, o de cáncer de mama.
- 15 26. Un método para determinar una indicación de la presencia o la aparición de un trauma en un individuo basado en la presencia de células endoteliales circulantes en una muestra de sangre, el método comprendiendo separar células endoteliales circulantes de la muestra de sangre obtenida del individuo utilizando el método de la reivindicación 17 o de la reivindicación 19 cuando depende de la reivindicación 17.
- 20 27. Un método para determinar una indicación de que un paciente ha sufrido recientemente, está sufriendo actualmente, o está en riesgo inminente de aparición de un infarto de miocardio basándose en la presencia de células endoteliales circulantes agrandadas de origen cardíaco en una muestra de sangre, el método comprendiendo separar las células endoteliales circulantes agrandadas de la muestra de sangre obtenida del paciente utilizando el método de la reivindicación 18.

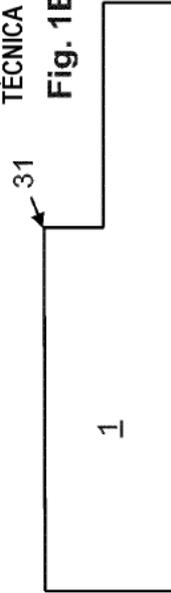
TÉCNICA ANTERIOR

Fig. 1A



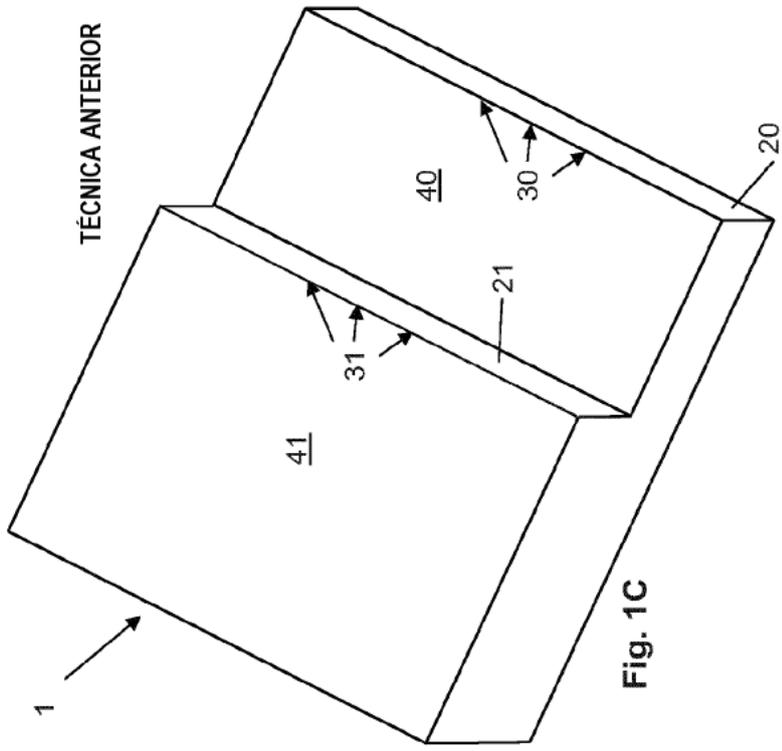
TÉCNICA ANTERIOR

Fig. 1B



TÉCNICA ANTERIOR

Fig. 1C



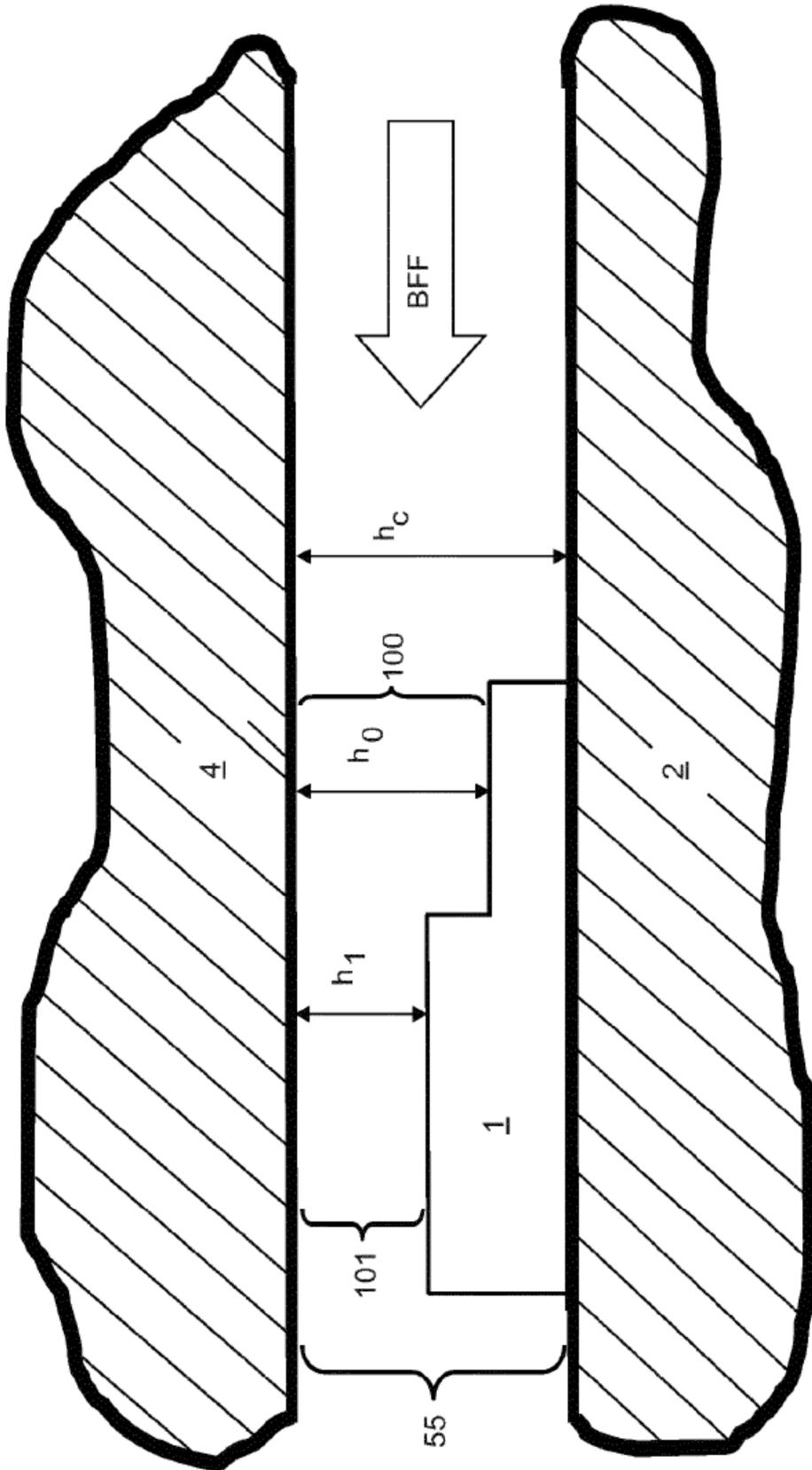


Fig. 1D

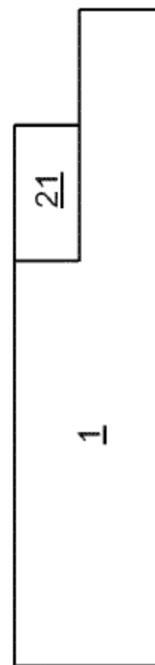
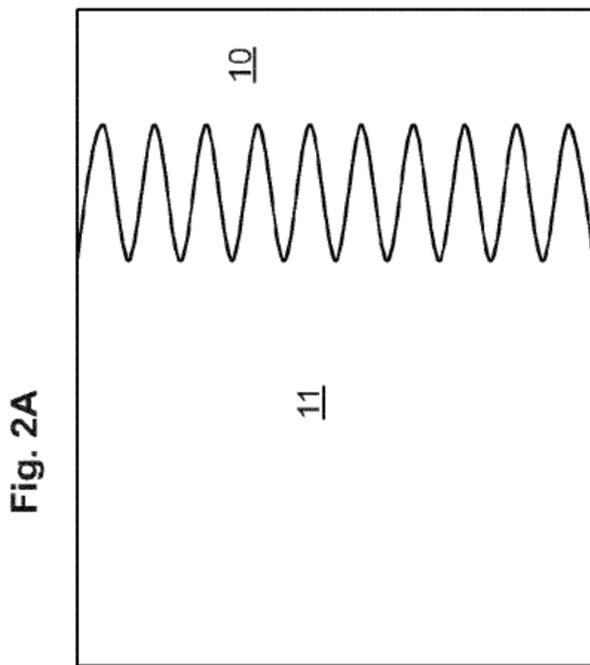


