

ITALIAN PATENT OFFICE

Document No.

102010901831176A1

Publication Date

20111020

Applicant

ELTEK S.P.A.

Title

DISPOSITIVI MICROFLUIDICI E/O ATTREZZATURE PER DISPOSITIVI
MICROFLUIDICI

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"Dispositivi microfluidici e/o attrezzature per dispositivi microfluidici",

di: ELTEK S.p.A., di nazionalità italiana, con sede in Strada Valenza, 5A - 15033 Casale Monferrato (AL).

Inventori designati: Costanzo GADINI, Via C. Battisti, 9A - 15040 Frassineto Po (AL)

Fulvio CERUTTI, Via S. Antonio 17/c - 10015 Ivrea (TO)

Depositata il: 20 aprile 2010

* * *

TESTO DELLA DESCRIZIONE

Campo dell'invenzione

La presente invenzione si riferisce in generale ai dispositivi microfluidici, preferibilmente della tipologia generalmente identificata da termini quali "*Lab On Chip*" o "*Lab-on-a-chip*" (LOC) o "*Micro Total Analysis Systems*" (μ TAS), particolarmente per applicazioni medicali e/o biologiche (in seguito identificate per semplicità con "*bio-medicale*" e suoi derivati) e/o per applicazioni diagnostiche, nonché ad attrezzature utilizzabili in abbinamento a dispositivi microfluidici.

Più particolarmente, l'invenzione è relativa ad un dispositivo microfluidico per separare e/o concentrare una sotto-popolazione di particelle da un fluido biologico, il dispositivo comprendendo almeno un primo percorso microfluidico avente un ingresso, per l'immissione del fluido biologico nel primo percorso, ed un'uscita, per il rilascio dal primo percorso di un campione di fluido arricchito nella suddetta sotto-popolazione di particelle.

Tecnica anteriore

Ai fini della diagnosi e dello studio di talune malattie, ad esempio del sangue, del midollo osseo e dei relativi tessuti ed organi, risulta utile l'individuazione e l'analisi di specifiche cellule o particelle presenti in un fluido biologico.

Il sangue è un fluido biologico composto essenzialmente da una parte corpuscolata e da una parte fluida. La parte corpuscolata comprende tipicamente globuli rossi, globuli bianchi e piastrine, mentre la parte fluida è costituita dal plasma. I globuli rossi ed i globuli bianchi sono cellule, mentre le piastrine sono frammenti cellulari. Le cellule più numerose sono i globuli rossi, o eritrociti, che realizzano essenzialmente lo

scambio di ossigeno e di diossido di carbonio tra i polmoni ed i tessuti corporei. I globuli bianchi, o leucociti, rappresentano la popolazione minore di cellule del sangue ed hanno essenzialmente la funzione di controllare la risposta del sistema immunitario del corpo e difenderlo da organismi infettivi ed agenti estranei, sia nei tessuti che nel flusso del sangue. Le piastrine hanno essenzialmente la funzione di determinare la coagulazione del sangue.

La popolazione di leucociti comprende cellule di vario tipo, che giocano ruoli distinti nella risposta immunitaria. I leucociti si dividono in granulociti e cellule linfoidi. I granulociti si distinguono a loro volta in neutrofili, eosinofili e basofili. Le cellule linfoidi si distinguono invece in linfociti e monociti. In generale, eritrociti e piastrine sono le particelle del sangue di dimensioni più piccole. Indicativamente, gli eritrociti hanno forma discoidale, con un diametro di circa 6-8 μm e spessore di circa 2 μm , mentre le piastrine hanno un diametro di circa 2-4 μm . Le cellule che costituiscono i globuli bianchi hanno mediamente dimensioni maggiori, variabili tra 7 e 20 μm . A titolo puramente indicativo, i granulociti neutrofili hanno un diametro di circa 12-14 μm , i granulociti eosinofili un diametro di circa 10-15 μm , i granulociti basofili un diametro di circa 14-16 μm , i linfociti un diametro di circa 7-15 μm ed i monociti un diametro di circa 16-20 μm . Queste dimensioni hanno valore puramente indicativo atteso che - ad esempio - sono stati osservati eritrociti con un diametro superiore ai 9 μm (macroцитi) o inferiore a 6 μm (microцитi). Allo stesso modo, atteso che cellule del sangue sono soggette ad una certa deformabilità, le loro dimensioni possono risultare inferiori a quelle sopra indicate, a causa del loro comportamento dinamico in un flusso liquido. Inoltre cellule colpite da malattia (ad esempio cellule epiteliali tumorali) possono avere mediamente dimensioni diverse rispetto alla condizione sana e/o avere dimensioni superiori ai 15 μm .

I leucociti, così come altre particelle presenti nel sangue, possono fornire informazioni importanti su varie malattie. L'identificazione di queste malattie comporta quindi l'individuazione e l'isolamento di talune cellule o particelle in un campione di sangue. L'isolamento può essere effettuato con tecniche non invasive, utilizzando dispositivi di separazione, che provvedono ad isolare le particelle di interesse in base a loro caratteristiche biofisiche, ad esempio le loro dimensioni.

A tale scopo è noto l'uso di dispositivi miniaturizzati, ottenuti con tecniche di micro-fabbricazione, in cui viene immesso un campione di sangue. Taluni di questi dispositivi microfluidici, noti genericamente come "*Lab On Chip*" o "*Lab-on-a-chip*" (LOC) o "*Micro Total Analysis Systems*" (μ TAS), hanno anche funzionalità di analisi sulle particelle separate. Questi dispositivi vengono definiti "*microfluidici*" poiché integrano uno o più componenti idraulici miniaturizzati, quali percorsi, passaggi, valvole, filtri ed ostacoli per particelle, che hanno almeno una dimensione caratteristica (lunghezza, larghezza, altezza, spessore, sezione di passaggio, eccetera) inferiore ad 1 mm.

In abbinamento a tali dispositivi è noto impiegare particelle funzionalizzate, predisposti per interagire con cellule o sostanze bersaglio. Queste particelle, note anche come *bead*, hanno in genere forma approssimativamente sferica e dimensioni nano- o micro-metriche, ed hanno un nucleo sensibile a campi magnetici applicati. Tipicamente queste bead si legano ad una cellula bersaglio, dando luogo ad un aggregato di particelle che, tramite un campo magnetico, può essere separato dal resto della soluzione analizzata.

Sommario dell'invenzione

Le tecniche di miniaturizzazione consentono di ottenere dispositivi microfluidici separatori di cellule mediamente efficienti, che presuppongono l'impiego di modeste quantità di sangue. I dispositivi microfluidici noti, tuttavia, sono spesso di costruzione relativamente complicata o di impiego poco pratico, o hanno ridotta affidabilità.

La presente invenzione si propone in generale di realizzare dispositivi microfluidici di costruzione semplice e/o di comodo impiego pratico.

Un altro scopo della presente invenzione è quello di realizzare dispositivi microfluidici e/o relative attrezzature idonee a migliorare e/o agevolare la separazione e/o l'arricchimento e/o l'identificazione e/o la trasformazione e/o l'analisi di particelle, dove:

- con "*identificazione delle particelle*" si intende designare sia il caso di una marcatura di singole cellule o particelle obiettivo, ad esempio con bead fluorescenti, sia il caso di una più generica identificazione e/o analisi, tramite idonei mezzi, di un dispositivo microfluidico o di una sua parte contenente particelle obiettivo;

- con “*trasformazione di particelle*” si intende almeno l’eventuale coltivazione di cellule e/o una estrazione di parti di cellula, effettuata direttamente in almeno una parte dello stesso dispositivo microfluidico che ha in precedenza realizzato una separazione.

Un altro scopo generale dell’invenzione è quello di realizzare attrezzature utilizzabili con vantaggio in abbinamento a dispositivi microfluidici.

Questi ed altri scopi ancora, che risulteranno maggiormente chiari in seguito, sono raggiunti secondo l’invenzione da dispositivi aventi le caratteristiche indicate nelle allegate rivendicazioni. Le rivendicazioni costituiscono parte integrante dell’insegnamento tecnico qui fornito in relazione all’invenzione.

Breve descrizione dei disegni

Ulteriori scopi, caratteristiche e vantaggi della presente invenzione risulteranno chiari dalla descrizione particolareggiata che segue e dai disegni annessi, forniti a puro titolo di esempio esplicativo e non limitativo, in cui:

- la figura 1 è una rappresentazione schematica in pianta di una disposizione microfluidica, volta ad illustrare il principio di funzionamento generale di una metodologia di micro-filtrazione o micro-separazione prevista in una forma di attuazione preferenziale dell’invenzione;

- la figura 2 è una rappresentazione schematica di alcune disposizioni di micro-filtrazione o micro-separazione secondo la tecnica nota;

- la figura 3 è una vista prospettica, parziale e schematica, di un dispositivo microfluidico secondo l’invenzione;

- le figure 3A, 3B e 3C sono, rispettivamente, un primo ed secondo dettaglio, in scala ingrandita, del dispositivo di figura 3, ed una vista prospettica parziale di una variante del dispositivo di figura 3;

- le figure 4A e 4B illustrano in forma schematica esempi di aggregati di particelle separabili mediante un dispositivo secondo l’invenzione;

- la figura 5 è una vista prospettica, parziale e schematica, di un altro dispositivo microfluidico secondo l’invenzione;

- la figura 6 è una vista simile a quella di figura 5, con l’aggiunta di corpo di chiusura del dispositivo;

- le figure 7-11 sono viste prospettiche, in scale ingrandite, di alcuni dettagli del

dispositivo delle figure 5 e 6;

- le figure 12-14 sono viste prospettiche, in scala ingrandita, di ulteriori dettagli del dispositivo delle figure 5 e 6;

- la figura 15 è una vista prospettica e schematica di un ulteriore dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

- le figure 16 e 17 sono viste prospettiche di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, rispettivamente con e senza coperchio;

- le figure 18 e 19 sono viste prospettiche, in scale ingrandite, di rispettivi dettagli del dispositivo della figura 19;

- le figure 20 e 21 sono viste prospettiche da diverse angolazioni di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

- la figura 22 è un vista prospettica del dispositivo delle figure 20-21, senza un rispettivo coperchio;

- la figura 23 è un vista prospettica ingrandita di una porzione del dispositivo di figura 22;

- le figure 24 e 25 sono dettagli in maggior scala di figura 23;

- la figura 26 è una vista prospettica in scala accresciuta di una porzione del dispositivo delle figure 20-26;

- la figura 27 è un vista prospettica ingrandita di una porzione del dispositivo di figura 22;

- le figure 28 e 29 sono dettagli in maggior scala di figura 27;

- le figure 30 e 31 sono viste prospettiche da diverse angolazioni di un corpo principale secondo una variante del dispositivo delle figure 20-29;

- le figura 32 e 33 sono una vista prospettica ed una vista laterale di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

- la figura 34 è un dettaglio ingrandito di figura 32;

- la figura 35 è una vista in prospettiva di una porzione di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

- la figura 36 è una vista prospettica di un corpo di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;

- le figure 37, 38 e 39 sono dettagli in scale ingrandita del corpo di figura 36;

- le figure 40 e 41 sono viste prospettiche da diverse angolazioni di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- le figure 42 e 43 sono una vista esplosa ed una vista prospettica parzialmente sezionata, rispettivamente, del dispositivo delle figure 40 e 41;
- la figura 44 è una vista prospettica simile a quella di figura 41, con una parte del dispositivo rimossa;
- la figura 45 è una vista prospettica di una parte del dispositivo delle figure 40-44;
- la figura 46 è una vista in pianta dal basso di un altro dispositivo fluidico secondo l'invenzione;
- le figure 47 e 48 sono viste prospettiche da diverse angolazioni di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- la figura 49 è una vista prospettica parzialmente sezionata del dispositivo delle figure 47-48;
- le figura 50 è una vista prospettica di una parte di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, quale il dispositivo delle figure 47-49;
- la figura 51 è una vista in pianta, in scala ingrandita, della parte di dispositivo di figura 50;
- le figure 52 e 53 sono viste prospettiche da diverse angolazioni di una parte di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- le figura 54 è una vista in esploso della parte di dispositivo microfluidico secondo le figure 52 e 53;
- le figure 55 e 56 sono viste prospettiche da diverse angolazioni di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- le figura 57 e 58 sono una vista esplosa ed una vista prospettica parzialmente sezionata, rispettivamente, del dispositivo delle figure 55 e 56;
- le figure 59 e 60 sono due sezioni schematiche di un altro dispositivo secondo l'invenzione, in due diverse condizioni operative;
- la figura 61 è una sezione, in scala ingrandita, di una variante del dispositivo delle figure 59-60;
- la figura 62 è una sezione trasversale di figura 61;

