

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 569**

51 Int. Cl.:

C12M 1/12 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)

C12M 3/06 (2006.01)

C12M 1/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15163503 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2937144**

54 Título: **Procedimiento y sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas y procedimiento de producción para producir un sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas**

30 Prioridad:

25.04.2014 DE 102014207775

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

15.06.2018

73 Titular/es:

**ROBERT BOSCH GMBH (100.0%)
Postfach 30 02 20
70442 Stuttgart, DE**

72 Inventor/es:

**FALTIN, BERND y
DORRER, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 672 569 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

Procedimiento y sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas y procedimiento de producción para producir un sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas

Estado del arte

- 5 La presente invención hace referencia a un procedimiento para el tratamiento de células orgánicas en un sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas, así como a un procedimiento de producción para la producción de un sistema microfluídico de esa clase.

10 En el diagnóstico molecular existe con frecuencia la necesidad de detectar ácidos nucleicos patógenos, como ADN o ARN, desde una muestra. Como ADN o ARN patógeno se denomina el ADN o ARN obtenidos desde un patógeno, por ejemplo desde un virus, una bacteria o un hongo. Como muestra se denomina el líquido que debe ser analizado, usualmente una muestra del paciente líquida o licuada, por ejemplo sangre, orina, materias fecales, esputo, líquidos, lavados, un frotis aclarado o una muestra de tejido licuada. Los ácidos nucleicos se purifican y se proporcionan para un análisis, a través del cual se verifica la presencia de determinados patógenos o genes, por ejemplo genes de resistencia. Ese análisis puede tener lugar por ejemplo a través de secuenciación, de la reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction; PCR), de PCR en tiempo real y/o de hibridación en una micromatriz (microarray).

15 La purificación de un ácido nucleico desde una muestra tiene lugar con frecuencia a través de la desintegración o lisis de los patógenos y de la adsorción consecutiva de los ácidos nucleicos en una fase sólida, por ejemplo un filtro de material de sílice o micropartículas en forma de esferas pequeñas, las así llamadas microesferas. Junto con los métodos químicos y enzimáticos para la lisis existen además métodos mecánicos, por ejemplo con ultrasonido o a través del triturado con microesferas. El objetivo de la purificación consiste en poner a disposición los ácidos nucleicos de forma concentrada para una amplificación posterior y/o detección. Para concentrar los patógenos antes de la purificación la muestra por ejemplo se centrifuga o se lava mediante un filtro.

20 En la solicitud EP 1179 585 B1 se describe un cartucho para la lisis de componentes de una muestra de fluido. El cartucho presenta una cámara de lisis con una pared a la cual puede acoplarse un transductor de ultrasonido, para provocar una transmisión de energía ultrasónica hacia la cámara de lisis.

25 Por los documentos US 2010/0055766 A1, WO 99/33559, US 2010/0256350 A1, US 2008/0058505 y EP 2026074 A2 se conocen dispositivos microfluídicos para la separación de analitos desde muestras biológicas.

Descripción de la invención

- 30 Considerando esos antecedentes, con el principio aquí presentado se presenta un procedimiento para el tratamiento de células orgánicas. En las respectivas reivindicaciones dependientes y en la siguiente descripción se indican variantes ventajosas de la presente invención.

35 Una gran cantidad de micropartículas amontonadas formando un lecho puede utilizarse para la acumulación de células orgánicas y, en base a una resuspensión subsiguiente en un tampón de lisis, para la lisis de las células, eventualmente con una agitación mecánica adicional. Adicionalmente, las micropartículas pueden usarse también para la purificación de una sustancia liberada desde las células orgánicas, por ejemplo de ADN.

40 Los procedimientos conocidos hasta el momento utilizan centrifugación o filtros de tejido, así como membranas, para la acumulación de células desde una muestra. Una centrifugación presenta la desventaja de que ésta no puede implementarse en un sistema microfluídico y por eso puede integrarse con dificultad en una secuencia automatizada. En el caso de la utilización de un filtro de tejido o de una membrana es posible una integración en un sistema microfluídico, así como una automatización de otra clase, pero las células acumuladas en el filtro de tejido se encuentran, por así decirlo, "ocultas", y pueden alcanzarse con dificultad para pasos del proceso subsiguientes, por ejemplo una lisis, así como esto sucede con una efectividad empeorada. La invención soluciona este problema a través del apilamiento reversible con respecto a un elemento de filtro y de la resuspensión de micropartículas. Gracias a ello, con sólo un componente puede cumplirse con dos exigencias opuestas, a saber, la puesta a disposición de un elemento con poros reducidos, por ejemplo para la acumulación de células y para la unión de ácidos nucleicos, y el lavado lo más eficiente posible y completo por ejemplo de células acumuladas o de ácidos nucleicos unidos con reactivos, por ejemplo reactivos de lisis o de lavado.

45 De acuerdo con el concepto aquí propuesto, la acumulación de células sobre un apilamiento de micropartículas posibilita una concentración de las células ventajosa para un análisis posterior. Puesto que de este modo puede mejorarse una sensibilidad de una detección, eventualmente subsiguiente, de por ejemplo patógenos en las células. Eventualmente en principio pueden detectarse de este modo cantidades reducidas de células en un volumen

grande. A través de la resuspensión de las micropartículas las células se liberan nuevamente en un volumen más reducido y, de manera ventajosa, pueden lisarse de forma efectiva, debido a lo cual resulta un efecto de concentración.

5 Como otra ventaja, a través de la utilización de las micropartículas para la acumulación y la purificación puede prescindirse de una membrana o de otro filtro para la purificación. Gracias a ello, un sistema según la invención puede realizarse de forma más compacta y conveniente en cuanto a los costes. En un perfeccionamiento del principio aquí sugerido, mediante la agitación mecánica de las micropartículas durante la lisis puede alcanzarse un efecto de triturado, de modo que pueden lisarse de ese modo también células que se lisan con dificultad, por ejemplo hongos.

10 Un procedimiento de tratamiento aquí sugerido para el análisis de células orgánicas es adecuado en particular para una integración en un sistema microfluídico. Con ello, el desarrollo del procedimiento se vuelve accesible, gracias a lo cual puede ahorrarse en cuanto a tiempo y a costes. Además, una automatización en un sistema microfluídico ofrece la ventaja de que el sistema puede operarse sin conocimientos especiales y de que se reduce el riesgo de contaminaciones.

15 Se proporciona un procedimiento para el tratamiento de células orgánicas, donde el procedimiento presenta los siguientes pasos:

puesta a disposición de un sistema microfluídico con una fase estacionaria en forma de una cámara que presenta una gran cantidad de micropartículas;

20 entrada de una gran cantidad de células orgánicas en una fase móvil hacia la cámara, mediante una primera abertura del sistema microfluídico;

acumulación de las células orgánicas en una sección (en particular disminuida) de la cámara, la cual está situada aguas arriba de al menos un filtro impermeable (en una variante también para las células orgánicas) del sistema microfluídico; e

25 introducción de un agente de lisis hacia la cámara, para resuspender las micropartículas y las células orgánicas en la cámara, para una desintegración de las células orgánicas.

De este modo, el filtro del sistema microfluídico se encuentra dispuesto por ejemplo entre una segunda abertura y la sección (que en particular disminuye). Por ello, el filtro se encuentra situado aguas arriba de esa sección que disminuye, en una dirección de flujo desde la segunda abertura, sobre la sección que se reduce. Expresado de otro modo, en el caso de un flujo de entrada de fluido mediante la primera abertura y la sección que disminuye de la cámara, el filtro se encuentra situado aguas abajo de la sección que disminuye. En una forma de ejecución, el filtro puede además ser permeable para células orgánicas y en otra forma de ejecución puede ser impermeable

35 Mediante el procedimiento, las células pueden tratarse en el sentido de que los ácidos nucleicos contenidos en las células, como ADN o ARN, pueden volverse accesibles para un análisis. El sistema microfluídico puede tratarse de una estructura en capas con estructuras de un tamaño micromilimétrico hasta milimétrico, para el análisis de células orgánicas, por ejemplo puede tratarse de un así llamado sistema lab-on-a-chip (laboratorio en un chip). Las células orgánicas pueden estar contenidas en un fluido, en forma de una muestra, por ejemplo en un fluido corporal, y de este modo, en la cámara, pueden llevarse a una interacción con la fase estacionaria, de manera que con la ayuda del agente de lisis las células se disocian o se lisan, liberando así los ácidos nucleicos. Con este fin, en una variante del principio aquí presentado, la fase estacionaria en forma de las micropartículas puede entenderse como una "herramienta" para la apertura mecánica de las células. Como la resuspensión puede entenderse un arremolinamiento o una vorticidad de las células orgánicas y de las micropartículas dentro de la cámara.

45 De acuerdo con una forma de ejecución del procedimiento, en el paso de la introducción, el agente de lisis puede introducirse de modo que las micropartículas y las células orgánicas se resuspenden en la cámara. Esto puede tener lugar por ejemplo introduciendo en la cámara el agente de lisis mediante la segunda abertura del sistema microfluídico, situada aguas abajo del filtro. De este modo, la resuspensión, es decir el arremolinamiento de las células y micropartículas y, con ello, la apertura de las células, puede respaldarse de manera ventajosa y puede mejorarse.

50 De manera alternativa o complementaria con respecto a la resuspensión de las micropartículas a través de fuerzas de flujo, la resuspensión de las micropartículas puede respaldarse a través del acoplamiento de otra energía mecánica, por ejemplo ultrasonido u ondas de choque en la cámara. Esto ofrece la ventaja de que se intensifica la agitación mecánica de las micropartículas y, de este modo, el efecto de lisis.