Fig. 2B

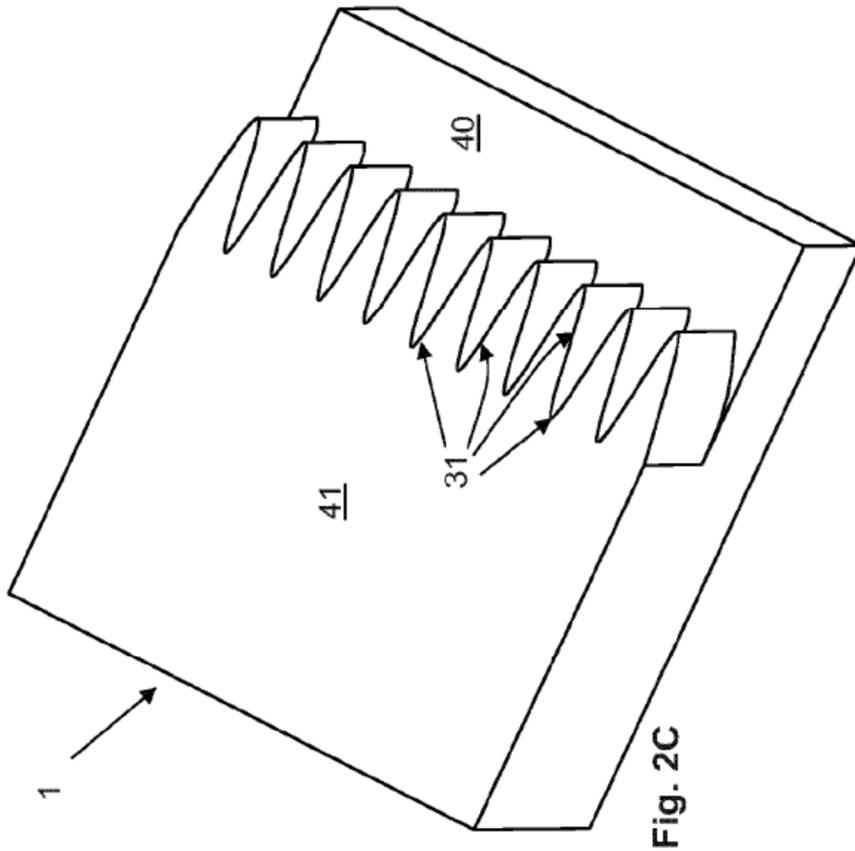


Fig. 2C

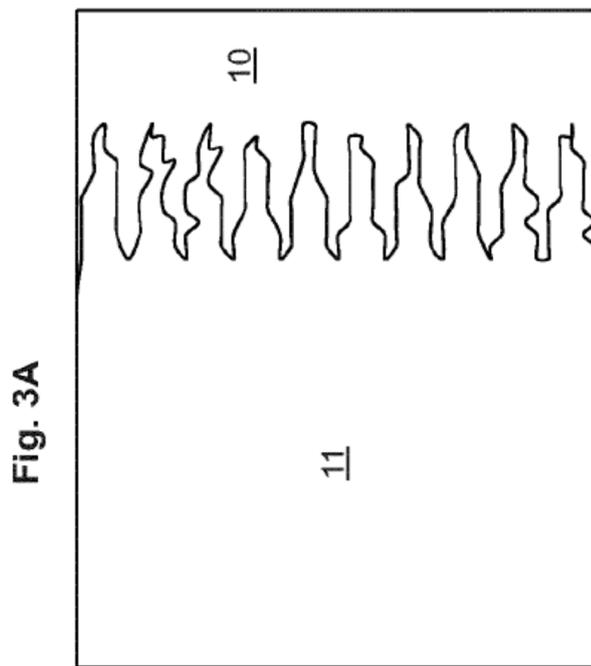


Fig. 3A