- le figure 63 e 64 sono una sezione schematica ed un relativo dettaglio ingrandito, rispettivamente, di un altro dispositivo secondo l'invenzione;
- la figura 65 è una vista in pianta del dettaglio di figura 64;
- le figure 66 e 67 sono una vista in pianta ed una vista in sezione di un mezzo valvolare del dispositivo delle figure 63-64;
- le figure 68 e 69 sono viste prospettiche, rispettivamente dall'alto e dal basso, di una parte di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- la figura 70 è vista prospettica parzialmente sezionata del dispositivo di figura 68;
- la figura 71 è vista prospettica parzialmente sezionata, in scala ingrandita, di una parte del dispositivo di figura 70;
- la figura 72 è una vista prospettica di una variante della parte di figura 71;
- le figure 73 e 74 sono viste prospettiche, da diverse angolazioni, di una parte del tipo illustrata in figura 72 accoppiata ad un supporto o adattatore;
- la figura 75 è una vista prospettica del supporto o adattatore delle figure 73 e 74;
- la figura 76 è una rappresentazione semplificata di un'apparecchiatura secondo l'invenzione, utilizzabile unitamente ad un dispositivo microfluidico, in particolare per la circolazione e/o la gestione dei flussi di fluidi e/o il controllo del dispositivo stesso;
- le figure 77 e 78 sono rappresentazioni semplificate di ulteriori apparecchiature del tipo di quella di figura 76;
- la figura 79 è una rappresentazione schematica di un'attrezzatura secondo l'invenzione, di tipo "usa e getta" impiegabile in abbinamento ad un dispositivo microfluidico;
- la figura 80 illustra in forma schematica un esempio di processo di stampaggio di un corpo microlavorato facente parte di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- la figura 81 è una vista prospettica di un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- le figure 82 e 83 sono una vista prospettica in parziale sezione ed una vista esplosa, rispettivamente, del dispositivo di figura 81;

- la figura 84 è una vista prospettica, parziale e schematica, di un ulteriore dispositivo microfluidico secondo l'invenzione;
- la figura 85 è una rappresentazione schematica in pianta di un sistema sensore o conta-particelle per un dispositivo fluidico secondo l'invenzione;
- la figura 86 è una rappresentazione schematica in pianta di un sistema per l'allineamento di particelle di un dispositivo fluidico secondo l'invenzione, in abbinamento ad un sistema sensore o conta-particelle; e
- la figura 87 è una rappresentazione schematica in pianta di un sistema per la separazione acustica e/o sensore di particelle di un dispositivo fluidico secondo l'invenzione.

Descrizione dettagliata di forme di attuazione preferite dell'invenzione

Il riferimento ad “una forma di attuazione” all’interno di questa descrizione sta ad indicare che una particolare configurazione, struttura, o caratteristica descritta in relazione alla forma di attuazione è compresa in almeno una forma di attuazione. Quindi, le frasi “in una forma di attuazione” e simili, presenti in diverse parti all’interno di questa descrizione, non sono necessariamente tutte riferite alla stessa forma di attuazione. Inoltre, le particolari configurazioni, strutture o caratteristiche possono essere combinate in ogni modo adeguato in una o più forme di attuazione. I riferimenti qui utilizzati sono soltanto per comodità e non definiscono l’ambito di tutela o la portata delle forme di attuazione.

Dove non diversamente indicato, nella presente descrizione e nelle allegate rivendicazioni:

- con “*bead*” si intende indicare particelle o micro-particelle funzionalizzate e/o generici vettori di ligandi, quali degli anticorpi, in particolare predisposti per interagire con cellule, sostanze o particelle bersaglio, tali bead avendo preferibilmente forma approssimativamente sferica e/o dimensioni nano- o micro-metriche;
- con il termine “*particella*” e derivati si intende designare ogni oggetto solido non dissolto in un fluido biologico, quali cellule, aggregati di cellule, bead, aggregati di cellule e beads, eccetera;
- con “*buffer*” e simili si intende una sostanza liquida atta a diluire il fluido biologico o sangue e/o agevolare e/o modificare il deflusso del fluido biologico o sangue

all'interno di un dispositivo microfluidico, o più in generale un liquido atto ad interagire con il fluido biologico ai fini dell'invenzione; il buffer può essere ad esempio acqua distillata o una soluzione fisiologica o salina, eventualmente contenente un agente anticoagulante e/o bead.

I dispositivi microfluidici in seguito descritti sono preferibilmente del tipo previsto almeno per concentrare particelle obiettivo in un fluido organico, ovvero per ottenere, da un fluido organico in ingresso contenente una popolazione di particelle, un campione arricchito in una sotto-popolazione di particelle obiettivo, ovvero dispositivi atti almeno a separare particelle di specifico interesse.

Esempi di particelle obiettivo includono, ad esempio, leucociti, eritrociti fetali, cellule cancerogene, organismi infettivi, nonché bead ed aggregati di particelle, quali ad esempio una bead a cui sono legate una o più cellule, o una cellula a cui sono legate più bead.

Preferibilmente i dispositivi in seguito descritti includono mezzi di separazione o filtraggio, quali mezzi di tipo sostanzialmente meccanico, disposti lungo un percorso o tra un ingresso ed un'uscita di un percorso per il fluido contenente la popolazione di particelle. In particolare, i mezzi di separazione sono configurati in modo da trattenere o separare almeno le particelle obiettivo, ad esempio aventi una certa forma, dimensione o deformabilità, o determinate caratteristiche fisiche, mentre altre particelle vengono evacuate dal dispositivo. Questi mezzi di separazione o filtraggio sono preferibilmente definiti direttamente nel corpo del dispositivo, tramite tecniche di microlavorazione e/o microdeposizione, e quindi senza dover montare o fissare componenti a tale scopo, quali membrane o vagli configurati come parti aggiuntive.

I dispositivi in seguito descritti possono inoltre essere utilizzabili per rimuovere fluido in eccesso da un campione di particelle, senza che ciò comporti una perdita sostanziale di particelle obiettivo nel fluido rimosso.

L'invenzione verrà in seguito descritta con riferimento all'arricchimento di particelle o elementi obiettivo contenuti o dispersi in un fluido biologico, in particolare all'arricchimento di cellule tumorali e/o leucociti e/o altre cellule obiettivo in un campione di sangue. Si consideri tuttavia che l'invenzione è in generale applicabile anche a particelle di diverso tipo e natura, presenti anche in fluidi diversi da fluidi biologici;

nella seguente descrizione, pertanto, il termine “sangue” deve poter essere all’occorrenza inteso anche come un generico fluido.

Nel seguito verranno descritte forme di attuazione inventive di dispositivi microfluidici e forme di attuazione inventive di attrezzature utilizzabili in abbinamento a dispositivi microfluidici. I dispositivi microfluidici descritti sono di impiego particolarmente vantaggioso in abbinamento alle attrezzature descritte, ma ciò non esclude né l’impiego dei suddetti dispositivi in abbinamento ad attrezzature diverse da quelle qui descritte, né l’impiego delle suddette attrezzature in abbinamento a dispositivi microfluidici diversi da quelli qui descritti.

Come risulterà chiaro in seguito, in una forma di attuazione preferenziale dell’invenzione, il dispositivo microfluidico è concepito per operare una micro-filtrazione o micro-separazione di tipo qui definito “a flusso miscelato”, che viene qui brevemente sintetizzato con riferimento alla figura 1.

In termini generali, in accordo ad un tale principio inventivo, un primo fluido BL, particolarmente un fluido biologico oggetto di analisi, è fatto transitare in un primo percorso o canale 3, qui definito principale, tra almeno un ingresso 4 ed almeno un’uscita 5. Questo percorso principale 3 si estende almeno in parte tra un primo ed un secondo percorso o canale, qui definiti ausiliari ed indicati con 8 e 9, i quali sono delimitati rispetto al percorso principale 3 da un primo ed un secondo argine 10 e 11, provvisti ciascuno di rispettive vie passaggio, dove il percorso 8 ha almeno un ingresso 6 ed il percorso 9 ha almeno un’uscita 7. Di preferenza questi argini definiscono la dimensione minore della sezione trasversale del percorso 3.

Tramite l’ingresso 6 nel primo percorso ausiliario 8 viene immesso un fluido ausiliario LB, quale un liquido di buffer (oppure una porzione dello stesso fluido biologico oggetto di analisi), destinato a miscelarsi con il primo fluido BL.

Il secondo percorso ausiliario 9 adempie essenzialmente a funzioni di canale di scarico, per una parte della miscela BL+LB dei due fluidi, particolarmente contenente particelle diverse dalle particelle obiettivo, con il relativo secondo argine 11, provvisto delle relative vie, che adempie a funzioni di micro-filtrazione o micro-separazione.

Tramite le vie di passaggio del primo argine 10 il fluido ausiliario LB penetra lateralmente nel percorso principale 3, miscelandosi con il primo fluido BL.

In tal modo, in generale, il fluido ausiliario LB impartisce al flusso del primo fluido BL e/o a particelle in esso contenute una componente di spinta o movimento, preferibilmente verso il secondo argine 11 e/o verso l'uscita 5 del percorso principale 3. Le particelle di dimensioni inferiori a quelle delle vie di passaggio del secondo argine 11 vengono in tal modo sollecitate a passare nel secondo percorso ausiliario 9 di scarico, unitamente a parte della miscela, indicata con BL+LB, mentre le particelle aventi dimensioni maggiori a quelle delle vie di passaggio del secondo argine 11 rimangono nel percorso principale 3, per confluire verso l'uscita 5 in una parte della miscela che risulta arricchita con tali particelle obiettivo, indicata con LB+BL.

Le vie di passaggio del fluido ausiliario LB dal percorso 8 al percorso 3 sono preferibilmente configurate, ad esempio in termini di dimensioni e/o orientamento, per far sì che il fluido ausiliario determini una pur minima deviazione o turbolenza nel flusso del primo fluido. Questo, in particolare, al fine di far transitare il primo fluido BL e/o le particelle in esso contenute in prossimità delle vie di passaggio del secondo argine 11, onde favorire una ottimale separazione. Le modalità di immissione o miscelazione del fluido ausiliario LB sono quindi preferibilmente tali da variare la direzione dei filetti del primo fluido BL che fluisce nel percorso principale - come evidenziato dalle piccole frecce nell'ambito del percorso principale 3 - al fine di evitare che in tale percorso 3 il flusso del primo fluido sia prevalentemente laminare o orientato nella sola direzione di flusso del percorso principale. I flussi nei percorsi 3 e 8 - e di conseguenza nel percorso 9 - sono di preferenza flussi continui, onde produrre continuamente perturbazioni del flusso nel percorso 3; detti flussi potrebbero tuttavia essere almeno in parte di tipo pulsato.

In sostanza, pertanto, in accordo alla metodologia di separazione o concentrazione qui proposta:

a) vengono previsti un primo, un secondo ed un terzo canale micro-fluidico 3, 8, 9, aventi almeno rispettive parti adiacenti tra loro, particolarmente adiacenti in lunghezza, con una detta almeno una parte del primo canale 3 che è delimitata lateralmente, rispetto ad una relativa detta almeno una parte del secondo canale 8 o del terzo canale 9, da un primo argine 10 o un secondo argine 11, rispettivamente, tali argini avendo rispettive vie di passaggio per collegare il secondo canale 8 al primo canale 3 ed

il terzo canale 9 al primo canale 3, rispettivamente,

b) nel primo canale 3 viene immesso un fluido biologico BL e nel secondo canale 8 viene immesso un fluido ausiliario LB, in modo tale per cui un flusso del fluido ausiliario LB in uscita dalle vie di passaggio del primo argine 10 formi, nel primo canale 3, una miscela LB+BL con il fluido biologico BL, con una prima frazione di questa miscela LB+BL che fluisce nel terzo canale 9 attraverso le vie di passaggio del secondo argine 11a e con una seconda frazione della miscela LB+BL che rimane nel primo canale 3. Almeno parte del fluido ausiliario LB in uscita dalle vie di passaggio del primo argine 10 è in particolare tale da ottenere almeno uno dei seguenti effetti:

- impartire al flusso che fluisce nel primo canale 3 e/o a particelle contenute in esso almeno una tra una componente di spinta o di movimento, una componente trasversale, una turbolenza, un moto irregolare;

- sollecitare particelle o aggregati di particelle aventi una dimensione inferiore ad una dimensione delle vie di passaggio del secondo argine 11 a passare nel terzo canale 9;

- sollecitare verso un'uscita 5 del primo canale 3 particelle o aggregati di particelle costituenti una sotto-popolazione di interesse.

Le modalità di ammissione dei fluidi nei canali 3 e 8 possono essere diverse, e comprendere ad esempio almeno una tra:

- immettere in modo continuo il fluido biologico ed il fluido ausiliario;
- immettere in modo pulsato il fluido biologico ed il fluido ausiliario;
- immettere in modo alternato il fluido biologico ed il fluido ausiliario;
- immettere in modo alternato il fluido biologico ed immettere in modo continuo il fluido ausiliario.

Va sottolineato che il sistema e la metodologia di micro-filtrazione o micro-separazione a flusso miscelato qui descritte non sono funzionalmente e costruttivamente equiparabili ai noti sistemi e metodi di filtrazione o separazione tangenziale, alcuni dei quali sono schematicamente illustrati in figura 2.