- De acuerdo con otra forma de ejecución, el procedimiento puede presentar un paso del llenado o de la introducción de las micropartículas mediante la abertura de entrada en la cámara y/o del apilamiento de las micropartículas en la sección disminuida de la cámara. Esto ofrece la ventaja de que puede alcanzarse un apilamiento especialmente denso de las micropartículas, lo cual aumenta la efectividad de la acumulación de las células orgánicas. De este modo, por ejemplo después de un transporte del sistema, en el cual eventualmente a través de impactos o vibraciones actuantes, se ha descomprimido el apilamiento de las micropartículas, puede alcanzarse un nuevo apilamiento denso de las micropartículas. Otra ventaja reside en el hecho de que la cámara puede usarse para otros fines en pasos del proceso precedentes, por ejemplo como cámara de reacción o de almacenamiento. Las micropartículas se introducen sólo cuando es necesario. Asimismo, de este modo, un elemento del sistema fluídico que presenta la cámara y la fase estacionaria pueden proporcionarse independientemente uno de otro y, con ello, puede ampliarse de manera ventajosa un campo de aplicación del sistema fluídico, en donde el sistema microfluídico, por ejemplo, puede orientarse y adaptarse específicamente al cliente. El llenado o la introducción de las micropartículas puede tener lugar por ejemplo a través del bombeo o del pipeteo hacia la cámara de las micropartículas en una fase móvil, por ejemplo agua o un tampón acuoso. El apilamiento de las micropartículas puede tener lugar por ejemplo a través de la sedimentación a través de la gravitación o a través del bombeo o irrigación de un líquido sobre las micropartículas, donde la dirección de flujo se orienta desde la primera abertura de la cámara, mediante la sección (en particular que disminuye) y el filtro, hacia la segunda abertura. Si se utiliza una bomba, entonces ésta puede encontrarse aguas arriba o aguas abajo de la cámara, de modo que el líquido se bombea con sobrepresión sobre las micropartículas o se succiona con presión negativa.
- Además, el procedimiento puede comprender un paso de la introducción de un ligante, por ejemplo de un tampón de unión, hacia la cámara. De este modo, ácidos nucleicos liberados en base a la desintegración desde las células pueden unirse a las micropartículas, por ejemplo debido a interacciones electroestáticas. Con esa forma de ejecución del procedimiento puede prepararse con facilidad un tratamiento posterior de los ácidos nucleicos liberados, por ejemplo un lavado o una acumulación sobre las micropartículas.
- Además, el procedimiento puede presentar un paso del apilamiento de las micropartículas con los ácidos nucleicos fijados en las micropartículas, en la sección disminuida de la cámara. Con esa forma de ejecución puede realizarse una concentración de los ácidos nucleicos en un espacio lo más reducido posible y, con ello, una elución de los ácidos nucleicos desde un volumen lo más reducido posible. En ese paso, el apilamiento puede tener lugar de manera que el líquido o el ligante que se encuentra en la cámara es succionado a través de la segunda abertura.
- Para alcanzar una pureza particularmente buena de los ácidos nucleicos, a continuación del paso de la introducción del ligante, puede realizarse un lavado de las micropartículas. Un lavado puede tener lugar por ejemplo conduciendo un tampón de lavado sobre las micropartículas. También en este caso el tampón de lavado puede conducirse hacia la cámara de manera que tenga lugar una resuspensión de las micropartículas, por ejemplo a través de la introducción mediante la segunda abertura. Esto ofrece la ventaja de que las contaminaciones pueden eliminarse de forma especialmente efectiva.
- El procedimiento puede presentar un paso de la elución de los ácidos nucleicos de las micropartículas y un paso del transporte de los ácidos nucleicos a través del filtro y de la segunda abertura, desde la cámara. Ese paso puede realizarse por ejemplo irrigando agua y/o un agente de elución a través de la primera o la segunda abertura, sobre los ácidos nucleicos acumulados delante del filtro. Por ejemplo, el agente de elución puede introducirse en la cámara mediante la segunda abertura, incubarse durante un cierto período de tiempo y después succionarse nuevamente a través de la segunda abertura. Esa forma de ejecución, de manera rápida y sencilla, garantiza una separación de la sustancia analizada, desde los medios, para su puesta a disposición. Eventualmente, la cámara puede calentarse también durante la elución, por ejemplo a temperaturas entre 30 y 70 °C.
- El procedimiento, antes del paso de la elución de los ácidos nucleicos, puede presentar un paso del secado de las micropartículas y del filtro. Esto ofrece la ventaja de que los residuos del ligante se eliminan de forma especialmente eficiente, posibilitando con ello una elución más completa. El secado puede tener lugar por ejemplo a través de la introducción de aire o nitrógeno sobre las partículas y/o a través del calentamiento de la cámara, por ejemplo a temperaturas entre 40 y 70 °C.
- De acuerdo con otra forma de ejecución, el procedimiento puede presentar un paso de la introducción en la cámara de un agente limpiador, por ejemplo un tampón de lavado, para limpiar las células orgánicas. Ese paso puede realizarse después del paso de la acumulación de las células orgánicas en la sección disminuida de la cámara. Ese paso del procedimiento mejora en general la pureza de la muestra, donde en particular se eliminan sustancias perjudiciales para los siguientes pasos del procedimiento. De manera ventajosa, la introducción del agente limpiador tiene lugar en ese caso a través de la primera abertura, para no perjudicar el apilamiento de las micropartículas y evitar que células acumuladas sean enjuagadas desde la cámara y de ese modo se pierdan.

Se presenta además un sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas, donde el sistema microfluídico presenta las siguientes características:

una cámara para alojar una fase estacionaria que se encuentra presente en forma de una gran cantidad de micropartículas y una fase móvil que presenta una gran cantidad de células orgánicas, donde la cámara presenta una sección (en particular disminuida) adecuada para una acumulación de las micropartículas y/o de las células orgánicas;

- 5 una primera abertura acoplada a la cámara, para la entrada de las micropartículas y/o de las células orgánicas hacia la cámara;

un filtro situado aguas abajo de la sección (en particular disminuida) de la cámara, al menos impermeable para las micropartículas; y

una segunda abertura situada aguas abajo del filtro, acoplada a la cámara.

- 10 El sistema microfluídico puede entenderse como un dispositivo que se opera en el espacio más reducido, utilizando líquidos y/o gases. La cámara puede presentar una forma alargada, donde la primera abertura puede estar dispuesta en un lado corto de la cámara. La sección disminuida de la cámara puede tratarse de un área de la cámara en forma de cuba, con una profundidad más reducida que una sección principal de la cámara en forma de cuba. La sección disminuida puede estar conformada a una distancia máxima desde la primera abertura. La primera
15 abertura en general puede denominarse como una abertura de entrada hacia la cámara y la segunda abertura puede denominarse en general como una abertura de salida desde la cámara. La ubicación aguas abajo del filtro después de la sección disminuida y la ubicación aguas abajo de la segunda abertura después del filtro puede entenderse fijada con respecto a una posición de la cámara. También la ubicación aguas abajo del filtro después de la sección disminuida y la ubicación aguas abajo de la segunda abertura después del filtro puede entenderse con relación a
20 una función fundamental del sistema microfluídico, según la cual una sustancia que debe ser analizada, al inicio del procedimiento de tratamiento antes descrito, es conducida al sistema microfluídico desde células orgánicas, mediante la primera abertura, y al final del procedimiento es extraída del sistema microfluídico mediante la segunda abertura. La sección disminuida, así como la segunda abertura de la cámara, con respecto a la gravitación, pueden encontrarse en el extremo inferior de la cámara, de modo que las micropartículas se sedimentan en ausencia de un
25 flujo en la sección disminuida. La primera abertura, con respecto a la gravitación, puede encontrarse en el extremo superior de la cámara. Lo mencionado ofrece la ventaja de que en el caso de una introducción de líquidos hacia la cámara, aire contenido en la cámara mediante la segunda abertura puede disiparse desde la primera abertura. En una variante del sistema otra tercera abertura puede encargarse también de esa función de ventilación. De manera ventajosa, el área de la cámara opuesta al filtro, proporcionada para alojar el apilamiento de micropartículas, se encuentra realizada de modo que no se producen ángulos fluidicamente "muertos", es decir, áreas que, en el caso de una introducción de líquidos sobre las micropartículas, no pueden ser atravesadas o sólo pueden ser atravesadas por los líquidos de forma insuficiente. Para ello, el extremo de la cámara que se sitúa abajo con respecto a la gravitación puede extenderse de forma oblicua o achafanada con respecto al filtro. En particular, la base de la cámara puede estar adaptada a la forma del filtro, de manera que ninguna subárea de la cámara se sitúe con mayor
30 profundidad, con respecto a la gravitación, que el extremo inferior del filtro.

- De acuerdo con una forma de ejecución, una pared de la cámara del sistema microfluídico, así como una subárea de la misma, por ejemplo una subárea circular, puede estar realizada de forma elástica, en particular como una membrana. De este modo, la pared es adecuada para la transmisión de ondas de choque o de pulsos de ultrasonido a un contenido de la cámara. Con ello, de manera sencilla, a través de la agitación mecánica adicional, puede
40 ejercerse un efecto de triturado y/o de lisado adicional sobre las células orgánicas.

- En particular, el sistema microfluídico puede estar realizado como un sistema de capas formado por al menos un elemento de base y un elemento de cubierta para recubrir el elemento de base. De este modo, la cámara en forma de cuba puede estar colocada en el elemento de base, la primera abertura puede formar parte de un primer canal que pasa por el elemento de base y el filtro puede estar dispuesto en un área del elemento de cubierta situado de
45 forma opuesta a la sección disminuida de la cámara. En esa forma modular, el sistema microfluídico puede producirse de forma especialmente rápida y conveniente en cuanto a los costes y puede adaptarse fácilmente según los deseos del cliente.

- De acuerdo con una forma de ejecución, el filtro puede estar dispuesto en un lado principal del elemento de cubierta que se encuentra orientado hacia la cámara, y la segunda abertura puede formar parte de un segundo canal que pasa por el elemento de cubierta, adyacente al filtro. En esa forma de ejecución, el sistema microfluídico, de manera ventajosa, puede realizarse con un espacio de construcción reducido.

- De manera alternativa, el sistema microfluídico puede caracterizarse porque el filtro está dispuesto en otro lado principal del elemento de cubierta que se encuentra apartado de la cámara y, mediante un canal de unión colocado en el elemento de cubierta, se encuentra acoplado a la cámara. La segunda abertura puede formar parte de un
55 segundo canal adyacente al filtro, el cual pasa por un elemento de protección que recubre el elemento de cubierta.

Esa forma de ejecución garantiza una entrada ventajosamente uniforme de las sustancias que deben ser analizadas en el filtro.