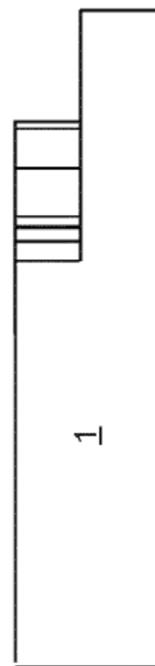


Fig. 3B

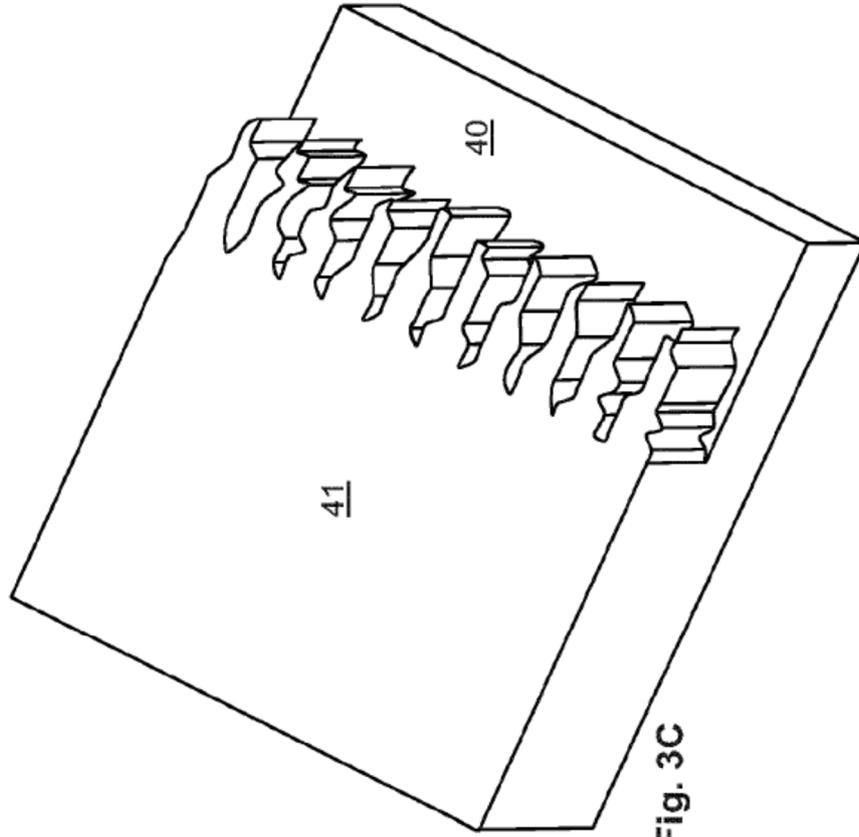
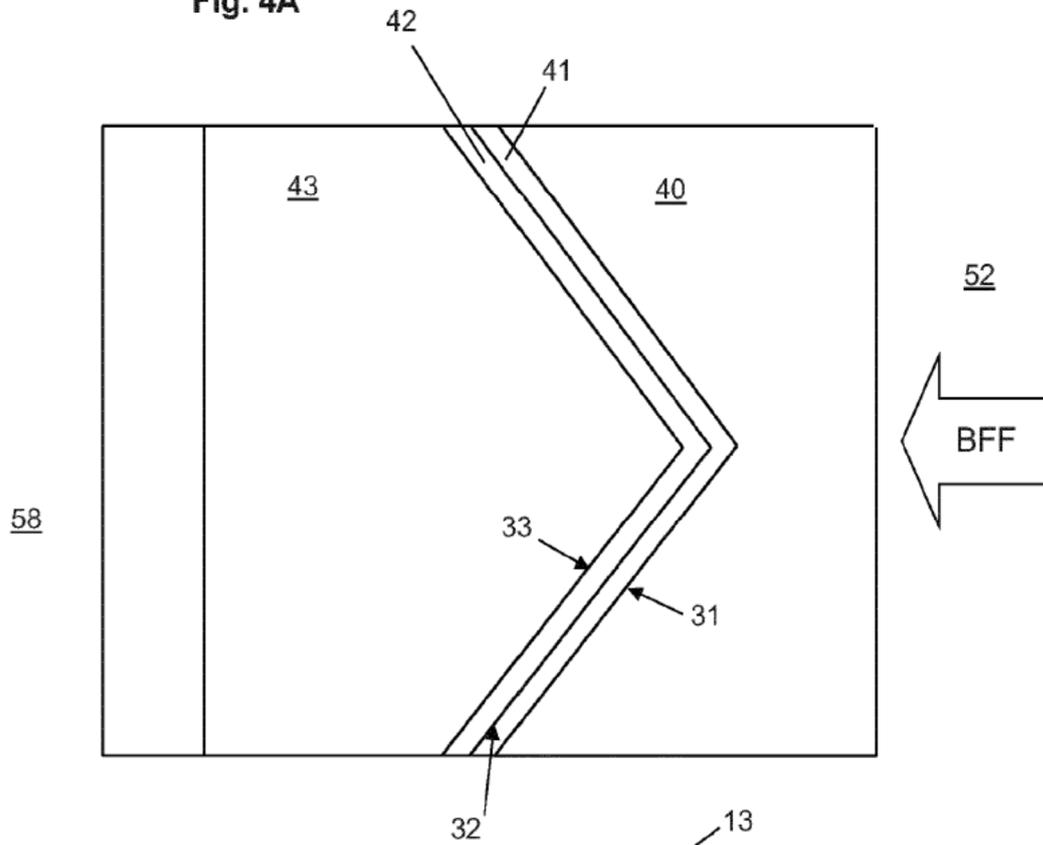