Nella parte A di figura 2 è visibile un primo tipico esempio di filtro tangenziale, in cui è previsto un primo canale CH1, nel quale è immesso il fluido Fin da trattare. Con CH2 è indicato un secondo canale, di scarico, separato dal canale CH1 mediante mezzi di filtrazione FM, costituiti da una parete provvista di vie di passaggio Fn. Nel canale

CH2 fluisce un flusso F_s , costituito da una porzione di scarto dello stesso fluido oggetto di analisi.

Il canale CH1 deve essere tipicamente molto stretto, al fine di far possibilmente transitare contro la parete filtrante FM tutto il fluido F_{in} , ed in modo da evitare il rischio che una porzione di fluido – indicata con FL - transiti in forma di flusso laminare in una zona distante dalla parete FM, quale la parete del canale CH1 opposta alla parete FM, determinando una ridotta capacità di filtrazione.

Per ridurre tale rischio, secondo una tecnica nota rappresentata nella parte B di figura 2, entrambe le pareti FM che delimitano lateralmente il canale CH1 possono essere configurate come mezzi di filtrazione tangenziale; in tale caso, quindi, sono previsti due canali di scarto CH2. Anche in una tale soluzione, tuttavia, è comunque necessario prevedere un canale CH1 molto stretto, al fine di evitare che si possano creare zone centrali di flusso laminare FL, con il conseguente rischio che una parte di fluido transiti dall'ingresso all'uscita del canale CH1 senza entrare in contatto con i mezzi di filtrazione FM, ovvero con il rischio di non trattare opportunamente tutto il fluido F_{in} .

Si consideri che, in tale tipologia di filtro microfluidico, la dinamica del fluido è regolata da fenomeni noti, quale il numero di Reynolds (Re), che sostanzialmente identifica dei rapporti tra talune grandezze del fluido e del dispositivo (ad esempio velocità e viscosità del fluido, sezione e/o misure del canale, eccetera). Per numeri $Re \leq 2000$ si considera tipicamente un flusso stabile o laminare, quale un flusso formato da lamine sottili che corrono in un verso parallelo alle pareti o alla direzione del canale. Per numeri $Re > 2000$ ma $Re < 3000$ si considera invece un regime di transizione, con un flusso in cui iniziano a formarsi delle piccole ondulazioni. Per numeri $Re \geq 3000$ si considera invece un regime turbolento, ovvero caratterizzato da un moto disordinato dei filetti del fluido.

Considerando un filtro tangenziale del tipo illustrato nella parte C di figura 2, sostanzialmente equivalente a quello della parte A ma con un condotto CH1 del fluido da trattare ben più largo, risulta evidente l'aumentato rischio di avere un flusso laminare FL che transita indisturbato tra l'ingresso e l'uscita, senza entrare in contatto con i mezzi di filtrazione FM, ovvero senza essere trattato. In tale configurazione, per evitare tale

inconveniente, viene tipicamente aumentata notevolmente la velocità del fluido, al fine di aumentare il detto Re ed ottenere un moto turbolento, il quale porterebbe tutto il fluido in contatto con i mezzi FM. Tale accorgimento dovrebbe tuttavia essere evitato nel trattamento di fluidi biologici, quale il sangue, in quanto l'aumento di velocità determina un immediato danneggiamento delle cellule a causa di fenomeni di lisi. Inoltre, per ottenere un tale aumento di velocità, a parità di sezione del canale CH1, andrebbe aumentata notevolmente la pressione del fluido F_{in} in ingresso: anche questo accorgimento è sconsigliabile in presenza di un fluido biologico, in quanto l'elevata pressione danneggerebbe le cellule presenti nel fluido.

Per tentare di ovviare al suddetto inconveniente sono stati proposti dispositivi di filtrazione tangenziale del tipo illustrato nella parte D di figura 2, provvisti di canali nei quali vengono realizzate consistenti alterazioni meccaniche del percorso del fluido F_{in} , ad esempio realizzando strozzature e/o allargamenti del percorso e/o inserendo rilievi RI che deviano il flusso. Anche detti accorgimenti non risultano tuttavia atti ad evitare gli inconvenienti sopra citati, in quanto determinano ostruzioni meccaniche e/o estese superfici contro cui impattano le cellule, o restringimenti in cui si determinano dei locali aumenti di velocità che comportano una lisi delle cellule. Si consideri a tale riguardo che esiste tipicamente l'esigenza di poter trattare quantità relativamente elevate di fluido (ad esempio 5 -10 ml) in tempi relativamente ridotti (ad esempio 15 - 30 minuti primi); in tal caso i suddetti restringimenti o alterazioni della sezione di passaggio determinano un rallentamento nel transito del fluido e quindi un maggior tempo di trattamento.

La parte E di figura 2 illustra un'altra tecnica nota utilizzata allo scopo di possibilmente far transitare tutto il fluido F_{in} a contatto con la parete filtrante FM, che sfrutta le forze centrifughe che si creano quando il fluido transita in un canale CH1 curvo, ad una velocità relativamente elevata. Anche in questo caso si deve osservare che la suddetta velocità elevata comporta il rischio di lisi, dovuta alle cellule che impattano contro le pareti. Per ottenere tale velocità elevata deve inoltre essere aumentata la pressione del fluido in ingresso F_{in} , con rischio di ulteriore danneggiamento delle cellule. Il percorso del fluido da trattare non può comunque avere una larghezza o sezione significativa, ovvero non consente di far transitare grandi portate di sangue: in caso contrario, con condotti molto larghi, la sola forza centrifuga non risulta sufficiente a far

spostare le particelle o i filetti di fluido sino al contatto con i mezzi filtranti FM.

A tale riguardo si consideri che nei circuiti microfluidici esistono tipicamente vincoli o difficoltà a realizzare canali relativamente profondi, a causa dei processi che tipicamente consentono di raggiungere profondità massime di decine o alcune centinaia di micron. Inoltre, atteso che gli elementi filtranti dovrebbero essere realizzati lungo le pareti laterali dei condotti, secondo l'arte nota un aumento della sezione di transito del condotto dovrebbe essere ottenuta principalmente allargando il condotto, con i conseguenti inconvenienti indicati, ovvero peggiorando la circolazione del fluido lungo le pareti filtranti, e quindi rendendo inefficiente o inefficace la filtrazione o separazione.

Come risulterà anche maggiormente chiaro in seguito, la metodologia di micro-filtrazione o micro-separazione a flusso miscelato proposta secondo la suddetta forma di attuazione preferenziale dell'invenzione, risolve i limiti sopra indicati della tecnica nota, consentendo un efficiente ed efficace trattamento di adeguate quantità del fluido oggetto di analisi, in tempi relativamente brevi, a pressioni modeste e con percorsi per il fluido di sezione relativamente ampia, e quindi con velocità del flusso parimenti ridotte, a tutto vantaggio della qualità della filtrazione e/o separazione, ivi compresa l'integrità delle particelle obiettivo.

Nelle figure 3, 3A e 3B è rappresentato un esempio di attuazione di un dispositivo microfluidico biomedicale secondo l'invenzione, sostanzialmente un dispositivo Lab on Chip (LOC) o Micro Total Analysis System (μ TAS), che è configurato per separare una sotto-popolazione di particelle da un fluido biologico. Il dispositivo in questione, indicato nel complesso con MD, è rappresentato in forma estremamente schematica, a mero scopo esemplificativo del suo principio di funzionamento, basato su di una struttura di micro-filtrazione del tipo qui definito a flusso miscelato. Il dispositivo MD è rappresentato senza un suo corpo superiore di chiusura, o coperchio, preferibilmente di materiale trasparente.

La struttura del dispositivo MD include una prima sezione 1, avente un primo corpo o corpo principale 2, ad esempio formato con almeno uno tra un materiale elastomero o siliconico, un materiale vetroso, un materiale semiconduttore: nel seguito, si supponga che il materiale in questione sia un materiale siliconico, ad esempio polidimetilsilossano (PDMS), e quindi almeno leggermente cedevole e/o preferibilmente

trasparente. Nel corpo 2 sono definiti - tramite tecniche di microlavorazione - vari elementi funzionali su scala nano-metrica o micro-metrica, comprendenti almeno mezzi di separazione o di filtraggio meccanico del fluido. Questi mezzi includono un primo canale microfluidico 3 definito nel corpo 2. Nel seguito, anche con riferimento ad altre forme di attuazione dell'invenzione, i canali previsti nei dispositivi microfluidico verranno indicati anche come condotti o percorsi.

In una forma di attuazione, almeno una porzione di ingresso del canale 3 ha una larghezza superiore a 100 micron, preferibilmente compresa tra 500 e 20000 micron. Preferibilmente la detta porzione di ingresso definisce almeno una via di passaggio atta a lasciar transitare almeno una tipologia di particelle bersaglio o di cellule tumorali.

In una forma di attuazione, almeno una porzione di uscita del canale 3 ha una larghezza superiore a 20 micron, preferibilmente compresa tra 20 e 100 micron. Preferibilmente la detta porzione di uscita definisce almeno una via di passaggio atta a lasciar transitare almeno una tipologia di particelle bersaglio o di cellule tumorali.

Secondo un'attuazione preferita, la forma o sezione trasversale del canale 3 è tale da lasciar transitare una quantità relativamente elevata di fluido, preferibilmente compresa tra 2 ml e 10 ml, in un tempo relativamente breve, preferibilmente compreso tra 10 e 30 minuti primi, particolarmente senza significativi aumenti di pressione e/o velocità del fluido, al fine di evitare fenomeni di lisi o danneggiamenti delle particelle o cellule.

Nel caso esemplificato, nel corpo 2 del dispositivo MD la suddetta porzione di ingresso definisce una via di passaggio o primo ingresso 4, per l'immissione di un fluido biologico, ovvero un primo fluido, nel canale o percorso 3, ed una porzione di uscita, definente una via di passaggio o prima uscita 5, per il rilascio dal percorso 3 di un campione di fluido arricchito nella sotto-popolazione di particelle obiettivo. Come si vede, il percorso 3 si estende in lunghezza tra la porzione comprensiva dell'ingresso 4 e la porzione comprensiva dell'uscita 5, per definire almeno una direzione di flusso.

In una forma di attuazione, almeno una porzione del canale 3 ha una profondità o altezza superiore a 20 micron, preferibilmente compresa tra 30 e 300 micron.

Preferibilmente la suddetta porzione di ingresso o l'almeno un primo ingresso 4 del canale 3 ha una profondità o altezza superiore a 20 micron, preferibilmente compresa

tra 30 e 100 micron, e la suddetta porzione di uscita o l'almeno una uscita 5 del canale 3 ha una profondità o altezza superiore a 30 micron, preferibilmente compresa tra 50 e 300 micron, in particolare al fine di consentire anche il transito di particelle bersaglio associate a bead in almeno una parte terminale del canale 3.

Nel seguito, si supponga che il fluido biologico sia sangue e che le particelle bersaglio siano taluni monociti M e/o cellule tumorali TC (figura 3A).

Il dispositivo MD include inoltre almeno un secondo ingresso 6, definito almeno in parte nel corpo 2, per l'immissione di un secondo liquido, ovvero un fluido ausiliario, destinato a miscelarsi con il primo fluido, ovvero il sangue, nel primo percorso 3. Nell'esempio non limitativo considerato il fluido ausiliario è un agente di buffer liquido LB, preferibilmente trasparente, ad esempio costituito da una soluzione fisiologica o salina, adempie alla funzione di diluire il sangue nel percorso 3 e/o ad agevolarne il deflusso e/o favorire la separazione di particelle. Il buffer può contenere un agente anticoagulante e/o altre sostanze atte allo scopo.

Il buffer ha di preferenza conducibilità o altre caratteristiche fisiche, chimiche ed elettriche predefinite anche in vista del funzionamento di disposizioni elettriche del dispositivo microfluidico, quale un conta-particelle, un dispositivo per l'allineamento di particelle, mezzi di separazione elettrici, eccetera.

Il dispositivo MD ha una seconda uscita 7, anch'essa definita almeno in parte nel corpo 2, per lo scarico di una frazione del sangue, in particolare una frazione arricchita in particelle diverse dalle particelle obiettivo, quali globuli rossi, piastrine e parte dei globuli bianchi (ovvero i globuli bianchi diversi dai globuli bianchi bersaglio). La suddetta frazione di sangue di scarico fa parte di una miscela includente anche il buffer.

In una forma di attuazione, basata sulla suddetta tecnica di filtrazione o separazione a flusso miscelato, il primo percorso 3 è almeno in parte definito nel corpo 2 tra un secondo ed un terzo canale o percorso microfluidico, indicati con 8 e 9, che sono in comunicazione di fluido con l'ingresso 6 e la seconda uscita 7, rispettivamente. I percorsi 8 e 9 sono sostanzialmente adiacenti, particolarmente adiacenti in lunghezza, ad almeno una parte significativa del percorso 3. Nell'esempio illustrato, il primo percorso 3 è delimitato lateralmente rispetto al secondo ed al terzo percorso 8 e 9 da almeno un primo ed un secondo elemento di separazione o argine, rispettivamente. I tre percorsi ed

i relativi argini sono quindi direttamente ricavati in o depositati su una medesima faccia del corpo 2, che definisce il fondo dei percorsi stessi. Di preferenza questi argini definiscono la dimensione minore della sezione trasversale del primo percorso 3.