5 Además, la cámara puede estar dividida en una cámara de lisis acoplada a la primera abertura y una cámara de filtro que presenta la sección disminuida. La cámara de lisis y la cámara de filtro pueden estar unidas mediante un canal de paso. Esa forma de ejecución ofrece la ventaja de que el filtrado de las sustancias que deben analizarse puede realizarse a otra distancia del lisado de las células orgánicas que las contienen, con lo cual, de manera ventajosa, puede llevarse al máximo una concentración de las sustancias que deben analizarse.

10 De acuerdo con otra forma de ejecución del sistema microflúidico, la cámara puede presentar una forma tubular. De este modo, el filtro puede formar una base de la cámara. También esa forma de ejecución puede posibilitar una entrada de flujo más homogénea del filtro, a través de las sustancias que deben analizarse.

Se presenta además un procedimiento de producción para producir un sistema microflúidico para el tratamiento de células orgánicas, donde el procedimiento de producción presenta los siguientes pasos:

puesta a disposición de un elemento de base en donde está colocada una cámara en forma de cuba y el cual presenta una primera abertura que forma parte de un primer canal que pasa por el elemento de base;

15 puesta a disposición de un elemento de cubierta;

puesta a disposición de un filtro en el elemento de base o en el elemento de cubierta; y

colocación del elemento de cubierta sobre el elemento de base, de manera que el filtro se dispone de forma contigua con respecto a una sección (en particular disminuida) de la cámara.

20 El objeto de la presente invención puede alcanzarse también de forma rápida y eficiente a través de la variante de ejecución de la invención en forma de un procedimiento de producción.

A continuación, el principio aquí presentado se explica en detalle mediante los dibujos añadidos. Las figuras muestran:

Figura 1: un diagrama de bloques de un sistema microflúidico para el tratamiento de células orgánicas, según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

25 Figura 2: una representación en sección de un sistema microflúidico según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

Figura 3: otra representación en sección del sistema microflúidico de la figura 2;

Figura 4: una representación en sección de un sistema microflúidico según otro ejemplo de ejecución de la presente invención;

30 Figura 5: un diagrama de operaciones de un procedimiento para el tratamiento de células orgánicas, según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

Figuras 6 a 11: imágenes de fases para explicar un modo de funcionamiento del sistema microflúidico de la figura 2, según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

35 Figura 12: un diagrama de operaciones de un procedimiento de producción para producir un sistema microflúidico para el tratamiento de células orgánicas, según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

Figura 13: un diagrama de bloques de un sistema microflúidico según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

Figura 14: un diagrama de bloques de otro sistema microflúidico según un ejemplo de ejecución de la presente invención;

40 Figura 15: figuras parciales de componentes de un sistema microflúidico según un ejemplo de ejecución de la presente invención en diferentes vistas; y

Figura 16: figuras parciales de otros componentes de un sistema microfluídico según un ejemplo de ejecución de la presente invención en diferentes vistas.

En la siguiente descripción de ejemplos de ejecución convenientes de la presente invención para los elementos representados en las distintas figuras y que actúan de modo similar se utilizan los mismos signos de referencia o signos similares, donde se prescinde de una descripción repetida de esos elementos.

La figura 1 muestra un diagrama de bloques de un ejemplo de ejecución de un sistema microfluídico 100 para el tratamiento de células orgánicas. El sistema microfluídico 100 se utiliza para el tratamiento de células orgánicas mediante el empleo de micropartículas y comprende una cámara 102, un primer canal 104, un filtro 106 y un segundo canal 108. El primer canal 104 forma un canal de entrada para la entrada de micropartículas y/o de una muestra con células orgánicas, hacia la cámara 102. El segundo canal 108 contacta un lado posterior del filtro, así como del elemento de filtro 106 y forma un canal de salida para la salida de una sustancia extraída desde las células orgánicas con la ayuda de las micropartículas y del agente de lisis, y purificada mediante el apilamiento, desde el sistema microfluídico 100. A través de un canal de unión 110, la cámara 102 y el elemento de filtro 106 están conectados mediante fluido, donde también puede prescindirse del canal de unión o éste puede formar parte de la cámara. En el ejemplo de ejecución mostrado en la figura 1, el sistema microfluídico 100 está equipado adicionalmente con un canal de ventilación 112 para ventilar la cámara 102. Un volumen de la cámara 102, en donde tienen lugar la lisis y la purificación de la muestra, se ubica entre por ejemplo 100 microlitros y 10 mililitros, y se ubica usualmente aproximadamente en dos mililitros. A modo de ejemplo, el elemento de filtro 106 se encuentra presente en forma de una frita plástica, de un soporte plástico poroso, de una membrana perforada, de una disposición en forma de rastrillo, de columnas, o de una rejilla metálica. Por ejemplo, el elemento de filtro puede estar realizado también como componente de silicio, por ejemplo con una membrana perforada o una pieza de canal interrumpida a modo de un rastrillo, a través de columnas pequeñas. Las perforaciones, los poros o las columnas presentan preferentemente una anchura, así como una distancia, de menos de 100 micrómetros.

La figura 2 muestra una representación en sección del sistema microfluídico 100 presentado mediante el diagrama de bloques de la figura 1, según un ejemplo de ejecución de la presente invención. Tal como muestra la representación de la figura 2, el sistema microfluídico 100, a modo de ejemplo, está realizado como una estructura multicapas de polímeros y se compone de un elemento de base 200, así como de un elemento de cubierta 202, donde el elemento de base 200 presenta un grosor más elevado que el elemento de cubierta 202. La cámara 102 está colocada en el elemento de base 200 y, en un extremo, presenta una disminución 204, la cual provoca que líquidos puedan ser extraídos sin residuos desde la cámara 102. Esto se logra debido a que la segunda abertura se encuentra en el extremo de la disminución que se sitúa más abajo, con respecto a la gravitación. El elemento de filtro 106 está dispuesto en el elemento de cubierta 202, directamente enfrente de la disminución 204. De este modo, en el ejemplo de ejecución mostrado en la figura 2 se prescinde del canal de unión mostrado mediante el diagrama de bloques en la figura 1, lo cual presenta la ventaja de que se reduce un volumen muerto y se evita una problemática de una obstrucción del canal de unión. En el ejemplo de ejecución mostrado en la figura 2, el elemento de filtro 106 está insertado en el elemento de cubierta 202, para alcanzar una hermetización lateral del elemento de filtro 106. Las dimensiones de la cámara en cada dirección espacial, de manera ventajosa, son mayores que aproximadamente 3 milímetros. Esto ofrece la ventaja de que burbujas de aire que se encuentran en la cámara o que se producen al introducir líquidos en la cámara suben hacia arriba y se eliminan del sistema.

En la representación en la figura 2, el sistema de capas microfluídico 100 se encuentra en funcionamiento en un posicionamiento y, con ello, se muestra colocado sobre una superficie lateral, es decir que el elemento de base 200 se encuentra ahora al lado del elemento de cubierta 202. Tal como muestra la representación en la figura 2, la cámara 102 se encuentra colocada en forma de una cuba en el elemento de base 200. La disminución 204 está formada a través de achaflanados en el material del elemento de base 200, en un extremo de la cuba, donde los achaflanados se extienden de modo que, en la posición del sistema microfluídico 100 mostrada en la figura 2, todo el material móvil introducido en la cámara 102, por ejemplo las fases utilizadas en un análisis, se acumula en la sección disminuida 204, enfrente del filtro 106. En el ejemplo de ejecución del sistema microfluídico 100 mostrado en la figura 2, el filtro 106 se encuentra dispuesto en un lado principal 206 del elemento de cubierta 202, orientado hacia la cámara 102.

El primer canal 112 para cargar la cámara 102 con una muestra que debe analizarse forma una primera abertura del sistema microfluídico 100. El segundo canal 108 contiguo al filtro 106 atraviesa el elemento de cubierta 202 y presenta una segunda abertura 208, mediante la cual líquidos pueden extraerse desde el sistema microfluídico 100. El segundo canal o canal de salida 108 se extiende esencialmente de forma paralela con respecto a la disminución 204, en la representación hacia abajo, de manera que sustancias que deben analizarse pueden extraerse fácilmente desde el sistema microfluídico 100.

La figura 3 muestra el sistema microfluídico 100 de la figura 2, a modo de ejemplo, mediante un corte longitudinal a través del elemento de base 200. Una sección transversal del filtro 106, situado aguas abajo de la sección disminuida 204 de la cámara 102 en esta vista, se indica mediante una línea discontinua circular. El segundo canal 108, situado aguas abajo del filtro 106 en esta vista, se indica mediante una línea de puntos. Una sección de una

desembocadura 300 del segundo canal 108, contigua al elemento de filtro 106, se indica mediante una línea discontinua circular. En base a la representación de la figura 3 puede observarse claramente que un diámetro del elemento de filtro 106 es un poco más grande, por ejemplo 0,5 a 2 milímetros más grande, que una anchura de la disminución 204. Esta medida de diseñar el filtro 106 más ancho que la disminución 204, garantiza una entrada de flujo del filtro 106 mejorada y más uniforme, así como una estanqueidad mejorada del pasaje entre la cámara 102 y el filtro 106. El lado posterior del elemento de filtro 106 se contacta a través del segundo canal o canal de salida 108.

En base a la representación de la sección longitudinal del sistema microfluídico 100 a modo de ejemplo, en la figura 3 puede observarse claramente que el primer canal 104 que pasa por el elemento de base 200 presenta una primera abertura 302 para la entrada de una muestra y/o de una gran cantidad de micropartículas hacia la cámara 102. Además, en base a la representación en la figura 3 puede observarse claramente que, en el ejemplo de ejecución mostrado del sistema microfluídico 100, la sección disminuida 204 presenta una distancia máxima desde la primera abertura 302.