Fig. 3C

**Fig. 4A**



**Fig. 4B**

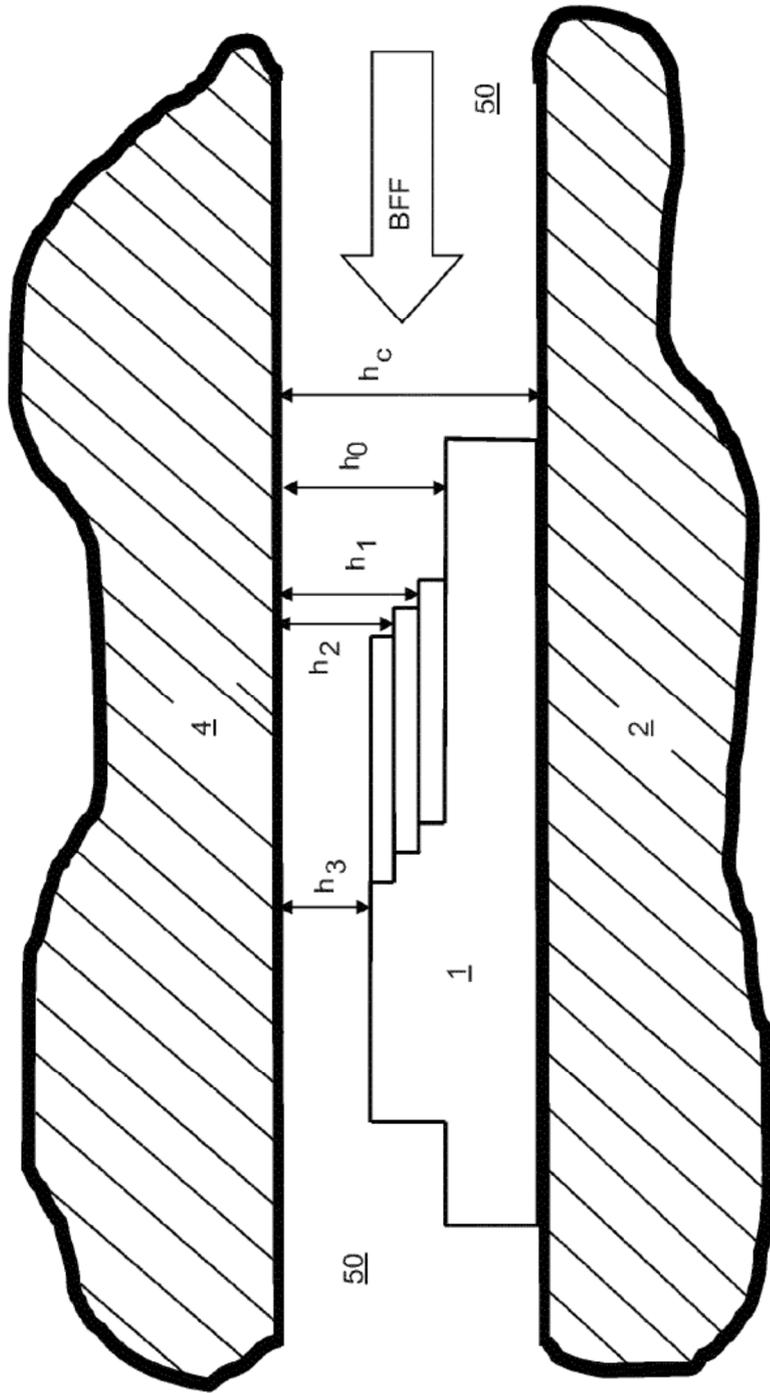


Fig. 4C

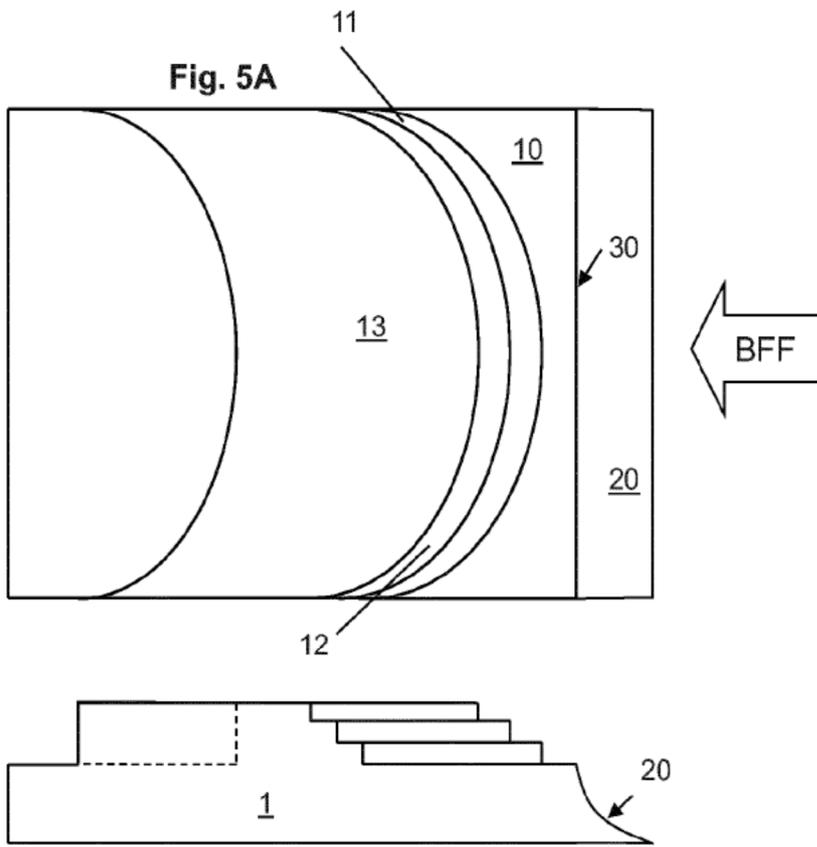


Fig. 5B

Fig. 6A