In una forma di attuazione, almeno una porzione del canale o percorso 8 e/o del canale o percorso 9 ha una profondità o altezza superiore a 20 micron, preferibilmente compresa tra 30 e 30000 micron.

In una forma di attuazione, almeno una porzione del canale o percorso 8 e/o del canale o percorso 9 ha una larghezza superiore a 100 micron, preferibilmente compresa tra 200 e 50000 micron.

Il primo argine, indicato con 10, ha prime vie di passaggio 10a (figura 3A), che collegano il primo percorso 8 al secondo percorso 3: in tal modo, il buffer liquido LB può passare dal percorso 8 al percorso 3 e miscelarsi con il sangue, preferibilmente con una immissione di buffer graduale lungo il percorso 3, ovvero miscelandosi il buffer con il sangue in modo graduale o distribuito lungo l'intero percorso 3. Come visto precedentemente, tale miscelazione tra il fluido del percorso 8 (qui il buffer LB) con il fluido del percorso 3 (qui il sangue BL) costituisce una caratteristica inventiva alla base del funzionamento della micro-filtrazione a flusso miscelato; a tal fine, come si è visto, la suddetta miscelazione avviene preferibilmente in modo graduale e/o proporzionale e/o lungo almeno una parte del percorso 3. A tale scopo, le vie di passaggio 10a sono distribuite lungo almeno una parte sostanziale del percorso 3. Preferibilmente, quindi, il buffer liquido viene fatto penetrare lateralmente dal percorso 8 al percorso 3, tendendo ad attraversarlo nel senso della sua larghezza (ovvero nella dimensione o lato maggiore della sezione trasversale del percorso 3).

Il secondo argine, indicato con 11, ha seconde vie di passaggio 11a (figura 3A), che collegano il primo percorso 3 al terzo percorso 9. Preferibilmente, anche le seconde vie di passaggio 11a sono distribuite lungo una parte sostanziale del percorso 3. In tal modo, parte della miscela sangue-buffer può passare dal percorso 3 al percorso 9, per essere poi evacuata dall'uscita di scarico 7.

In una forma di attuazione, nel dispositivo microfluidico MD vengono inserite particelle funzionalizzate, quali bead, preferibilmente in forma dispersa o non aggregata, destinate ad aderire a particelle obiettivo. Le suddette bead sono destinate ad aggregarsi

o fissarsi alle particelle bersaglio all'interno del dispositivo microfluidico MD. Le bead BE, ovvero i ligandi che portano, hanno di preferenza affinità specifica con i bersagli, quali cellule, acidi nucleici, proteine o altre bio-molecole, dando luogo ad un aggregato di almeno una particella bersaglio ed almeno una particella funzionalizzata. Le bead BE impiegate secondo l'invenzione possono avere almeno una parte sensibile a campi elettrici applicati, così da consentirne una rapida ed efficace separazione dal resto della soluzione analizzata, unitamente alle particelle bersaglio. Preferibilmente le bead sono di tipo fluorescente o funzionalizzate al fine di consentire una agevole rilevazione, ad esempio di tipo ottico e/o elettrico.

A tale scopo, in una forma di attuazione, nel corpo 2 del dispositivo MD è previsto un ulteriore ingresso, indicato con 6', in comunicazione di fluido con un ulteriore percorso microfluidico indicato con 8'. Nell'esempio, anche l'ulteriore percorso 8' è adiacente in lunghezza al percorso 3 ed è delimitato rispetto ad esso tramite l'argine 10, preferibilmente con caratteristiche sostanzialmente equivalenti a quelle descritte in riferimento al percorso o condotto 8. Questo ulteriore percorso 8' è previsto per l'immissione dal relativo ingresso 6' di un ulteriore agente di buffer – che può essere analogo a quello già indicato – contenente bead BE, ovvero particelle funzionalizzate per aderire a particelle obiettivo, quali le cellule tumorali TC, onde ottenere aggregati di particelle. La figura 4A illustra a tale scopo un tale aggregato, nonché una bead BE in cui sono evidenziati schematicamente i rispettivi ligandi AB, particolarmente degli anticorpi AB.

Nell'esempio, i percorsi 8 e 8' sono tra loro distinti e provvisti ciascuno di un rispettivo ingresso 6 e 6': tuttavia tali due percorsi potrebbero essere sostituiti da un unico percorso che si estende in adiacenza al percorso 3, in un ingresso del quale può essere immesso indifferentemente un buffer privo di bead o un buffer contenente bead.

Preferibilmente, anche in vista dell'eventuale impiego di bead, il buffer impiegato è di tipo atto a non danneggiare i relativi legami funzionalizzati e/o gli anticorpi. Preferibilmente il buffer ha una conducibilità predefinita e caratteristiche tali da non danneggiare i detti legami funzionalizzati e/o anticorpi, in particolare ai fini della separazione e/o della rilevazione delle particelle.

Si noti che, secondo la tecnica nota usuale, le bead vengono aggiunte

preliminarmente ad un campione di sangue da analizzare, ovvero prima dell'immissione del sangue in un dispositivo microfluidico.

Nel caso di impiego di bead BE, le vie di passaggio 10a avranno preferibilmente almeno una dimensione caratteristica - quale la larghezza (sezione in orizzontale) o l'altezza (sezione in verticale) maggiore rispetto alla dimensione caratteristica o diametro delle bead.

Le vie di passaggio 11a hanno invece almeno una dimensione caratteristica - quale la larghezza o l'altezza - inferiore rispetto alla dimensione caratteristica o diametro delle particelle obiettivo, siano essi globuli bianchi, quali ad esempio dei monociti M alterati, cellule tumorali TC, o aggregati di particelle, costituiti ad esempio da bead BE e cellule tumorali TC. A mero titolo di esempio, si possono ad esempio verificare i seguenti casi di particelle obiettivo:

- cellule tumorali TC, quali cellule epiteliali tumorali, e/o globuli bianchi, quali monociti M, aventi dimensioni maggiori rispetto alla sezione di passaggio delle vie 11a;
- globuli bianchi alterati e/o cellule tumorali TC, quali cellule epiteliali tumorali, aventi dimensioni inferiori rispetto alla sezione di passaggio delle vie 11a, nel qual caso le bead BE ne accrescono le dimensioni oltre la suddetta sezione di passaggio.

Le bead BE impiegate ai fini dell'invenzione possono presentare caratteristiche elettriche, o una polarità elettrica, al fine di poter essere attratte e/o respinte elettricamente, in particolare ai fini di una loro separazione o spostamento elettrico, e quindi una separazione o spostamento delle particelle o cellule bersaglio TC attaccate a tali bead. Come si vedrà, le bead BE e/o relative cellule bersaglio TC possono essere spostate o separate tramite un campo elettrico, ad esempio generato tramite elettrodi. A tale fine, le bead BE possono vantaggiosamente essere di tipo anionico.

Come già precedentemente spiegato, in una forma di attuazione, le vie di passaggio 10a sono configurate per immettere il LB dal percorso 8 e/o 8' nel percorso 3 in modo tale da creare una pur minima deviazione o turbolenza nel fluido biologico che fluisce nel percorso 3, in particolare al fine di far transitare tutto il fluido e/o le particelle contenute in prossimità delle vie di passaggio 11a, ai fini di una ottimale separazione. L'immissione o miscelazione del buffer LB è preferibilmente atta a variare la direzione dei filetti di fluido biologico del percorso 3, al fine di evitare che nel percorso stesso il

flusso sia prevalentemente laminare o orientato nella sola direzione del percorso 3.

Ad esempio, in una forma di attuazione preferenziale, le vie di passaggio 10a e 11a, sono orientate secondo una direzione generalmente trasversale rispetto alla direzione del flusso della miscela sangue-buffer nel percorso 3, preferibilmente in modo tale per cui il buffer LB in uscita dalle vie di passaggio 10a dell'argine 10 impartisca al flusso stesso e/o a particelle in esso contenute una componente di spinta verso l'argine 11 opposto e/o verso l'uscita 5. In questo modo, le particelle o eventuali aggregati di particelle di dimensione inferiore alla suddetta dimensione caratteristica delle vie di passaggio 11a vengono sollecitate a passare nel percorso 9. Per converso, le particelle o gli aggregati di particelle aventi una dimensione maggiore alla suddetta dimensione caratteristica delle vie di passaggio 11a, che costituiscono una sotto-popolazione di particelle obiettivo, rimangono nel percorso 3, preferibilmente spinte dal buffer e/o dalla miscela sangue-buffer lungo il condotto 3, e/o verso l'uscita 5 che costituisce di per sé una zona di concentrazione delle particelle obiettivo.

Si noti a tal fine che le vie 10a sono preferibilmente distribuite lungo il percorso 3 e sono almeno in parte orientate in modo da avere ciascuna una direzione trasversale o angolata rispetto alla porzione del percorso 3 in cui la singola via 10a si immette. L'angolo tra la singola via 10a e la porzione di condotto 3 in cui tale via si immette è preferibilmente compreso tra 1° e 89° , in particolare compreso tra 5° e 45° .

Si consideri inoltre che il percorso 3 ha preferibilmente una sezione di passaggio che si restringe verso l'uscita, in particolare al fine di compensare la progressiva diminuzione di portata nel percorso 3, dovuta al fluido che fuoriesce dal percorso di scarico 9, e/o tale da agevolare il passaggio di parte della miscela presente nel percorso 3 verso le vie 11a, ovvero verso il percorso di scarico 9.

Si consideri altresì che le vie 11a e/o il terzo canale o percorso di scarico 9 sono preferibilmente conformati in modo tale da evitare un ritorno della miscela fluida o particelle di scarto dal percorso 9 al percorso 3, ovvero preferibilmente conformati in modo tale da agevolare il flusso di scarico verso l'uscita 7.

In una forma di attuazione preferita, il dispositivo MD include almeno un'unità o seconda sezione, per la raccolta o concentrazione del campione di particelle obiettivo, indicata nel complesso con 20, visibile nelle figure 3 e 3B.

Questa sezione ha un proprio corpo di involucro o di raccolta, indicato con 21. Il corpo di raccolta 21 può essere configurato come parte distinta opportunamente accoppiata, in particolare meccanicamente ed idraulicamente, al corpo principale 2, oppure può essere costituito da una porzione dello stesso corpo 2.

Il corpo 21 della sezione 20 definisce almeno una cavità 21a con almeno un ingresso 22, in comunicazione di fluido con l'uscita 5 del primo percorso 3. L'uscita del percorso 3 può - come nell'esempio - corrispondere all'ingresso 22 della sezione 20, e viceversa. Il corpo 21 ha inoltre un'uscita 23 di scarico, dove tra l'ingresso 22 e l'uscita 23 sono previsti mezzi di separazione o filtraggio 24, ovvero mezzi per trattenere all'interno della sezione 20 una sotto-popolazione di particelle obiettivo. Nell'esempio, i mezzi 24 constano essenzialmente di un filtro o vaglio, formato da una serie di barriere o ostacoli 25, che si elevano da un fondo della cavità 21a della sezione 21; in aggiunta e/o alternativa possono essere previsti altri mezzi di separazione, quali mezzi di separazione di tipo elettrico; ad esempio in forma di elettrodi per una elettroforesi o una di-elettroforesi (DEP) o per la già citata separazione tramite attrazione e/o repulsione elettrica delle bead BE. Nel caso illustrato, i mezzi 24 si estendono longitudinalmente sostanzialmente parallelamente alla direzione del flusso.

Gli ostacoli 25 definiscono tra loro vie di passaggio, indicate con 24a in figura 3B, aventi dimensione caratteristica minore rispetto alla dimensione caratteristica o diametro delle particelle obiettivo. In questo modo, le particelle obiettivo rimangono trattenute all'interno della sezione 20, nella sua parte a monte dei mezzi di separazione 24; almeno parte della soluzione sangue-buffer che penetra nel corpo 21 può defluire dall'uscita 23, con le eventuali particelle di non interesse in essa contenute.

Il fondo della cavità 21a può essere definito dal corpo 21 oppure da un elemento aggiuntivo, quale un substrato in vetro, plastica o in materiale semiconduttore, preferibilmente almeno in parte trasparente. In un tale caso, inferiormente al suddetto substrato può essere prevista e/o integrata una sorgente di illuminazione o un sensore ottico, atta ad irradiare le particelle obiettivo, per agevolarne l'analisi ottica; nel caso di un materiale semiconduttore, la sorgente d'illuminazione può essere almeno in parte integrata o associata a tale materiale semiconduttore.

Ovviamente nel dispositivo MD, ovvero nella sezione 1 e/o nella sezione 20,

possono essere previsti anche altri dispositivi elettrici, quali mezzi sensori e/o mezzi attuatori e/o mezzi di separazione elettrici, ad esempio realizzati con tecnologie MEMS (Micro Electro-Mechanical Systems) o NEMS (Nano Electro-Mechanical Systems), come risulterà in seguito: per tali casi, la sezione 20 può essere convenientemente provvista di mezzi di interconnessione elettrica. Come già accennato, in una forma di attuazione, almeno una parte della sezione 20, quale il suo fondo, può essere costituito da un substrato di materiale semiconduttore, ad esempio silicio. Un tale substrato può integrare, oltre che i mezzi 24, anche dispositivi realizzati con tecnologia MEMS o NEMS.