La figura 4, nuevamente en una representación en sección, muestra otro ejemplo de ejecución del sistema microfluídico 100. En ese ejemplo de ejecución el sistema de capas formado por el elemento base 200 y el elemento de cubierta está ampliado en un elemento de protección 400. El elemento de protección 400 presenta un grosor correspondiente al elemento de cubierta 202 y está dispuesto sobre el elemento de cubierta 202. En particular, en el ejemplo de ejecución mostrado en la figura 4, el segundo canal 108 está colocado en el elemento de protección 400, a saber, en un lado principal del elemento de protección 400 que se encuentra orientado hacia el elemento de cubierta 202. El elemento de filtro 106, a diferencia del ejemplo de ejecución presentado en las figuras 2 y 3, está dispuesto en otro lado principal 404 del elemento de cubierta 202, opuesto al lado principal 206, apartado del elemento de base 200 con la cámara 102, y mediante un canal de unión 406 que atraviesa transversalmente el elemento de cubierta 202, se encuentra acoplado a la cámara 102.

La realización alternativa del sistema microfluídico 100, mostrada en la figura 4, en donde el elemento de filtro 106 está posicionado sobre el lado posterior 404 del elemento de cubierta 202, ofrece la ventaja de que se alcanza una entrada de flujo más homogénea del elemento de filtro 106 y el elemento de filtro 106 se hermetiza aún mejor de forma lateral. La otra tapa o elemento protector 400 hermetiza la estructura formada por el elemento de base 200 y el elemento de cubierta 202.

De acuerdo con otros ejemplos de ejecución que no se muestran en las figuras, la cámara 102 está dividida en una cámara de lisis acoplada a la primera abertura 302 y una cámara de filtro que presenta la sección disminuida 204. Para el acoplamiento mediante fluidos, la cámara de lisis y la cámara de filtro pueden estar unidas mediante un canal de paso. Esa ejecución ofrece la ventaja de que el elemento de filtro 106 puede posicionarse también a una mayor distancia de la cámara de lisis. Además, la cámara 102 puede estar realizada como un tubo pequeño y, en su extensión principal, puede colocarse transversalmente con respecto al lado principal 206 del elemento de cubierta 202, en el elemento de base 200. El elemento de filtro 106 puede formar entonces una base de la cámara 102. Esa ejecución a modo de ejemplo presenta la ventaja de que se alcanza una entrada de flujo más homogénea del elemento de filtro 106. El tubo pequeño puede estar adherido o soldado en la estructura de varias capas.

La figura 5 muestra un diagrama de operaciones de un ejemplo de ejecución de un procedimiento 500 para el tratamiento de células orgánicas desde una muestra. El procedimiento 500 puede ejecutarse en un sistema microfluídico presentado mediante las figuras 1 a 4.

En un paso 502, mediante una abertura de entrada de un sistema microfluídico que realiza el procedimiento 500, micropartículas, por ejemplo esferas pequeñas con un diámetro en el rango de micrómetros, las así llamadas microesferas, son colocadas o introducidas en una cámara del sistema microfluídico y son apiladas en una sección disminuida de la cámara, delante de un filtro impermeable para las micropartículas y células orgánicas.

En un paso 504 se pone a disposición el sistema microfluídico con la gran cantidad de micropartículas apiladas en la sección disminuida de la cámara, de manera que en un paso 506 una muestra con una gran cantidad de células orgánicas puede ingresar en la cámara del sistema microfluídico mediante la primera abertura.

En un paso 508 las células orgánicas, en la sección disminuida, se acumulan en las micropartículas allí apiladas. Como la muestra que presenta células orgánicas puede entenderse una fase móvil que contiene las células orgánicas. Como las micropartículas puede entenderse una fase estacionaria del sistema microfluídico que realiza el procedimiento. La fase estacionaria está prevista para entrar en interacción con la fase móvil del sistema microfluídico, para tratar las células orgánicas para un análisis subsiguiente, por ejemplo, eventualmente en combinación con el agente de lisis, lisando desde las células ADN o ARN contenido en las células orgánicas. Durante la acumulación, las micropartículas son presionadas continuamente contra el filtro a través del flujo dominante, debido a lo cual puede mantenerse una densidad de apilamiento invariable o la densidad de apilamiento incluso puede aumentarse aún más. Debido a ello se mejora aún más la efectividad de la acumulación.

El paso de la entrada 506 y de la acumulación 508 pueden tener lugar también al mismo tiempo, donde a la muestra se introducen las partículas de forma continua desde la primera abertura de la cámara.

De acuerdo con un ejemplo de ejecución del procedimiento 500, los pasos 502 a 508 pueden realizarse al mismo tiempo o en un orden modificado. Por ejemplo, se agregan las micropartículas a la muestra y se introducen junto con ésta en el sistema, de manera que tienen lugar al mismo tiempo un apilamiento de las micropartículas y una acumulación de células orgánicas en ese apilamiento. Esto ofrece la ventaja de que pueden ahorrarse pasos del proceso y líquidos, y el procedimiento o el sistema pueden implementarse de forma más rápida y ahorrando más espacio. De acuerdo con otro ejemplo de ejecución, el procedimiento 500 puede comenzar con el paso de la puesta a disposición del sistema microfluídico que presenta la gran cantidad de micropartículas. Esto significa que, por ejemplo, las micropartículas ya se cargan en el sistema durante una producción.

En un paso 510, mediante una primera abertura del sistema microfluídico, se introduce un agente limpiador en la cámara, para limpiar las micropartículas y las células orgánicas. El paso 510 es opcional y, según los ejemplos de ejecución, puede repetirse en otros momentos del procedimiento 500. En un paso 512 del procedimiento, un agente de lisis se introduce en la cámara para alcanzar una desintegración de las células orgánicas y la liberación de ácidos nucleicos contenidos en las células. En particular, en el paso 512 el agente de lisis se introduce en la cámara mediante la segunda abertura del sistema microfluídico, situada aguas abajo del filtro, debido a lo cual se resuspenden las micropartículas y células orgánicas. Para unir a las micropartículas los ácidos nucleicos liberados desde las células en base a la desintegración, en un paso 514 se introduce en la cámara un ligante. La introducción del ligante en la cámara mediante la segunda abertura situada aguas abajo del filtro posibilita un mezclado particularmente bueno con el líquido que ya se encuentra en la cámara, y una circulación eficiente de las micropartículas. De manera opcional, después del paso 514 puede seguir un paso del lavado de las micropartículas y de los ácidos nucleicos adsorbidos en las micropartículas.

En un paso 516, las micropartículas o microesferas con los ácidos nucleicos fijados en las micropartículas se apilan en la sección disminuida de la cámara. En un paso 518, los ácidos nucleicos son eluidos desde las micropartículas y son transportados a través del filtro y de la segunda abertura, desde el sistema microfluídico, para un análisis subsiguiente.

Las figuras 6 a 11 muestran imágenes de fases de un ejemplo de ejecución del procedimiento presentado mediante la figura 5 para el tratamiento de células orgánicas desde una muestra, para explicar claramente un modo de funcionamiento del sistema microfluídico 100 que realiza el procedimiento.

La figura 6 ilustra el paso del procedimiento de la entrada de una muestra que presenta una gran cantidad de células orgánicas 600, mediante la primera abertura del sistema microfluídico 100 (la cual está formada por el canal en el extremo superior de la cámara), hacia la cámara 102, así como una fase temprana en el paso de la acumulación de las células orgánicas, en donde aún se encuentran células en el área de las micropartículas. La muestra puede presentar un volumen de entre 50 microlitros y 20 mililitros. La muestra puede tratarse de un fluido corporal, como por ejemplo sangre, orina, esputo, un lavado, un frotis aclarado o muestra en un hisopo, o una muestra de tejido licuada, o también puede tratarse de una suspensión de células proveniente de un cultivo. En el paso de la entrada, la muestra con las células orgánicas 600 es bombeada o succionada a través del canal de entrada y la cámara 102, en la dirección del canal de salida 108. Para ello pueden emplearse por ejemplo bombas peristálticas o bombas de membrana. La introducción puede tener lugar también de forma manual, por ejemplo a través de pipeteado o con una jeringa. En particular, el sistema representado puede formar parte de un sistema microfluídico más grande, el cual presenta también bombas microfluídicas, por ejemplo una bomba de membrana microfluídica, así como cámaras, por ejemplo para la entrada de la muestra. La bomba puede encontrarse aguas arriba o aguas abajo de la cámara.

Las micropartículas o microesferas 602 ya están introducidas en la cámara 102 y se encuentran apiladas delante del elemento de filtro 106, en la sección disminuida 204 de la cámara 102, formando un amontonamiento. Ese apilado del amontonamiento, según ejemplos de ejecución, puede suceder ya durante la producción del sistema 100 o poco antes de un análisis o de una entrada de una muestra, por ejemplo a través de la introducción de las micropartículas 602, o durante el análisis, por ejemplo empujando juntas las micropartículas 602 durante la entrada de la muestra, formando un apilamiento. El elemento de filtro 106 está diseñado de modo que las micropartículas son retenidas. Las micropartículas 602 pueden estar presentes en forma de pequeñas esferas o partículas de material de sílice con un diámetro de entre 10 micrómetros y 1 milímetro. De manera ventajosa, las micropartículas apiladas recubren completamente el elemento de filtro. Gracias a ello se evita que se produzca una derivación en las micropartículas apiladas, mediante la cual las células orgánicas podrían perderse.

La figura 7, mediante otra imagen de fases, muestra cómo las células 600 contenidas en la muestra, por ejemplo células humanas, bacterias u hongos, se retienen en el amontonamiento de micropartículas 602 y, con ello, se acumulan. Se muestra el estado en el que se encuentran las células 600 sobre el amontonamiento, por ejemplo contra el extremo de la acumulación.

La figura 8 muestra una imagen de fases de la parte del procedimiento de la resuspensión de las células orgánicas 600 y las micropartículas 602. Tal como muestra la representación en la figura 8, las micropartículas 602 y las células acumuladas 602, mediante un agente de lisis o tampón de lisis, se resuspenden o arremolinan desde la sección disminuida 204, hacia dentro del volumen de la cámara 102. En el ejemplo de ejecución mostrado en la figura 8 se alcanza la resuspensión, en donde el tampón de lisis es bombeado desde el canal de salida 108 hacia la cámara 102. No obstante, la resuspensión puede alcanzarse en principio también a través de la introducción del tampón de lisis a través de otro canal que desemboca en el área de la cámara, en donde se encuentran las micropartículas. El aire contenido en la cámara se disipa mediante el canal de entrada o el canal de ventilación. El tampón de lisis, durante un tiempo de incubación, por ejemplo entre 1 y 30 minutos, permanece en contacto con las células y provoca una desintegración de las células 600, de manera que se liberan los ácidos nucleicos 800 contenidos en las células 600, por ejemplo ADN. El tampón de lisis puede contener para ello enzimas, por ejemplo lisozima y/o proteinasas, y/o agentes químicos de lisis, por ejemplo detergentes o componentes caotrópicos o básicos. La resuspensión de las micropartículas provoca que tenga lugar un buen mezclado de células y tampón de lisis, que se alcance una distribución de concentración homogénea del agente de lisis, por ejemplo de las enzimas, en la cámara, y que el tampón de lisis alcance todas las células. De manera adicional, una resuspensión de las micropartículas respalda la lisis al ejercer fuerzas mecánicas sobre las células. La resuspensión de las micropartículas, en el caso más simple, tiene lugar a través de fuerzas de flujo.