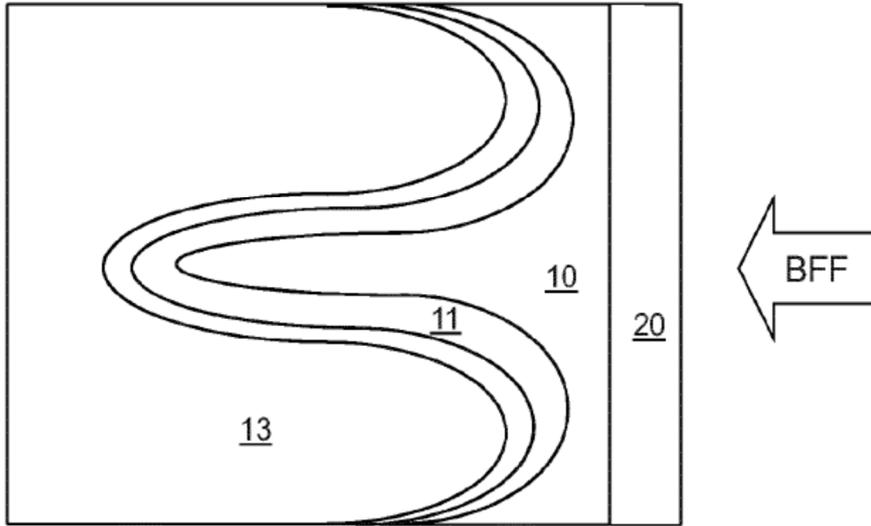
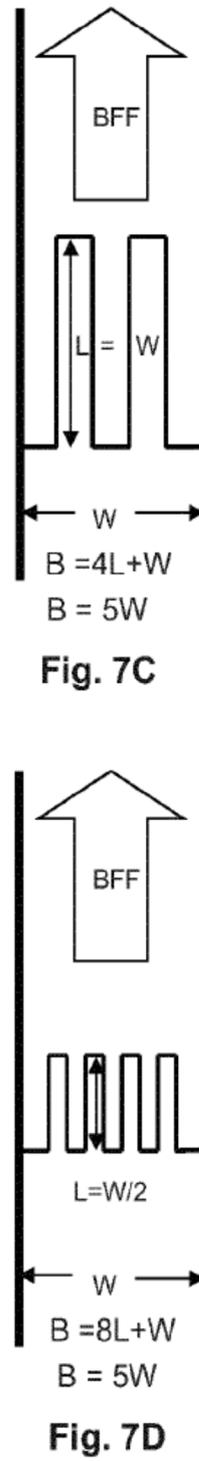
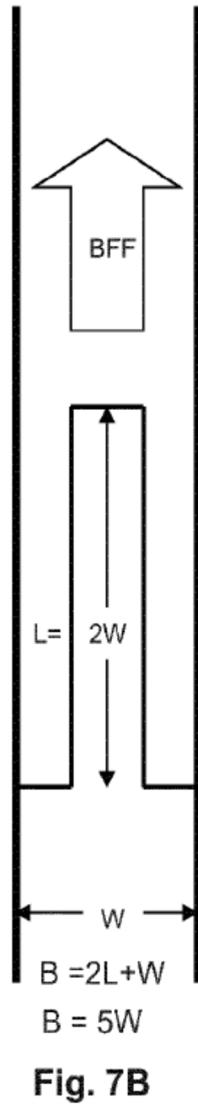
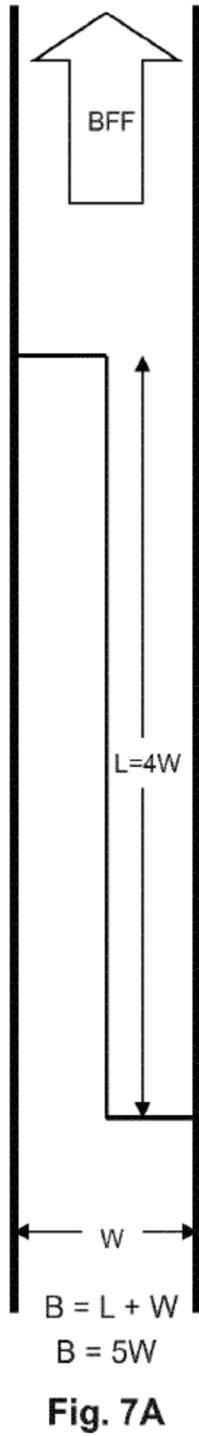