In una forma di attuazione il dispositivo, nella sezione 1 e/o nella sezione 20, comprende un sensore o un dispositivo - di seguito per brevità definito “*sensore di particelle*” o “*conta-particelle*” - configurato per la rilevazione e/o il conteggio di particelle, quali le particelle obiettivo.

Un tale conta-particelle può essere del tipo comprendente elettrodi, particolarmente posti lungo almeno una parte del percorso 3 e/o in sostanziale corrispondenza o prossimità dell'uscita 5 e/o di almeno parte della sezione 20, preferibilmente elettrodi in prossimità o a contatto con il fluido. In un forma di attuazione il conta-particelle comprende un circuito elettrico atto a rilevare variazioni o perturbazioni elettriche, quali variazioni di impedenza o di capacità, determinate dalla presenza o dal passaggio di particelle o cellule in prossimità di una parte attiva del circuito elettrico, rappresentata ad esempio da due elettrodi di rilevazione. Il conta-cellule può eventualmente essere di tipo ottico, ad esempio provvisto di un trasmettitore ed un ricevitore di radiazione luminosa, in particolare del tipo atto a rilevare una variazione ottica determinata dalla presenza o dal passaggio di almeno una cellula o particella. Il sensore di particelle potrebbe comunque essere di altro tipo e/o atto a rilevare anche altre grandezze, in particolare caratteristiche delle particelle, quali dimensione e/o forma.

Preferibilmente i mezzi del conta-particelle atti a rilevare il passaggio di particelle sono ubicati in una zona di transito o in un condotto di dimensioni capillari, indicativamente comprese tra 2 e 100 micron, in particolare comprese tra 10 e 50 micron, quale ad esempio la parte terminale del percorso 3 o l'uscita 5 e/o la porzione o

condotto d'ingresso della sezione 20; la previsione di un passaggio o condotto capillare può risultare utile per allineare o mettere in fila le particelle obiettivo, ai fini di agevolare la rilevazione.

In una forma di attuazione preferita, come rappresentata in figura 3, le vie di passaggio 10a e 11a sono sostanzialmente distribuite in modo continuo per almeno una parte significativa dell'intera lunghezza dei rispettivi argini 10 e 11.

Nell'esempio illustrato l'argine 10 è essenzialmente costituito da una serie di barriere o ostacoli, indicati con 12 in figura 3A, separati l'uno dall'altro dalle vie 10a. La forma degli ostacoli 12 può essere scelta in funzione della forma da assegnare alle vie 10a. Ad esempio, in una forma di attuazione particolarmente vantaggiosa, le vie di passaggio 10a hanno almeno un tratto terminale inclinato in modo tale per cui il buffer in uscita da tali vie impartisca al flusso nel primo percorso 3 una componente di spinta che ne agevola il deflusso verso la l'uscita 5. Preferibilmente, le vie di passaggio 10a hanno il suddetto tratto terminale inclinato in modo tale per cui il buffer in uscita da tali vie impartisca al flusso nel primo percorso 3 anche una componente di spinta e/o una componente trasversale e/o una turbolenza e/o un moto irregolare che ne agevoli almeno in parte il deflusso verso i mezzi di separazione inclusivi delle vie di passaggio 11a.

Un esempio di tale conformazione è ben visibile, ad esempio in figura 3A, in cui gli ostacoli 12 dell'argine 10 sono conformati in per definire un tratto terminale delle vie 10a che è almeno approssimativamente tangente, ovvero quasi parallelo o leggermente inclinato rispetto alla direzione principale del flusso nel percorso 3.

Preferibilmente, il percorso 3 è privo di ostacoli significativi, al fine di agevolare il deflusso del sangue dall'ingresso 4 verso l'uscita 5, pur con velocità e pressioni relativamente basse. Il dispositivo MD con micro-separazione a flusso miscelato è quindi preferibilmente atto a lasciar defluire il sangue in modo gentile e senza stress meccanici almeno nel percorso 3 e/o nei mezzi atti a separare e/o trattenere le particelle obiettivo.

Come detto, anche in caso di una larghezza relativamente elevata del percorso 3, le vie 10a del fluido di miscelazione, qui rappresentato dal buffer, riduce notevolmente il rischio di far transitare buona parte del fluido biologico dall'ingresso 4 verso l'uscita 5, senza che questi raggiunga i mezzi di separazione o vie 11a.

Anche l'argine 11, nell'esempio rappresentato, è costituito da una serie di

ostacoli, indicati con 13 in figura 3A, essenzialmente configurati come rilievi o appendici verticali, che definiscono tra loro le vie 11a. L'argine 11 può essere quindi configurato essenzialmente come una parete provvista di condotti o passaggi di sezione predefinita o calibrata.

In una forma di attuazione, almeno le vie di passaggio 11a comprendono più vie di passaggio differenziate tra loro per le dimensioni di sezione o larghezza, particolarmente con sezione crescente a partire dall'ingresso 4 verso l'uscita 5 del primo percorso 3, come ben visibile ad esempio nelle figure 3 e 3A.

La larghezza più o meno stretta delle vie 11a dell'argine 11 dipende dalla distanza tra gli ostacoli 13 in una direzione sostanzialmente parallela o inclinata rispetto al flusso del percorso 3.

A titolo meramente indicativo, la distanza tra gli ostacoli 13 di almeno un tratto del percorso 3, ovvero la larghezza di almeno alcune vie di passaggio 11a, può essere compresa tra i 2 e 8 μm ; per consentire l'uscita di globuli rossi quando orientati in orizzontale e/o quando orientati in verticale.

In una forma di attuazione, almeno l'argine 11 comprende più schiere di ostacoli 13 e/o di vie di passaggio 11a, di preferenza sostanzialmente paralleli tra loro, come ben visibile nelle figure 3 e 3A. Come detto, gli ostacoli 13 definiscono tra loro - in una direzione sostanzialmente parallela o inclinata al flusso del percorso 3 - le vie di passaggio 11a; tra le varie schiere di ostacoli 13 risultano invece definiti canali intermedi, uno dei quali indicato con 11b in figura 3A. L'argine 11 può in ogni caso comprendere una sola schiera di ostacoli 13, ovvero essere privo dei suddetti canali intermedi 11b.

Dalle figure 3 e 3A si nota altresì che, in una forma di attuazione, il numero delle schiere di ostacoli 13 è diverso in diverse porzioni dell'argine 11. Nell'esempio illustrato, l'argine 11 ha quattro porzioni (non indicate). Le prime tre porzioni a partire da sinistra (con riferimento alla figura) constano di tre schiere di ostacoli 13, mentre la porzione terminale, più prossima all'uscita 5, consta di due sole schiere di ostacoli 13. La distanza tra gli ostacoli 13 e tra le schiere di ostacoli delle varie porzioni è, nell'esempio, crescente a partire dall'ingresso 4 verso l'uscita 5.

Naturalmente le dimensioni degli ostacoli 12 e 13, delle vie di passaggio 10a e 11a, nonché le distanze tra gli ostacoli 12, 13 è scelta in funzione delle dimensioni delle

particelle obiettivo che debbono essere trattenute all'interno del percorso 3 e/o delle dimensioni atte a conferire una opportuna robustezza meccanica degli ostacoli (per conferire una maggior robustezza meccanica, gli ostacoli potrebbero ad esempio essere più larghi di quelli raffigurati, pur a parità di larghezza delle vie di passaggio, ovvero mantenendo la stessa distanza tra gli ostacoli).

Va ancora notato che è possibile prevedere argini 10 e/o 11 interessati solo in una loro parte da rispettive vie 10a e/o 11a, o argini 10 e/o 11 comprendenti gruppi di rispettive vie 10a e/o 11a distribuiti lungo il percorso 3, ma relativamente distanziati tra loro (ovverosia argini 10 e/o 11 che hanno, ad esempio, almeno una parte priva di vie interposta tra due parti provviste di vie); in attuazioni di questo tipo, il tratto o i tratti di un argine provvisti di vie di passaggio possono anche essere più o meno sfalsati rispetto al tratto o ai tratti dell'argine opposto provvisti di vie di passaggio e/o uno o più tratti di un argine provvisti di vie può avere sviluppo in lunghezza diverso rispetto ad uno o più tratti dell'argine opposto provvisti di vie.

Il funzionamento del dispositivo MD, per quanto attiene alla separazione delle particelle, è molto semplice ed avviene secondo il principio della separazione a flusso miscelato già in precedenza spiegato.

All'ingresso 4 viene addotto preferibilmente in modo continuo, o eventualmente in modo pulsato, un campione di fluido da analizzare, quale un campione di sangue già parzialmente diluito con una soluzione di buffer e/o un anticoagulante, preferibilmente con il fluido o sangue in leggera pressione. Parimenti, all'ingresso 6 viene adottato il buffer LB, preferibilmente in modo continuo, o eventualmente in modo pulsato, e preferibilmente con pressione leggermente maggiore a quella del sangue. Se previsto l'impiego di bead BE- come nell'esempio - anche all'ingresso 6' viene addotto il relativo buffer con bead, preferibilmente con pressione simile a quella del buffer immesso tramite l'ingresso 6.

Il buffer in uscita dalle vie 10a sollecita il flusso del fluido biologico nel percorso 3, in parte verso l'uscita 5 ed in parte verso l'argine 11. Come detto, in tal modo nel flusso del fluido biologico nel percorso 3 viene indotta una componente di spinta e/o una componente trasversale e/o una turbolenza e/o un moto irregolare del fluido stesso.

Eventualmente le forme e dimensioni delle vie 10a e/o la pressione del buffer

sono tali da indurre anche una componente di aspirazione del flusso del buffer in ingresso al canale 3, secondo effetto Venturi.

Il buffer in uscita dalle vie 10a sollecita il fluido biologico e le particelle contenute nel flusso del percorso 3 in parte verso l'argine 11, per far sì che particelle diverse da quelle obiettivo penetrino nelle vie 11a e passino nel percorso 9, ed in parte verso l'uscita 5, per far sì che particelle obiettivo arrivino a destinazione; in altri termini, il buffer sollecita le particelle e/o il fluido del percorso 3 in modo tale da farli transitare in prossimità dei mezzi di separazione rappresentati dalle vie 11a.

Il fatto che la sezione delle vie di passaggio 11a sia crescente lungo lo sviluppo del percorso 3 ha come conseguenza che - tendenzialmente - dal flusso in transito nel percorso 3 verranno dapprima evacuate le particelle di dimensioni più piccole e, man mano che si avanza nel percorso 3, verranno evacuate particelle di dimensioni sempre più grandi, ma comunque di dimensioni inferiori a quelle delle particelle obiettivo.

La parte residua della soluzione sangue-buffer non eliminata tramite l'uscita 7 raggiunge l'interno della sezione 20. Questa parte residua è evidentemente arricchita in particelle obiettivo, pur potendo contenere ancora particelle che non sono di interesse. La parte preponderante della soluzione fuoriesce quindi dall'uscita 23 della sezione 20, portando con sé le particelle non trattenute dai mezzi di separazione 24, particolarmente aventi dimensioni più piccole rispetto a quelle definite dalle vie di passaggio 24a; le particelle obiettivo rimangono invece trattenute all'interno della sezione 20, grazie ai mezzi di separazione 24. Questo campione arricchito nella sotto-popolazione di particelle obiettivo può essere in seguito sottoposto ad analisi, secondo tecniche di per sé note, anche senza dover estrarre le particelle dal dispositivo (ad esempio per un'analisi di tipo ottico).

Come in precedenza accennato, i canali o percorsi 3, 8 e 9 sono formati in una medesima faccia del corpo 2, che ne definisce anche i relativi fondi. In una forma di attuazione, almeno uno dei percorsi suddetti ha almeno due tratti di differente profondità.

La figura 3C illustra una tale variante in relazione al primo percorso 3 ed al terzo percorso 9. In tale figura si nota in particolare come una porzione terminale del fondo dei due percorsi in questione sia ribassata, rispetto ad una relativa porzione di fondo a

monte. Questo tratto di fondo ribassato o a profondità accresciuta, sostanzialmente in comune tra i due percorsi 3 e 9, è indicato con 14; la sua profondità è preferibilmente superiore a 30 micron, molto preferibilmente di almeno 100 micron.

Questa misura riduce il rischio di intasamenti del dispositivo, in considerazione del fatto che, nel tratto terminale del percorso 3, il flusso in transito presenta un concentrazione accresciuta di particelle di dimensioni maggiori: in tale zona confluiscono infatti le bead BE, le quali tendono ad attaccarsi alle cellule o particelle bersaglio TC, aumentandone le dimensioni.