Durante la lisis, la cámara puede ser calentada, por ejemplo a temperaturas entre 30 y 60 °C. Esto ofrece la ventaja de que en general las reacciones químicas se desarrollan más rápido y en particular las enzimas utilizadas eventualmente para la lisis presentan una mayor actividad. También puede ser conveniente un calentamiento de la cámara a temperaturas más elevadas, por ejemplo entre 90 y 97°C. En ese caso tiene lugar esencialmente una lisis térmica.

El movimiento de las micropartículas, según un ejemplo de ejecución, puede mantenerse activo durante la lisis, en donde de forma continua o discontinua, aire es bombeado desde el canal de salida 108 hacia la cámara 102. Gracias a ello puede alcanzarse una agitación continua de las micropartículas. Esto ofrece la ventaja de que durante todo el tiempo de incubación fuerzas mecánicas pueden ejercerse sobre las células orgánicas. De este modo, las células que pueden lisarse con facilidad eventualmente ya pueden lisarse sólo a través de fuerzas mecánicas

De acuerdo con otros ejemplos de ejecución, la resuspensión de las micropartículas 602 y las células 600 puede respaldarse a través de ondas de choque o pulsos de ultrasonido. En ese caso, una pared 210 de la cámara 102 está realizada de forma completa o parcial como membrana, a través de la cual pueden acoplarse las ondas de choque o los pulsos de ultrasonido. Para ello, la membrana se pone en contacto con un inyector o un cuerno ultrasónico. Además, esto ofrece la ventaja de que a través de la agitación mecánica directa de las micropartículas 602, eventualmente también a través de cavitación, se logra un efecto de triturado y, con ello de lisis, más intenso, sobre las células 600. Eventualmente, incluso puede prescindirse por completo de la adición de por ejemplo enzimas o agentes de lisis químicos en el tampón de lisis y, en el caso más sencillo, utilizar agua o un tampón acuoso como agente de lisis. Un líquido que se produce durante ese paso del proceso se denomina lisado.

La imagen de fases mostrada en la figura 9 ilustra el paso del procedimiento de la introducción de un ligante o tampón de unión, el cual se introduce desde el canal de salida 108 hacia la cámara 102. El lisado no es expulsado desde la cámara 102, sino que se mezcla con el tampón de unión. Gracias a ello se evita que se pierda lisado y, con ello, ácidos nucleicos contenidos en el mismo, y que ya no se encuentren disponibles para el análisis. En una variante, el tampón de unión puede introducirse a la cámara a través de un tercer canal, donde el canal de salida permanece cerrado, de modo que no sale nada de lisado. El tampón de unión provoca una unión de los ácidos nucleicos 800 eluidos desde las células, a las micropartículas 602. El tampón de unión puede contener para ello alcoholes, por ejemplo etanol o isopropanol. El mezclado del tampón de unión con el lisado puede respaldarse introduciendo adicionalmente aire a la cámara a través del canal de salida.

La figura 10 muestra una imagen de fases para ilustrar una acumulación de las micropartículas 602 con los ácidos nucleicos 800 fijados en las mismas. La representación muestra cómo la mezcla que presenta las micropartículas 602 y los ácidos nucleicos 800, así como el lisado mezclado con el tampón de unión, es irrigada desde la cámara 102 en la dirección del canal de salida 108. Las micropartículas 602 con los ácidos nucleicos 800 adsorbidos se apilan nuevamente en la sección disminuida 204 de la cámara, delante del elemento de filtro 106, formando un amontonamiento. En ese estado, según ejemplos de ejecución, las micropartículas 602 pueden lavarse con un agente de lavado o tampón de lavado, para eliminar restos de células, por ejemplo proteínas. Para ello, por ejemplo un tampón de lavado puede bombearse hacia dentro de la cámara mediante el canal de entrada o, mediante el canal de salida, puede bombearse hacia fuera desde la misma. De manera alternativa, un tampón de lavado puede bombearse hacia la cámara mediante el canal de salida y, a continuación, succionarse nuevamente mediante el canal de salida. Esto ofrece la ventaja de que las micropartículas se resuspenden nuevamente con los ácidos nucleicos adsorbidos y, de este modo, pueden lavarse de modo aún más eficiente. El lavado de las micropartículas puede realizarse también varias veces.

La figura 11, mediante otra imagen de fases, ilustra el paso según la invención de la elución y el transporte de los ácidos nucleicos 800 separados desde las células. Los ácidos nucleicos 800 son eluidos desde las micropartículas o microesferas 602, en donde agua o un tampón de elución o agente de elución se introduce en el canal de salida 108 sobre el amontonamiento.

5 En una variante del procedimiento presentado mediante las imágenes de fases mostradas en las figuras 6 a 11, para el tratamiento de células orgánicas desde una muestra, se suprimen los pasos del procedimiento explicados mediante las figuras 9, 10 y 11. El lisado, eventualmente incluyendo las micropartículas, se extrae primero desde la cámara 102, y los ácidos nucleicos 800 se purifican, uniéndose por ejemplo a una membrana, por ejemplo una membrana de material de sílice. Lo mencionado ofrece la ventaja de que pueden usarse también micropartículas
10 602 que no son adecuadas para la unión de ácidos nucleicos 800. La extracción del lisado desde la cámara puede tener lugar por ejemplo a través de pipeteado o de la irrigación a través de otro canal que desemboca en la cámara, delante del filtro.

En otra variante del procedimiento aquí presentado, después del paso del procedimiento de la resuspensión, ilustrado mediante la representación en la figura 8, se realiza además una asimilación de las proteínas contenidas en el lisado. Para ello, un tampón que por ejemplo contiene proteinasas se introduce en la cámara 102 a través del canal de salida 108, se mezcla allí con el lisado y se incuba. Esto presenta la ventaja de que las impurezas, por ejemplo proteínas, pueden eliminarse aún de forma más efectiva.
15

De acuerdo con otra variante del procedimiento, respectivamente de forma breve, ondas de choque o energía de ultrasonido pueden acoplarse en la cámara en los pasos de la unión de los ácidos nucleicos a las micropartículas, del lavado de los ácidos nucleicos adsorbidos en las micropartículas y de la elución. Esto puede presentar la ventaja de que en esos pasos se mejora la resuspensión de las microesferas, mejorándose con ello la efectividad de la unión, así como del lavado o de la elución.
20

Además, las micropartículas y el filtro pueden secarse antes del paso de la elución de los ácidos nucleicos.

Además, según un ejemplo de ejecución del procedimiento aquí presentado, después del paso del procedimiento de la acumulación de las células 600 sobre el amontonamiento de micropartículas 602, ilustrado mediante la representación en la figura 7, las células acumuladas 600 pueden ser lavadas, por ejemplo con un tampón o agente de lavado. Esa realización del procedimiento ofrece la ventaja de que pueden eliminarse componentes de la muestra que afectarían la purificación posterior y la detección.
25

Además, antes del paso I puede tener lugar un tratamiento precedente de la muestra.

30 Por ejemplo, células humanas contenidas en la muestra, por ejemplo células sanguíneas, pueden lisarse a través de la adición de proteinasas o detergentes, a través choque osmótico o de un calentamiento breve, por ejemplo a 70°C. Las bacterias u hongos contenidos en la muestra se mantienen intactos y pueden acumularse sobre el amontonamiento en los pasos consecutivos. Como tratamiento precedente puede tener lugar también una licuefacción de componentes del tejido o una asimilación de proteínas, por ejemplo a través de la adición de
35 proteinasas.

De acuerdo con otro ejemplo de ejecución, como tratamiento precedente con respecto al paso del procedimiento de la entrada de la muestra en la cámara 102, ilustrado mediante la imagen de fases en la figura 6, puede eliminarse un frotis o un hisopo impregnado contenido en la muestra. El tratamiento precedente presenta la ventaja de que, para la purificación, puede accederse mejor a las células 600 cuyo ácido nucleico debe ser detectado.

40 En otra variante pueden utilizarse micropartículas magnéticas revestidas con material de sílice. Éstas pueden ponerse en movimiento en los pasos de la lisis, de la unión de los ácidos nucleicos a las micropartículas, del lavado de los ácidos nucleicos adsorbidos en las micropartículas y de la elución, respectivamente mediante un campo magnético externo. Debido a ello puede mejorarse la efectividad de la lisis, así como de la unión, así como del lavado, así como de la elución. La agitación de las micropartículas mediante campos magnéticos representa una
45 alternativa a la agitación de las micropartículas mediante fuerzas de flujo, ondas de choque o pulsos de ultrasonido. La utilización de campos magnéticos, en comparación con la utilización de ondas de choque o pulsos de ultrasonido, puede presentar aquí la ventaja de que no es necesario ningún acceso mecánico a una superficie externa de la cámara, debido a lo cual puede ahorrarse eventualmente espacio de construcción.

El procedimiento presentado mediante las imágenes de fases en las figuras 6 a 11 posibilita la acumulación de patógenos desde una muestra, de su lisis subsiguiente, así como de la purificación de los ácidos nucleicos contenidos y en particular se caracteriza porque un análisis significativo de los patógenos se posibilita también en el caso de una concentración solamente reducida de patógenos en una muestra.
50

La figura 12 muestra un diagrama de operaciones de un ejemplo de ejecución de un procedimiento de producción 1200 para producir un sistema microfluídico para el tratamiento de células orgánicas. Un sistema microfluídico producido mediante el procedimiento de producción 1200 puede tratarse de un ejemplo de ejecución del sistema microfluídico presentado mediante las figuras 1 a 4.