Fig. 6B



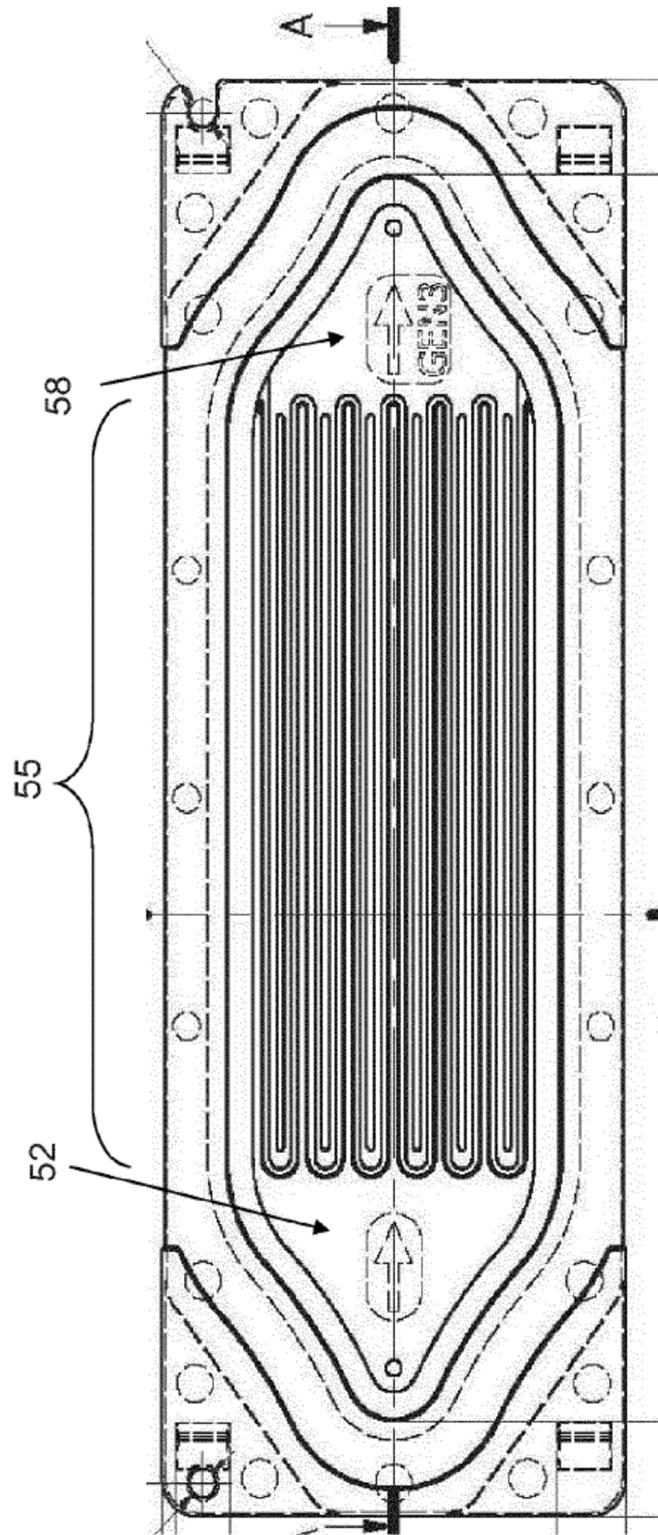