Inoltre, più aggregati di particelle - ad esempio ciascuno comprendente una cellula tumorale TC e più bead - potrebbero attaccarsi tra loro, tramite una o più bead che fungono da “ponte”, come esemplificato in figura 4B: in tale situazione si può determinare la formazione di una sorta di grumo, con il conseguente intasamento del dispositivo. La maggiore sezione di passaggio determinata dalla presenza del tratto di profondità accresciuta o fondo ribassato 14 consente di limitare i rischi di intasamento, rendendo possibile il deflusso di grumi ed evitando l'accumulo di particelle. Per evitare la formazione di grumi anche lungo il percorso è vantaggioso, come nel caso rappresentato in figura 1, iniettare le bead in una parte terminale del percorso 3.

Da notare che la porzione a profondità accresciuta 14 corrisponde di preferenza ad una porzione provvista di vie 11a a larghezza maggiore, quali vie 11a aventi larghezza uguale o superiore a 10 micron. Questo comporta il vantaggio di poter utilizzare uno stampo più robusto, quale uno stampo con rilievi più robusti, quali dei rilievi corrispondenti alle dette vie 11a, ovvero dei rilievi dello stampo aventi dimensioni corrispondenti alla larghezza e profondità delle vie 11a (quindi rilievi dello stampo con altezza superiore a 30 micron, ma anche con larghezza uguale o superiore a 10 micron). Ad una maggior altezza dei rilievi dello stampo corrisponde una maggior larghezza, e quindi una maggior robustezza, evitando il rischio di danneggiamenti dello stampo nelle fasi di stampaggio del corpo del dispositivo.

Come si è visto, secondo una forma di attuazione, il dispositivo MD è configurato per consentire l'immissione e/o transito di bead BE, e prevede allo scopo un relativo ingresso 6' dedicato a questo scopo. Come detto, comunque, le bead BE possono essere immesse all'interno del dispositivo MD sfruttando l'ingresso 6 del buffer,

e pertanto la previsione di un ingresso 6' ed un condotto 8' dedicati non è indispensabile. Si apprezzerà altresì che le bead BE - così come il buffer che costituisce il fluido ausiliario - vengono immesse nel dispositivo MD separatamente dal flusso immesso nel primo percorso 3, qui il flusso del sangue, preferibilmente disperse in un altro flusso, qui il flusso del buffer, e che esse si legano a particelle o cellule bersaglio all'interno del dispositivo MD. Come detto, inoltre, il dispositivo MD e le bead BE possono essere configurati in modo tale per cui le bead possano essere soggette a forze di attrazione o repulsione, mediante campi elettrici, a fini di separazione di particelle.

Secondo un aspetto autonomamente inventivo, le bead BE possono essere utilizzate al fine di migliorare la miscelazione e/o l'agitazione del fluido, quale il sangue che fluisce nel percorso 3. Ad esempio le bead BE possono essere sottoposte a forze di attrazione o repulsione, atte a determinarne spostamenti nel fluido, con conseguente agitazione o turbolenza nel fluido stesso, il che - come detto - agevola la separazione. Si noti che le bead finalizzate ad un tale impiego possono anche essere prive di ligandi o anticorpi.

Nelle figure 5-11 è rappresentato in forma schematica un dispositivo microfluidico biomedicale secondo l'invenzione, di configurazione generale leggermente diversa rispetto a quello delle figure 3, 3A, 3B, 3C, ma basato sul medesimo principio della separazione a flusso miscelato, di tipo continuo o pulsato; nelle figure 5-11 sono quindi impiegati i medesimi numeri di riferimento delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli già descritti. In queste figure 5-11 non è rappresentata la sezione di raccolta in comunicazione con l'uscita 5, e non sono parimenti rappresentati organi di raccordo agli ingressi ed uscite del dispositivo.

Come visibile ad esempio in figura 5, in questo dispositivo i tre percorsi 3, 8 e 9, così come i relativi argini 10 e 11, hanno andamento sostanzialmente rettilineo, come nella forma di attuazione delle figure 3, 3A, 3B, 3C. Anche in questo caso i percorsi e gli argini sono formati in una medesima faccia del corpo 2. Nel caso specifico, in corrispondenza di tale faccia, il corpo 2 presenta una regione generalmente incavata, delimitata lateralmente da due pareti 2a, e nell'ambito di tale regione incavata sono definiti i percorsi 3, 8 e 9 con i relativi argini 10 e 11.

In figura 5 sono indicate con 3a, 8a e 9a le superfici di fondo dei percorsi 3, 8 e

9. In una possibile forma di attuazione il fondo 8a, 9a di almeno uno tra il secondo ed il terzo percorso 8, 9 ha almeno un tratto ribassato rispetto al fondo 3a del percorso 3; almeno una porzione del condotto 8 e/o 9 può avere ad esempio una profondità o altezza superiore a 100 micron, quale una altezza compresa tra 500 micron e 30000 micron.

La figura 5 evidenzia il caso specifico in cui entrambi i fondi 8a e 9a sono ribassati, per il loro intero sviluppo, rispetto al fondo 3a, con i percorsi 8 e 9 che sono quindi più profondi rispetto al percorso 3. Questa misura consente di accrescere la portata del fluido di buffer e del fluido di scarico, mantenendo al contempo una larghezza contenuta per il dispositivo.

Nell'esempio, i percorsi 8 e 9 hanno profondità costante: tuttavia nulla vieta di avere una profondità variabile, ad esempio un percorso 8 per il buffer con profondità maggiore verso l'ingresso 6 e profondità minore verso l'estremità opposta, e/o un percorso 9 di scarico con profondità maggiore verso l'uscita 7 e profondità minore verso l'estremità opposta.

In una forma di attuazione, almeno una porzione longitudinale del primo percorso 3 ha sezione trasversale decrescente ed è adiacente in lunghezza ad almeno una tra una porzione longitudinale con sezione trasversale decrescente del secondo percorso 8 e una porzione longitudinale con sezione trasversale crescente del terzo percorso 9. La figura 5 evidenzia il caso specifico di un percorso 3 che ha sezione trasversale decrescente per il suo intero sviluppo, di un percorso 8 con sezione trasversale decrescente per il suo intero sviluppo e di un terzo percorso 9 con sezione trasversale crescente per il suo intero sviluppo.

Questa forma, che deve intendersi alternativa o complementare a quella relativa al ribassamento dei fondi 8a e 9a, risulta utile per una migliore distribuzione dei flussi e/o delle relative pressioni. Molto schematicamente, la particolare forma decrescente del percorso 8 tende a garantire una ottimale portata e/o pressione in tutte le prime vie di passaggio 10a; anche la particolare forma decrescente del percorso 3 tende a garantire una ottimale portata e/o pressione in tutte le seconde vie di passaggio 11a. La forma crescente del percorso 9 tende invece ad agevolare il deflusso delle sostanze di scarico e/o ad evitare anomale distribuzioni o aumenti delle pressione in uscita.

La forma del percorso 9 potrebbe tuttavia essere diversa, nell'ottica di agevolare il deflusso delle sostanze di scarico ed evitare anomale distribuzioni o aumenti della pressione in uscita, in particolare per evitare un ritorno di fluido dal percorso 9 al percorso 3.

Si consideri che, preferibilmente, almeno i percorsi 3 e 9 sono atti a consentire il mantenimento di una pressione nel percorso 3 leggermente superiore alla pressione del condotto di scarico 9, in particolare al fine di avere una differenza di pressione minima, ovvero tale da non indurre un danneggiamento delle cellule o particelle, pur evitando un ritorno di fluido dal percorso 9 verso il percorso 3: questo è reso possibile utilizzando il sistema a micro-separazione con flusso miscelato che, come già detto, consente l'utilizzo di basse pressioni di fluido.

La forma decrescente o che si restringe del percorso 3 si presta inoltre alla citata integrazione di un conta-particelle o sensore di particelle, ovvero alla definizione di opportuni condotti capillari, preferibilmente nel tratto in prossimità dell'uscita 5 o corrispondente ad essa.

Ancora in figura 5, con 11₁, 11₂, 11₃ e 11₄ sono indicate diverse porzioni dell'argine 11, ciascuna contraddistinta da una diversa sezione delle rispettive vie di passaggio 11a e/o da un diverso numero di schiere di ostacoli 13 (si vedano anche le figure 7-9).

Come in precedenza spiegato, infatti l'argine 11, o sue porzioni, possono essere formate da più schiere di ostacoli 13. Nel caso rappresentato nelle figure 5-11, ad esempio, le porzioni di argine indicate con 11₁, 11₂ e 11₃ (figura 7) e 11₄ (figura 11) constano rispettivamente di quattro, tre, due ed una schiera di ostacoli 13, potendo tuttavia ogni porzione di argine 11₁, 11₂, 11₃ e 11₄ comprendere anche una sola schiera di ostacoli 13. Come detto, inoltre, la sezione delle vie di passaggio 11a può essere decrescente a partire dall'ingresso 3 verso l'uscita 5 del percorso 3.

In una forma di attuazione, almeno una prima porzione di argine, ad esempio la porzione 11₁, definisce rispettive vie di passaggio 11a, aventi una sezione calibrata di larghezza preferibilmente compresa tra 2 e 8 micron, dove in particolare detta prima porzione di argine si estende per almeno 1/3 della lunghezza dell'intero condotto 3 del fluido; preferibilmente detta prima porzione di argine definisce rispettive vie di passaggio

11a atte a lasciar transitare dei globuli rossi o eritrociti.

In una forma di attuazione, almeno una seconda porzione di argine, ad esempio una delle porzioni 11₂-11₄, definisce rispettive vie di passaggio 11a, aventi una sezione calibrata di larghezza preferibilmente compresa tra 2,1 e 25 micron, particolarmente compresa tra 3 e 13 micron. Preferibilmente la detta seconda porzione di argine definisce rispettive vie di passaggio 11a atte a lasciar transitare almeno una tipologia di globuli bianchi o leucociti.

In una forma di attuazione, almeno una terza porzione di argine, ad esempio una delle porzioni 11₃-11₄, definisce rispettive vie di passaggio 11a, aventi una sezione calibrata di larghezza preferibilmente superiore a 5 micron, particolarmente compresa tra 6 e 25 micron. Preferibilmente la detta terza porzione di argine definisce rispettive vie di passaggio 11a, 5 atte a lasciar transitare almeno una tipologia di particelle bersaglio o di cellule tumorali.

In figura 9 sono anche ben visibili i canali intermedi 11b definiti tra varie schiere di ostacoli 13. La presenza di canali intermedi 11a può risultare utile per riportare nel percorso 3 eventuali particelle di interesse che hanno oltrepassato accidentalmente le prima schiera di ostacoli 13, ma non la o le successive schiere.

Sempre in figura 9 si nota come, in una forma di attuazione, ostacoli 13 dell'argine 11 possano avere un profilo laterale che si assottiglia dal primo percorso 3 verso il terzo percorso 9. In questo modo, le vie 11a hanno una forma generalmente svasata o divergente verso il canale 9, e questa misura riduce il rischio di adesione di particelle, ovvero il rischio di intasamento. In tale forma di attuazione si osserva che gli ostacoli 13 dell'argine 11 possano avere una forma sostanzialmente trapezoidale, ovvero delle pareti laterali tra loro inclinate, in particolare al fine di realizzare vie 11a aventi una sezione variabile. Preferibilmente le seconde vie di passaggio 11a presentano una prima sezione d'ingresso, sostanzialmente rivolta verso il percorso 3, avente una sezione predefinita o calibrata, al fine di determinare il passaggio o meno di determinate particelle o cellule presenti nel fluido; l'estremità opposta di tali seconde vie di passaggio 11a, ovvero la l'estremità rivolta verso il canale di scarico 9, presenta invece una sezione maggiore, in particolare al fine di agevolare il deflusso delle particelle verso lo scarico e/o evitare rischi di intasamento delle vie 11a. Le vie di passaggio 11a presentano

preferibilmente un profilo o spigoli arrotondati almeno nella suddetta prima sezione d'ingresso, sostanzialmente rivolta verso il percorso 3, in particolare al fine di evitare il danneggiamento delle cellule o particelle che circolano nel percorso stesso 3.

In figura 6 è visibile parzialmente un corpo superiore di chiusura o coperchio 26 del dispositivo MD, destinato a delimitare superiormente i percorsi 3, 8 e 9. Nell'esempio illustrato il coperchio è sostanzialmente planare, preferibilmente formato con un materiale trasparente, ad esempio una plastica o vetro, ed è applicato a tenuta, ad esempio tramite incollaggio o saldatura, sulla superficie superiore delle pareti 2a (figura 6). In una forma di attuazione non illustrata, il coperchio 26 può essere di tipo apribile o asportabile.