5 En un paso 1202 se proporcionan un elemento de base con una cámara colocada en forma de cuba en el elemento de base y un primer canal, acoplado a la cámara, el cual pasa por el elemento de base. En un paso 1204 se proporcionan un elemento de cubierta y un filtro. En un paso 1206, el elemento de cubierta se coloca sobre el elemento de base, de manera que el filtro se dispone de forma opuesta a una sección disminuida de la cámara o se sitúa de forma contigua a la misma.

10 La figura 13 muestra un diagrama de bloques de un sistema microfluídico a modo de ejemplo, para realizar el procedimiento según la invención. Junto con la cámara 1305 con filtro 1310, canal de entrada 1315, canal de salida 1320 y canal de ventilación 1325, el sistema presenta una bomba microfluídica 1330, válvulas microfluídicas 1355, así como otras cámaras 1340 (sólo se representa una). Las cámaras 1340 se utilizan como depósito para almacenar reactivos, por ejemplo del tampón de lisis, del tampón de unión, del tampón de lavado y/o del tampón de elución.
 15 Otros depósitos, por ejemplo para almacenar la muestra, de líquidos para la introducción de las micropartículas y de otros tampones de lavado, pueden estar conectados al canal de entrada 1315. Las cámaras 1340 pueden igualmente estar ventiladas mediante canales de ventilación o aireación 1325, para alcanzar una compensación de presión durante la extracción de líquido desde las cámaras. La bomba 1330 se utiliza para irrigar la muestra, así como eventualmente para tampones de lavado, mediante el canal de entrada, hacia el canal de salida. Además, con
 20 la bomba 1330 pueden irrigarse a la cámara tampones de lisis, de unión y de lavado, desde la salida.

La figura 14 muestra un diagrama de bloques de una topología de cámara 1305, filtro 1310 y segunda abertura, en donde paralelamente con respecto al filtro 1310 se encuentra situada una membrana 1405 que es adecuada para la purificación de ácidos nucleicos, por ejemplo una membrana de material de sílice. Después de la lisis se pasa desde la ruta con el filtro 1310 a la ruta con la membrana 1405. Durante el bombeo del tampón de unión/tampón de lavado para el lavado de los ácidos nucleicos/tampón de elución, las micropartículas se apilan delante de la
 25 membrana 1405. Gracias a ello resulta la ventaja de que los ácidos nucleicos pueden purificarse de modo aún más eficiente, en particular en el caso de una carga elevada de ácidos nucleicos y/o pueden utilizarse micropartículas que no sean adecuadas para la purificación de ácidos nucleicos. Nuevamente pueden suprimirse los canales de unión entre cámara y filtro/membrana; es decir que la membrana 1405, de forma similar al filtro 1310, puede estar dispuesta directamente en la cámara 1305.
 30

Las figuras parciales de la figura 15 muestran una parte principal de la cámara 1305 y del filtro 1310 en un nivel en una representación de una vista superior (figura 15A), en una representación de la sección transversal (figura 15B) y en una vista en perspectiva (figura 15C). El canal de entrada 1315 (donde su otra conducción no está representada) está representado de forma lateral y el canal de salida 1320 está representado como perforación. En el ejemplo de
 35 ejecución mostrado en las figuras parciales 15 se suprime la disminución. Un canal de ventilación no se encuentra representado.

Las figuras parciales de la figura 16 muestran otra representación de una parte principal de la cámara 1305 y del filtro 1310 en diferentes vistas (representación en una vista superior en la figura 16A, representación en una vista de la sección transversal en la figura 16B y representación en perspectiva en la figura 16C). Se representan aquí hacia
 40 el exterior una ampliación adicional 1605 y una abertura 1610. La abertura circular 1610 se encuentra tapada por otra membrana 1615.

El diseño aquí presentado para el tratamiento de células orgánicas puede utilizarse por ejemplo en sistemas o rutinas de laboratorio que se emplean para el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

45 Los ejemplos de ejecución descritos y mostrados en las figuras están seleccionados sólo a modo de ejemplo. Los distintos ejemplos de ejecución pueden combinarse unos con otros por completo o con respecto a características individuales. Un ejemplo de ejecución puede complementarse también a través de características de otro ejemplo de ejecución.

Además, los pasos del procedimiento aquí presentados pueden realizarse repetidos, así como pueden realizarse en un orden diferente al orden descrito.

50 Si un ejemplo de ejecución comprende una vinculación "y/o" entre una primera característica y una segunda característica, entonces esto debe considerarse como el hecho de que el ejemplo de ejecución, según una forma de ejecución, presenta tanto la primera característica como también la segunda característica y, según otra forma de ejecución, presenta sólo la primera característica o sólo la segunda característica.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento (500) para el tratamiento de células orgánicas (600), donde el procedimiento (500) presenta los siguientes pasos:
- 5 puesta a disposición (504) de un sistema microfluídico (100) con una fase estacionaria en forma de una cámara (102) que presenta una gran cantidad de micropartículas (602);
- entrada (506) de una gran cantidad de células orgánicas (600) en una fase móvil hacia la cámara (102), mediante una primera abertura (302) del sistema microfluídico (100);
- 10 acumulación (508) de las células orgánicas (600) en una sección (204) de la cámara (102), en donde las micropartículas (602) son depositadas y la cual está situada aguas arriba de un filtro (106), impermeable para las micropartículas (602), del sistema microfluídico (100); y
- caracterizado por
- una introducción (512) de un agente de lisis hacia la cámara (102) mediante un canal que desemboca en la sección (204) de la cámara (102) para resuspender las micropartículas (602) y las células orgánicas (600) en la cámara (102), para una desintegración de las células orgánicas (600).
- 15 2. Procedimiento (500) según la reivindicación 1, caracterizado porque en el paso de la introducción (512), el agente de lisis es introducido en la cámara (102) mediante una segunda abertura (208) del sistema microfluídico (100), situada aguas abajo del filtro (106).
3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque, después de la introducción del agente de lisis, las micropartículas se ponen en movimiento a través del acoplamiento de ultrasonido o de ondas de choque en la
- 20 cámara.
4. Procedimiento (500) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el procedimiento (500) presenta un paso del llenado (502) de las micropartículas (602) mediante la primera abertura (302) hacia la cámara (102) y/o del apilamiento de las micropartículas (602) en la sección disminuida (204) de la cámara (102).
5. Procedimiento (500) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el procedimiento (500) presenta un paso de la introducción (514) de un ligante mediante la segunda abertura (208) hacia la cámara (102), para unir a las micropartículas (602) un ácido nucleico (800) liberado desde las células (600) en base a la desintegración.
- 25 6. Procedimiento (500) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el procedimiento (500) presenta un paso del apilamiento (516) de las micropartículas (602) con los ácidos nucleicos (800) fijados en las micropartículas (602) en la sección disminuida (204) de la cámara (102).
- 30 7. Procedimiento (500) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el procedimiento (500) presenta un paso de la elución (518) de los ácidos nucleicos (800) desde las micropartículas (602) y del transporte del ácido nucleico (800) a través del filtro (106) y de la segunda abertura (208) o de otra abertura desde la cámara (102).
- 35 8. Procedimiento (500) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el procedimiento (500) presenta un paso de la introducción (510) de un agente limpiador a través de la segunda abertura (208) hacia la cámara (102), para limpiar las micropartículas (602) con los ácidos nucleicos (800) fijados en las micropartículas (602).
- 40 9. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque después del paso de la desintegración de las células orgánicas se realiza la purificación de los ácidos nucleicos en una membrana separada.