Fig. 8

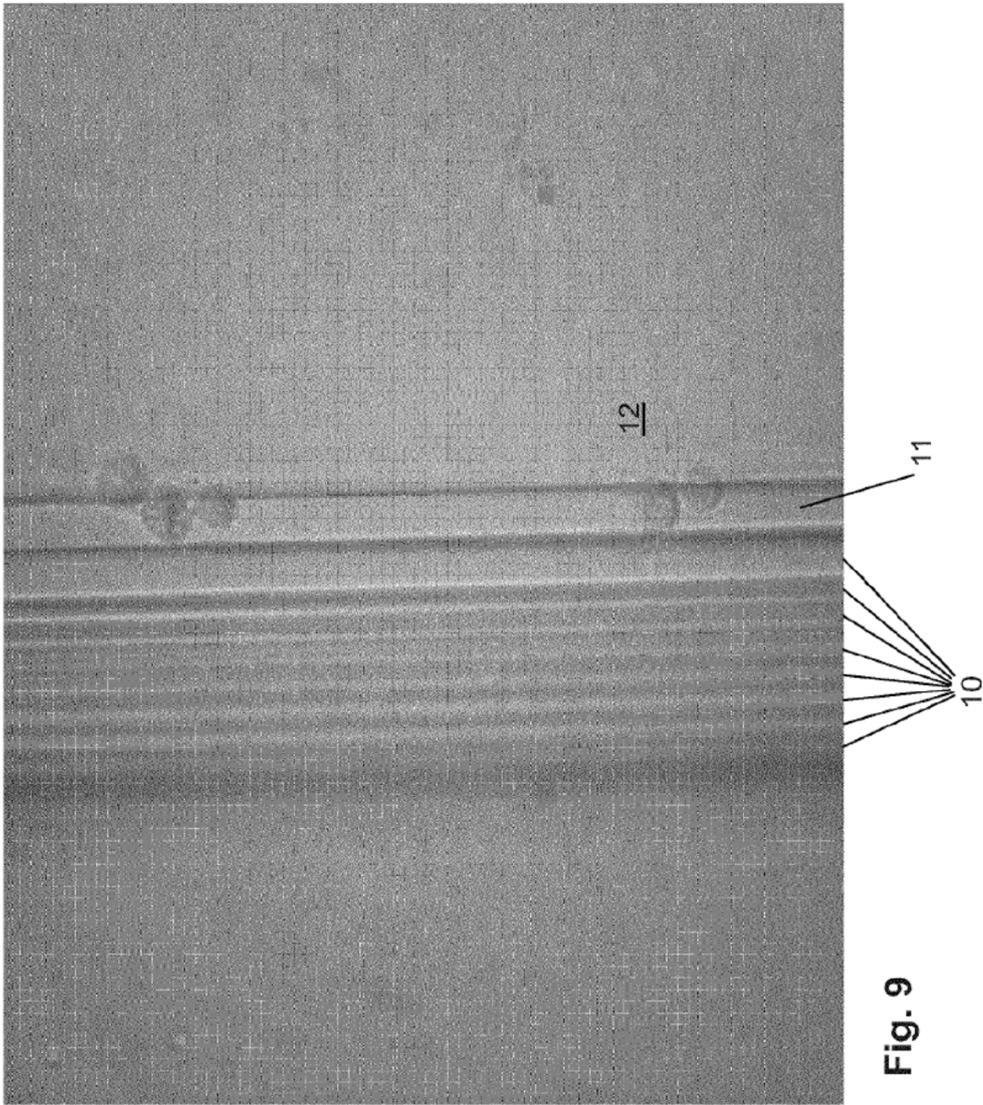


Fig. 9