In una forma di attuazione, almeno uno tra gli argini 10 e 11 integra elementi di tenuta, destinato a cooperare con il coperchio 26. Vantaggiosamente almeno alcuni di questi mezzi di tenuta sono ricavati integrali con gli argini 10 e 11, più in particolare, con gli ostacoli 12 e 13 che li costituiscono. Preferibilmente, i citati mezzi di tenuta sono realizzati con forma o materiale almeno in parte cedevole o atto a deformarsi. Sempre preferibilmente, almeno parte del corpo del dispositivo secondo l'invenzione, ad esempio almeno gli argini 10 e 11 e/o i suddetti di detti mezzi di tenuta, sono realizzati in materiale elastico o in elastomero, quale un silicone o un PDMS (polidimetilsilossano) o un polisilossano; in particolare, i suddetti mezzi di tenuta sono di pezzo o integrati con almeno parte del corpo del dispositivo e/o realizzati con lo stesso materiale, preferibilmente integrati o di pezzo con gli argini 10 e 11.

In figura 9 si nota come, in una forma di attuazione, gli ostacoli 13 siano provvisti superiormente di appendici 13a, preferibilmente aventi spessore progressivamente decrescente, quale una sezione sostanzialmente triangolare o trapezoidale o semicircolare, ovvero aventi forma atta a realizzare rispettivi labbri di tenuta a deformazione predefinita, destinati a cooperare con la superficie interna del coperchio 26. Similmente, come visibile in figura 10, negli ostacoli 12 che costituiscono l'argine 10 possono essere ricavati integrali rispettivi labbri superiori 12a, preferibilmente a deformazione predefinita, in particolare aventi spessore progressivamente decrescente, quale una sezione sostanzialmente triangolare o trapezoidale o semicircolare, destinati a cooperare in tenuta con il coperchio 26.

I labbri o rilievi di tenuta 12a e 13a hanno preferibilmente una forma tale da poter essere stampata con movimenti dello stampo in un unico verso, ovvero senza sottosquadro, che è preferibilmente lo stesso verso di stampaggio degli argini 10 e 11 e/o del corpo 2. Gli elementi di tenuta 12a garantiscono che il flusso del fluido di buffer venga orientato nel verso voluto, evitando trafile laterali.

Gli ostacoli 12 e 13 hanno preferibilmente sezione trasversale o dimensioni superiori a quelle degli elementi di tenuta 12a e 13a, in particolare al fine di consentire la suddetta deformazione calibrata degli elementi di tenuta 12a, 13a senza determinare una significativa deformazione dei rispettivi ostacoli 12, 13, e così evitare alterazioni o deformazioni delle vie di passaggio calibrate 10a e/o 11a. Ne consegue che, anche a fronte di sollecitazioni e deformazioni di una parte dei suddetti ostacoli, quale la porzione superiore di tenuta in essi integrata, rimane comunque integra la larghezza calibrata delle vie di passaggio, ed in particolare delle vie di passaggio 11a. Come si può notare ad esempio in figura 9, ciascun elemento di tenuta 13a si estende tra due vie di passaggio 11a adiacenti e comprende due bordi laterali di estremità sostanzialmente coincidenti con le pareti delle vie 11a definite dagli ostacoli 13; i bordi laterali di due elementi 13a adiacenti sono tra loro di preferenza distanziati similmente agli ostacoli 13; durante la deformazione in compressione degli elementi di tenuta 13a, i suddetti bordi laterali potrebbero deformarsi, ma la sezione di passaggio calibrata delle vie 11a rimane comunque garantita grazie al corpo principale dei sottostanti ostacoli 13, i quali hanno struttura tale da non lasciarsi deformare nel corso della suddetta compressione.

Nell'esempio delle figure 5 - 11 gli elementi di tenuta 13a sono sostanzialmente orientati nel verso del percorso 3, ovvero sono sostanzialmente trasversali alle vie di passaggio 11a; similmente, gli elementi di tenuta 12a sono almeno in parte sostanzialmente orientati nel verso del percorso 3 e/o del percorso 8, ed in parte affiancati alle vie di passaggio 10a, preferibilmente estendendosi almeno lungo un lato di buona parte della rispettiva via di passaggio 10a.

Elementi di tenuta di realizzazione simile a quelli precedentemente descritti sono di preferenza presenti anche in altre parti del dispositivo, quale il perimetro esterno del corpo 2 o il perimetro dei vari canali o percorsi, preferibilmente ricavati di pezzo o integrati nel corpo 2 della sezione 1. Anche questi ulteriori elementi di tenuta sono

configurati per evitare trafile di fluido verso l'esterno del dispositivo e/o tra i differenti percorsi. Elementi di questo tipo, configurati di preferenza come labbri o rilievi di tenuta, sono indicati con SM ad esempio nelle figure 8 e 9.

In una forma di attuazione preferita, particolarmente in un dispositivo con struttura di separazione a flusso miscelato, le sezioni di passaggio dei percorsi 3, 8 e 9 e delle vie 10a e 11a sono dimensionate in modo tale per cui:

- a parità di pressione, la portata del fluido del percorso 8 sia maggiore della somma delle portate individuali delle vie di passaggio 10a, e/o

- a parità di pressione, la somma delle portate individuali delle vie di passaggio 10a sia maggiore rispetto alla somma delle portate individuali delle vie di passaggio 11a, e/o

- a parità di pressione, la somma delle portate individuali delle vie di passaggio 10a e della portata del fluido nel percorso 3 sia maggiore rispetto alla somma delle portate individuali delle vie di passaggio 11a.

Per chiarire questo concetto, le figure 12-14 illustrano porzioni già evidenziate del dispositivo MD delle figure 5-11, con l'ulteriore indicazione di alcune delle sezioni di passaggio di interesse. In particolare, in tali figure, S_s indica la sezione del percorso 3, S_b indica la sezione del percorso 8, S_{b_1} , S_{b_2} , S_{b_3} ... indicano le sezioni delle vie di passaggio 10a; S_u indica la sezione del percorso 9 e S_{s_1} , S_{s_2} , S_{s_3} ... indicano le sezioni delle vie di passaggio 11a.

Al fine di evitare riflussi dal percorso 3 verso il percorso 8, ovvero per garantire una portata uniforme nelle vie 10a, è preferibile che la sezione del percorso 8 sia maggiore della sommatoria delle sezioni delle vie 10a, ossia: $S_b > S_{b_1} + S_{b_2} + S_{b_3} + \dots S_{b_n}$

Parimenti, al fine di evitare riflussi dal percorso 9 al percorso 3, ovvero per garantire una portata uniforme nelle vie 11a, è preferibile che la somma della sezione del percorso-3 e delle-vie 10a sia maggiore rispetto alla sommatoria delle sezioni delle vie 11a, ossia $(S_s + (S_{b_1} + S_{b_2} + S_{b_3} + \dots S_{b_n})) > S_{s_1} + S_{s_2} + S_{s_3} + \dots S_{s_n}$

Queste considerazioni valgono in generale a parità di pressione, atteso che in questo caso ciò che incide è la sezione dei percorsi e delle vie di passaggio: formule analoghe a quelle indicate sono peraltro riferibili anche alle portate dei percorsi e delle

vie di passaggio.

Di preferenza, comunque, la pressione (P_8) nel percorso 8 sarà leggermente maggiore della pressione (P_3) nel percorso 3, la quale a sua volta sarà leggermente superiore alla pressione P_9 nel percorso 9 di scarico, ossia: $P_8 > P_3 > P_9$. In tal modo è possibile evitare che fluido presente nel percorso 3 possa rifluire nel percorso 8 e, allo stesso modo, evitare che fluido presente nel percorso 9 possa rifluire nel percorso 3. Dette formule o condizioni preferenziali sono preferibilmente riferibili anche porzioni o sezioni del dispositivo descritto, quali ad esempio una prima metà o una seconda metà del dispositivo; questo viene in particolare ottenuto tramite l'utilizzo delle dette dimensioni variabili dei percorsi e vie.

La figura 15 si riferisce ad una forma di attuazione in cui il corpo 2 è interposto tra un coperchio 26 ed un corpo inferiore 30. La presenza del corpo inferiore 30 può risultare utile per irrigidire il dispositivo nel suo complesso - particolarmente quando il corpo 2 è di materiale siliconico o di altro elastomero - e conferire una precisa planarità per esigenze di tenuta. Il corpo 30 è di preferenza formato con un materiale relativamente rigido, quale un materiale plastico, un materiale metallico, una vetroresina, un materiale ceramico, eccetera.

In una forma di attuazione, al corpo inferiore 30 sono associati almeno due elettrodi, e particolarmente un catodo 31 ed un anodo 32, tramite i quali è possibile applicare un campo elettrico al fluido che fluisce nel percorso 3, atto ad indurre uno spostamento di particelle del sangue e/o di bead BE presenti nel flusso. Gli elettrodi 31, 32, che nel caso esemplificato sono rettilinei, possono essere impiegati ad esempio per facilitare lo spostamento di particelle dal percorso 3 al percorso 9 tramite tecniche di elettroforesi di tipo isolato (senza contatto con il fluido) o di elettroforesi o della citata attrazione e/o repulsione di bead BE, quali bead BE associate a particelle o cellule TC. Come detto, un'attrazione o repulsione di bead, realizzata tramite opportuni mezzi di eccitazione, può essere anche impiegata per indurre agitazioni o turbolenze finalizzate a migliorare lo spostamento del fluido verso l'argine 11 provvisto delle vie di passaggio 11a.

Nella forma di attuazione illustrata, nella condizione assemblata dei corpi 2 e 30, gli elettrodi 31 e 32 si trovano in sostanziale corrispondenza degli argini 10 e 11,

rispettivamente; preferibilmente, gli elettrodi si estendono paralleli agli argini, ma con l'elettrodo 32 giacente al di sotto del fondo 3a del percorso-3 e l'elettrodo 31 giacente al di sotto di almeno parte del fondo del percorso 9.

Si noti che gli elettrodi potrebbero interessare solo parte del percorso 3 e del percorso 9, ad esempio una sua porzione terminale. Eventualmente, elettrodi per elettroforesi o dielettroforesi o separazione di bead BE potrebbero essere previsti nella sezione di raccolta 20.

Nelle figure 16-19 è rappresentato in forma schematica un dispositivo microfluidico biomedicale secondo l'invenzione, di configurazione generale simile a quello delle figure 5-11 e provvisto della sezione di raccolta 20; anche nelle figure 16-19 sono quindi impiegati i medesimi numeri di riferimento delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli già descritti.

Dalle figure 16 e 17 si nota come, in una forma di attuazione, il coperchio 26 può includere una rispettiva porzione 26a che funge da chiusura superiore anche per la sezione di raccolta; in tale attuazione, il corpo del coperchio 26 è preferibilmente realizzato in materiale trasparente, quale vetro o plastica rigida trasparente. Si noti che il coperchio 26a può essere anche configurato come parte distinta rispetto al coperchio 26, eventualmente di tipo apribile o asportabile, ad esempio per il prelievo di particelle obiettivo e/o per inserire nella sezione 20 un terreno di coltura.

In una forma di attuazione, il corpo 2 ha una prima ed una seconda faccia, definenti uno spessore del corpo stesso, ed almeno uno tra gli ingressi e le uscite del dispositivo include un condotto che si estende tra le due facce suddette prima. Le figure 16 e 17 rappresentano il caso specifico in cui l'ingresso 4, l'almeno un ingresso 6, 6' e l'almeno una uscita 7 sono configurati come fori o condotti passanti del corpo 2, che si aprono all'estremità superiore rispettivamente in corrispondenza del fondo 3a, 8a e 9a dei percorsi 3, 8 e 9. Nel caso specifico, inoltre, anche l'uscita 23 della sezione 20 include un simile foro o condotto passante formato nel corpo di raccolta 21. Nella realizzazione esemplificata, inoltre, i suddetti ingressi e/o uscite sono in comunicazione con relativi attacchi o raccordi idraulici 4b, 6b, 23b che possono essere convenientemente formati integrali con il corpo 2 e/o 21; anche l'uscita 7 è convenientemente collegata ad un analogo raccordo, non visibile in figura.

La presenza dei raccordi suddetti, preferibilmente in posizione inferiore, consente di agevolare il collegamento del dispositivo MD, ad esempio su di un apparecchio di laboratorio atto a far circolare i fluidi e/o analizzare le particelle obiettivo nella sezione 21, nonché di contenere gli ingombri laterali del dispositivo stesso.

Nella realizzazione delle figure 16 e 17 sono previste pareti di estremità 2a' (vedere figura 17) che chiudono alle estremità longitudinali i percorsi 3, 8 e 9.

In una forma di attuazione, sono previsti più ingressi 6, 6' per il liquido di buffer, posizionati in punti diversi lungo lo sviluppo del relativo percorso 8. La figura 17 illustra il caso specifico di tre ingressi lungo il percorso, dei quali un ingresso 6 nella sua zona iniziale, un ingresso 6 nella sua zona intermedia ed un ingresso 6' nella sua zona terminale. Una tale misura risulta utile nel caso di un percorso 8 relativamente stretto, poco profondo e lungo, ovvero con sezione ridotta, al fine di garantire una portata uniforme del buffer nel percorso stesso e per evitare zone di depressione o portata non uniforme, che potrebbero causare eventuali reflussi di sangue nel percorso 8. La figura 17 illustra inoltre il caso di un percorso 8 per il buffer avente sezione sostanzialmente costante. Come in precedenza spiegato, è inoltre preferibile l'immissione di buffer contenente bead in un tratto terminale del percorso 3, e da qui il posizionamento dell'ingresso 6' nel tratto terminale del percorso 8 di figura 17; in tale configurazione, dagli ingressi 6 potrebbe essere immesso del buffer mentre dall'ingresso 6' potrebbe essere immesso un buffer addizionato con bead.