Fig. 1

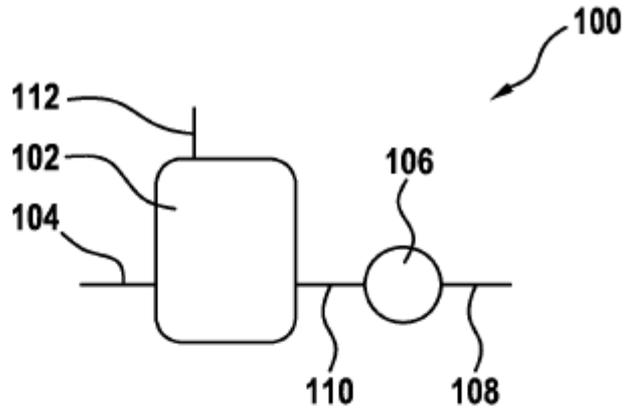


Fig. 2

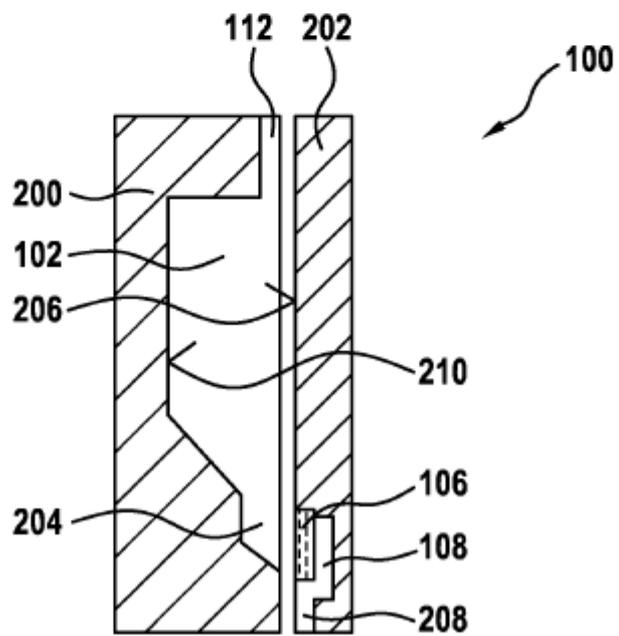


Fig. 3

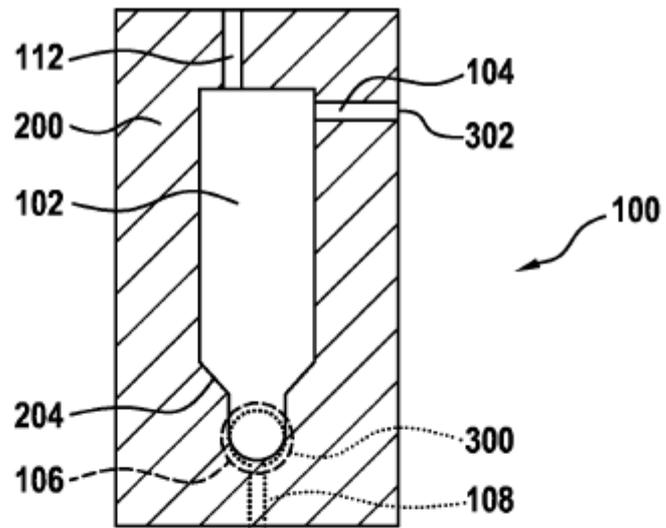


Fig. 4

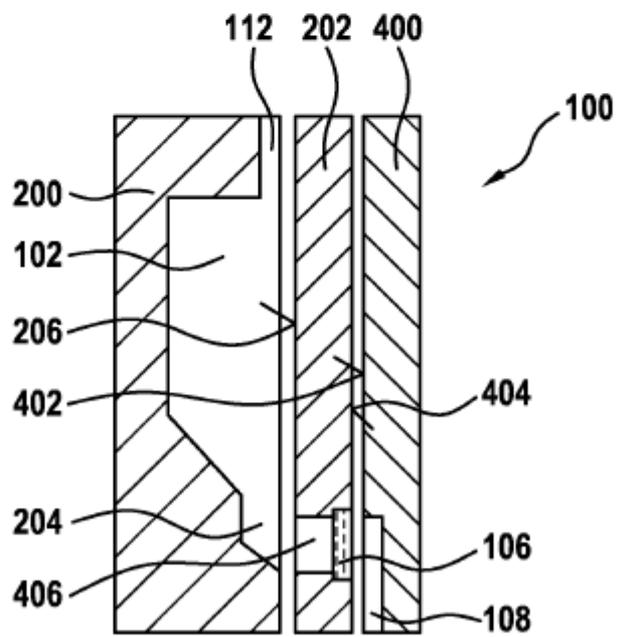


Fig. 5

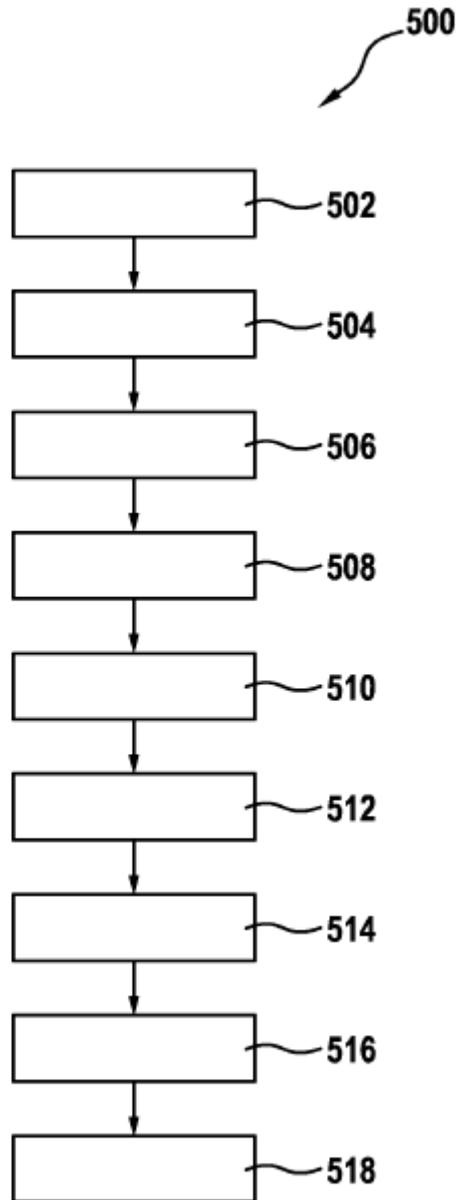


Fig. 6

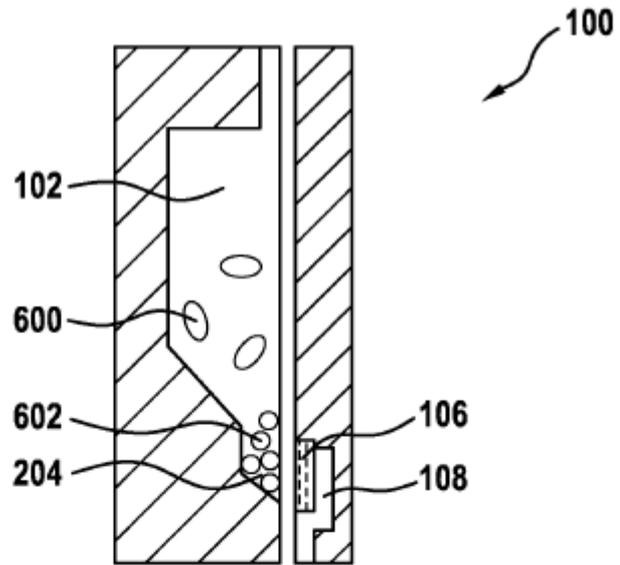


Fig. 7

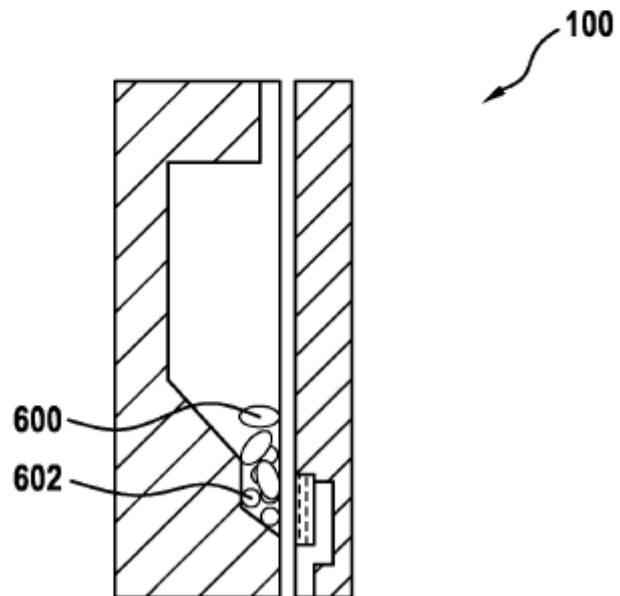


Fig. 8

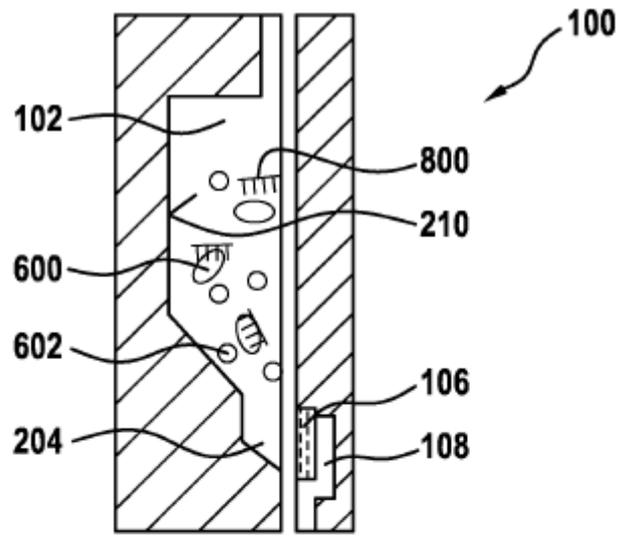


Fig. 9

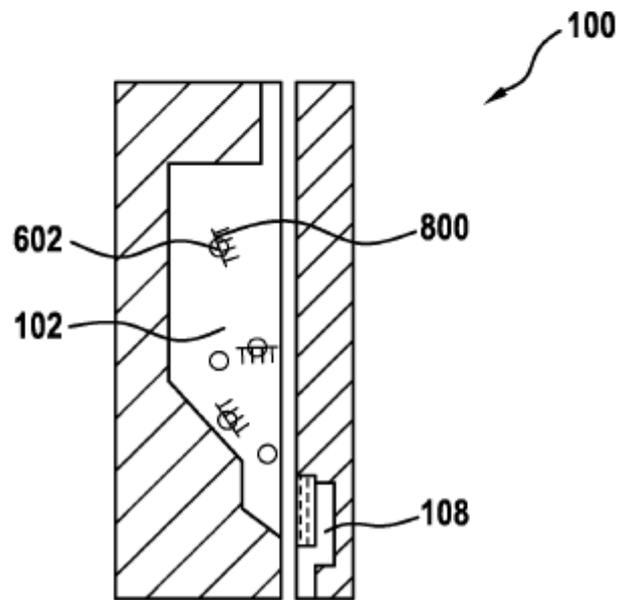


Fig. 10

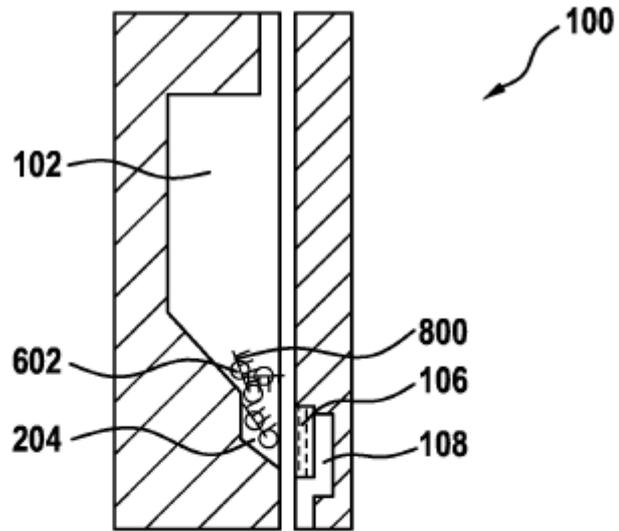


Fig. 11

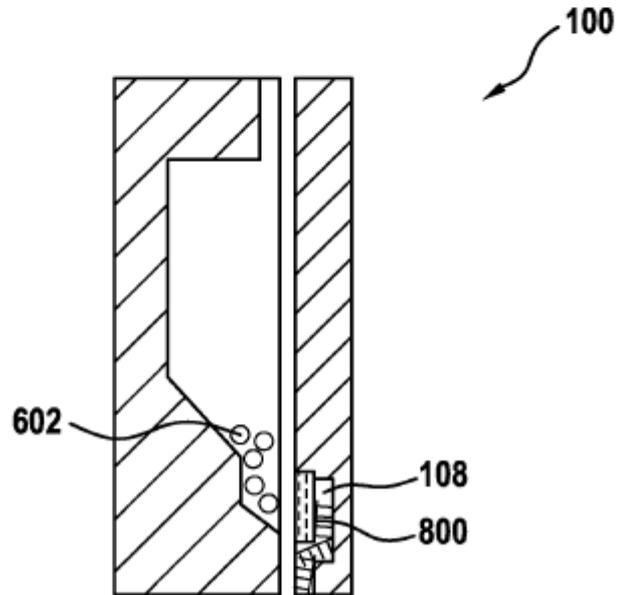


Fig. 12

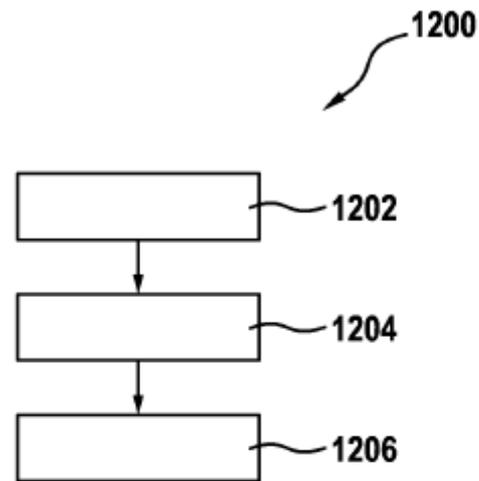


Fig. 13

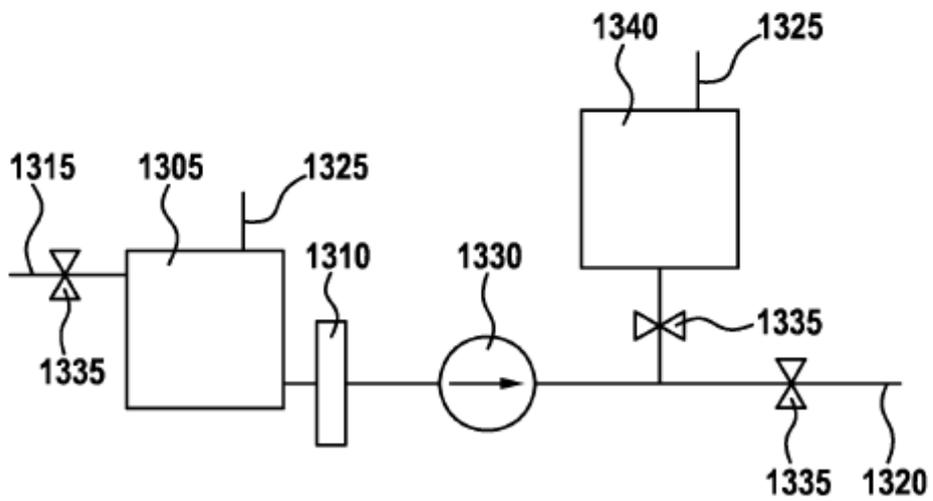


Fig. 14

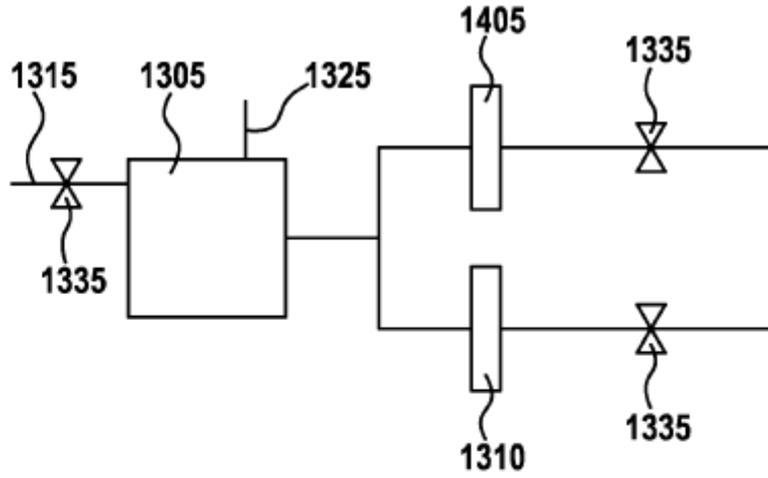


Fig. 15A

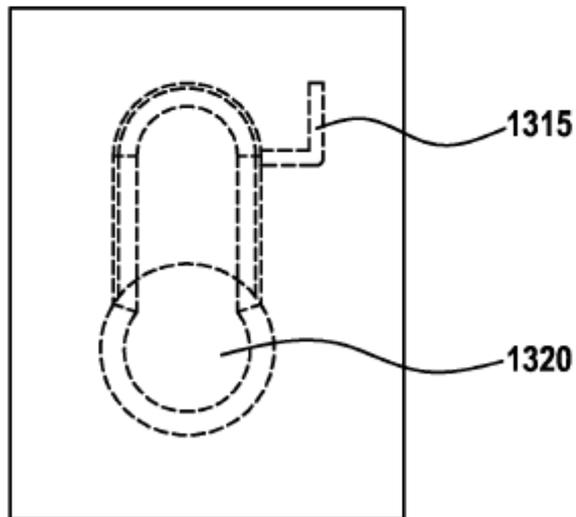


Fig. 15B

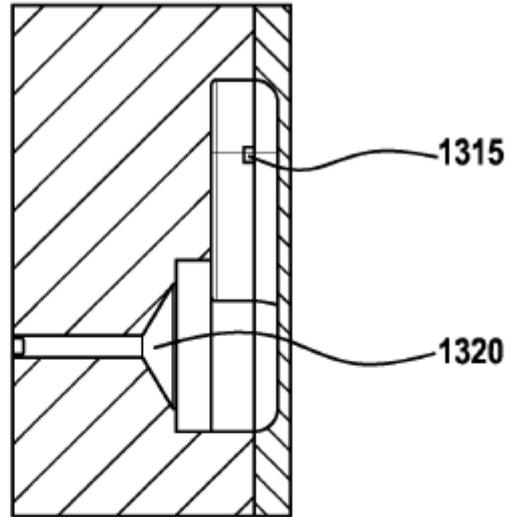


Fig. 15C

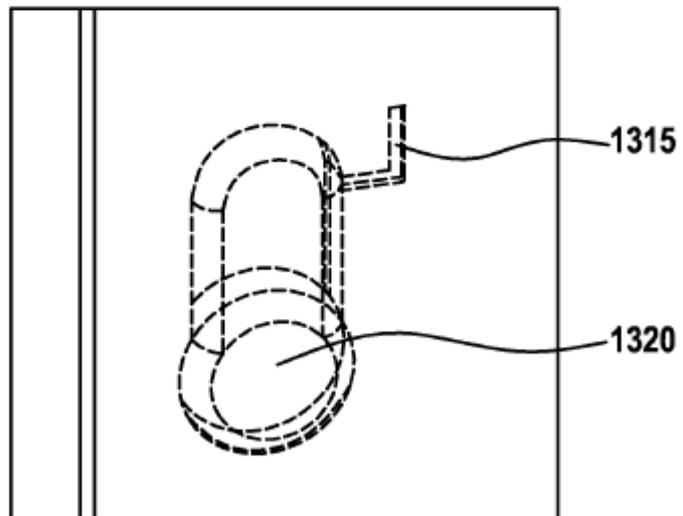


Fig. 16A

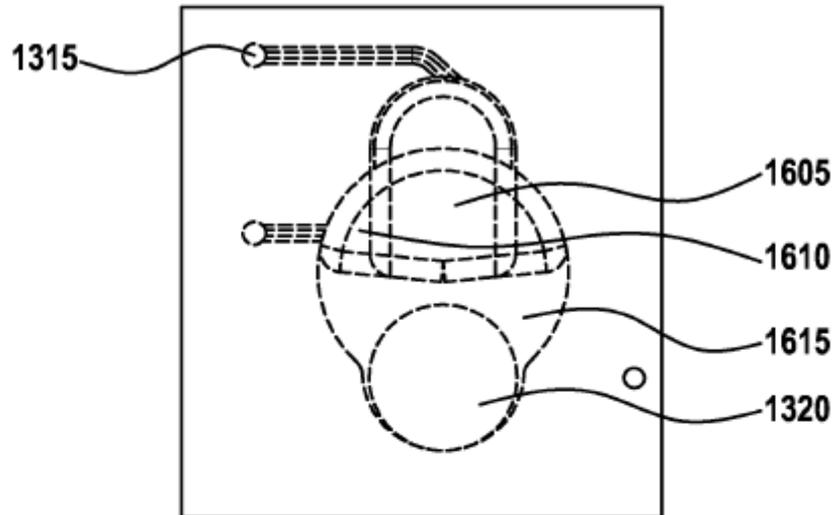


Fig. 16B

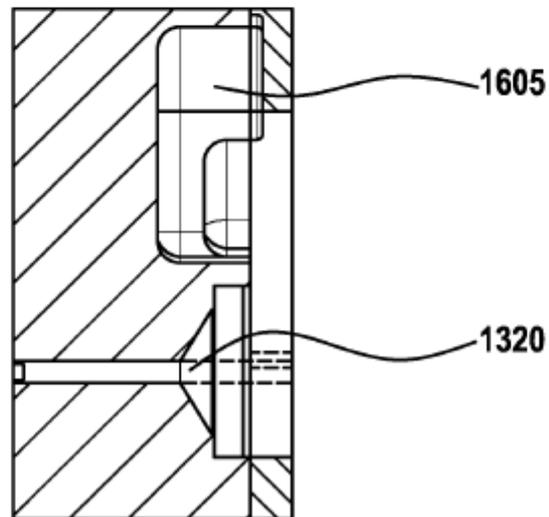


Fig. 16C