Nelle figure 18 e 19 è visibile in maggiore dettaglio la sezione di raccolta 20, con la relativa zona di collegamento al percorso 3. In questo caso i mezzi di separazione meccanica 24 si estendono sostanzialmente ortogonali al flusso. Anche in tale realizzazione gli ostacoli 25 integrano di preferenza elementi di tenuta in forma di labbri o rilievi superiori, aventi funzioni simili ai labbri precedentemente indicati con 12a e 13a; sono inoltre visibili tratti di elementi o labbri del tipo già precedentemente indicato con SM.

Nelle figure 20-28 è rappresentato in forma schematica un altro dispositivo microfluidico biomedicale secondo l'invenzione, avente un layout dei relativi percorsi diverso rispetto alle forme di attuazione delle figure precedenti, ma basato comunque sul medesimo principio di funzionamento; anche nelle figure 20-28 sono impiegati i

medesimi numeri di riferimento delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli già descritti.

Anche in questa forma di attuazione la sezione 1 del dispositivo comprende di preferenza un corpo principale 2, in cui sono definiti i percorsi microfluidici, nonché un coperchio 26. Il dispositivo MD comprende una sezione di raccolta 20, con il relativo corpo 21 integrale al corpo 2 o configurato come parte distinta rispetto ad esso. Similmente, il coperchio 26a della sezione 20 può essere costituito da una porzione del coperchio 26 o essere distinto rispetto ad esso.

In una forma di attuazione, il primo percorso 3, il secondo percorso 8 ed il terzo percorso 9 hanno andamento almeno in parte sostanzialmente spiraliforme o avvolto su sé stesso, o comunque preferibilmente sviluppantesi almeno in parte con un andamento curvo; tale forma o andamento dei percorsi è principalmente finalizzato a contenere gli ingombri del dispositivo.

La figura 22 illustra una tale configurazione, dove i percorsi in questione sono definiti su di una faccia del corpo 2, con gli ingressi 4, 6 e l'uscita 7 che includono un condotto o foro passante tra le due facce del corpo 2. Similmente, l'uscita 23 include un foro passante del corpo 21 della sezione 20. Anche in questa forma di attuazione sono previsti gli attacchi o raccordi idraulici inferiori 4b, 6b, 23b, che possono essere convenientemente formati integrali con il corpo 2 e/o 21. Nelle figure 20-22 è anche visibile un analogo raccordo 7b, in comunicazione con l'uscita 7.

In una forma di attuazione, inoltre, i tre percorsi 3, 8 e 9 hanno un tratto principale sostanzialmente spiraliforme o avvolto su sé stesso, o almeno in parte ricurvo, ed almeno uno di essi ha un tratto sostanzialmente rettilineo; anche tale forma o andamento dei percorsi è essenzialmente previsto per contenere gli ingombri del dispositivo.

Questo caso specifico è illustrato in figura 22, in cui tutti e tre i percorsi hanno almeno un rispettivo tratto sostanzialmente rettilineo, in corrispondenza delle relative porzioni iniziali e/o terminali.

Con riferimento ad una forma di attuazione preferita, il primo ingresso 4, per il sangue, ed il secondo ingresso 6, per il buffer, sono ubicati in una regione del corpo 2 attorno alla quale il primo, il secondo ed il terzo condotto 3, 8 e 9 si sviluppano a spirale,

ovvero sono avvolti lungo un percorso curvo, preferibilmente avvolti più volte su se stessi. Come si nota, l'esempio di realizzazione di figura 22 presenta anche tale caratteristica preferenziale, che consente di semplificare e ridurre le dimensioni del dispositivo MD nel suo complesso, in particolare consentendo di ridurre gli ingombri di percorsi relativamente lunghi, pur mantenendo un andamento relativamente costante lungo l'intero percorso. Si consideri però che i percorsi del dispositivo secondo l'invenzione potrebbero anche avere anche un andamento differente, pur atto a ridurre gli ingombri, quale un andamento sostanzialmente a "S", oppure un andamento avvolto lungo un percorso sostanzialmente quadrato o rettangolare, preferibilmente con angoli arrotondati; in tal caso si avrebbe un andamento dei percorsi con rispettive alternanze di tratti rettilinei e tratti curvi.

Va sottolineato che nei dispositivi qui considerati l'andamento curvo o a spirale dei percorsi non è sfruttato per indurre fenomeni di separazione per forza centrifuga: come precedentemente spiegato, infatti, nel caso della presente invenzione sono preferibilmente adottati flussi a bassa velocità, per evitare di danneggiare le particelle.

Il dispositivo secondo l'invenzione prevede di preferenza percorsi relativamente lunghi: in particolare, una lunghezza preferita dei percorsi 3, 8, 9 corrisponde ad almeno 50 volte la larghezza media del percorso 3; molto preferibilmente la lunghezza dei percorsi 3, 8, 9 è superiore a 200 volte la larghezza media del percorso 3.

In altre forme di attuazione, sempre con andamento dei percorsi a spirale o avvolti, gli ingressi dei fluidi, quali gli ingressi 4 e/o 6, possono essere ricavati perifericamente alla spirale (ad esempio in posizioni simili a quelle delle uscite 5 e 7 di figura 22), mentre le relative uscite, quali le uscite 5 e/o 7 possono essere ricavate nella regione centrale della spirale (ad esempio in posizioni simili a quelle degli ingressi 3 e 4 di figura 22). In tale ottica è anche possibile prevedere una configurazione con l'ingresso 6 o 6' del buffer "contrapposto" all'ingresso 4 del sangue, ovvero con un ingresso 4 al centro della spirale ed un ingresso 6 o 6' sul perimetro esterno.

Nei dettagli di cui alle figure 23-26 sono ben visibili i vari percorsi, dove il percorso 3 è adiacente in lunghezza ai percorsi 8 e 9 ed è delimitato lateralmente rispetto ad essi tramite gli argini 10 e 11, con le relative vie di passaggio 10a e 11a e gli ostacoli 12 e 13. In questa attuazione, sono previste pareti 2a" che delimitano lateralmente il

complesso dei tre percorsi e che hanno sviluppo in massima parte spiraliforme. Anche le pareti 2a'' possono essere provviste superiormente di elementi o labbri di tenuta avente funzioni simili a quelli precedentemente indicati con SM.

Dalla figura 25 si nota in particolare come il percorso 8 del buffer risulti delimitato in lunghezza tra una parete 2a'' e l'argine 10, mentre il percorso di scarico 9 risulti delimitato in lunghezza tra l'argine 11 ed una parete 2a'' avvolta a spirale.

Anche in questa forma di attuazione le sezioni dei vari percorsi sono preferibilmente variabili, ed in particolare con le sezioni trasversali dei percorsi 3 e 8 che si restringono a partire dall'ingresso 4 verso l'uscita 5, mentre la sezione trasversale del percorso 9 si allarga progressivamente.

Nell'esempio non limitativo illustrato è raffigurata una configurazione a spirale con andamento uniforme, ovvero con larghezza totale costante data dall'insieme dei tre percorsi 3, 8, 9; in possibili forme di attuazione non raffigurate, tuttavia, possono essere previsti avvolgimenti a spirale di differente tipologia, particolarmente con andamento non uniforme, ad esempio simile ad una spirale iperbolica o logaritmica, o come nel caso in cui vengano avvolti a spirale percorsi con sezioni variabili (tipo i percorsi 3, 8 e 9 di un dispositivo del tipo di figura 17, dove non è costante la larghezza totale della somma dei percorsi 3, 8 e 9, che infatti aumenta dall'estremità avente ingresso 4 verso l'estremità avente l'uscita 5).

La distanza tra agli ostacoli 13 può essere similmente crescente, per definire vie di passaggio 11a di sezione crescente, dall'ingresso 4 verso l'uscita 5

La soluzione con percorsi avvolti a spirale consente di contenere le dimensioni del dispositivo MD garantendo la contempo la presenza di percorsi sufficientemente lunghi per il trattamento (ovvero consente, anche a partita di dimensioni rispetto ad un corpo configurato come nelle figure da 3 a 19, di disporre di percorsi 3, 8 e 9 decisamente più lunghi).

L'andamento almeno in parte curvo dei percorsi tende a mantenere le particelle più grandi lungo il percorso 3, evitando di essere spinte eccessivamente verso l'argine 11, con il rischio di piantarsi nelle vie 11a. Infatti, l'andamento almeno in parte curvo dei percorsi, unitamente al fatto che gli ostacoli 12 dell'argine 10 sono conformati per definire un tratto terminale delle vie 10a che è almeno approssimativamente tangente o

leggermente inclinato rispetto alla direzione principale del flusso nel percorso 3, consente di imprimere alle particelle una spinta in una direzione che è preferibilmente sostanzialmente tangente all'argine 11, agevolando quindi il deflusso delle particelle più grandi lungo il condotto 3, pur in prossimità delle vie 11a, come schematizzato in figura 26, dove si osserva che il buffer LB che esce dai condotti 10a, tende a spingere le particelle verso l'argine 11, pur con un verso sostanzialmente tangente o molto inclinato rispetto a questi.

Con questa configurazione, talune particelle (più piccole) hanno maggior facilità a defluire in quelle vie 11a aventi larghezza tale da lasciarle transitare, mentre altre particelle (più grandi) hanno altrettante facilità nel proseguire entro il percorso 3, mantenute lungo i tratti dell'argine 11 provvisti di vie 11a di larghezza inferiore alle precedenti, potendo in tal modo defluire più agevolmente lungo il percorso 3 verso l'uscita 5.

A tal fine si consideri che, nell'esempio di attuazione esemplificato, le vie 11a sono sostanzialmente rivolte verso l'interno della spirale, ovvero il flusso contenente le particelle o cellule da scartare si muove dal canale 3 verso il canale 9 con una direzione sostanzialmente dall'esterno verso l'interno della spirale, e quindi in contrasto ad una forza centrifuga. A tale scopo, nell'attuazione esemplificata, i flussi hanno preferibilmente una velocità tale da evitare o contenere effetti dovuti a forze centrifughe. Come negli esempi precedenti, le particelle e/o il flusso del primo fluido (sangue) nel canale 3 è soggetto all'azione del fluido ausiliario (buffer) del canale 8, il quale imparte al flusso nel canale 3 anche una componente di spinta e/o una componente trasversale e/o una turbolenza e/o un moto irregolare, che ne agevola almeno in parte il deflusso o transito verso i mezzi di separazione rappresentati dalle vie di passaggio 11a.

Nelle figure 27-29 è visibile la regione di unione tra il corpo 2 ed il corpo 21. In figura 29 si nota in particolare come, in una forma di attuazione, sia il percorso 3 del sangue che il percorso 8 del buffer siano in comunicazione con l'ingresso 22 della sezione 20 di raccolta; in questa figura si nota inoltre come l'argine 10 ed il percorso 8 si possano estendere sino all'interno della sezione 20. In questo modo, il buffer può essere impiegato per migliorare la movimentazione del flusso di sangue e/o delle particelle obiettivo anche ai fini del filtraggio o separazione finale, tramite i mezzi di separazione

24, del sangue che giunge nella sezione 20 attraverso il percorso 3. In figura 27 si può inoltre osservare una porzione terminale del percorso 3 avente una sezione di passaggio capillare, in particolare al fine di migliorare il deflusso delle cellule o particelle obiettivo e/o poter meglio implementare gli eventuali mezzi di rilevazione delle particelle, quale un conta-particelle e/o un dispositivo per allineare o spostare le particelle.

Le figure 30 e 31 sono viste prospettiche di un corpo 2 secondo una variante del dispositivo delle figure 20-29. La variante in questione è essenzialmente contraddistinta dalla presenza dell'ingresso 6' per un buffer contenente bead, come precedentemente descritto con riferimento a forme di attuazione precedenti. In questo caso, anche l'ingresso 6' è configurato essenzialmente come condotto o foro passante tra le due facce principali del corpo 2, con un relativo raccordo idraulico 6b'. Si nota, in particolare dalla figura 31, come in questo caso anche il percorso 8' per il buffer contenente le bead abbia un tratto iniziale sostanzialmente rettilineo, un tratto ricurvo adiacente in lunghezza al percorso 3 del sangue ed un tratto finale nuovamente rettilineo, che si estende sino all'interno della sezione di raccolta 20. Il percorso 8, del solo buffer, termina sostanzialmente in corrispondenza del suddetto tratto iniziale rettilineo del percorso 8'; in particolare, il flusso di buffer nel percorso 8' è sostanzialmente la continuazione del flusso di buffer nel percorso 8, ovvero i due flussi di buffer nei percorsi 8 e 8' sono tra loro in serie o continui, al fine di mantenere un flusso o azione o spinta uniforme sul flusso di liquido o particelle nel percorso 3.

Nelle figure 32-34 è rappresentato in forma schematica un altro esempio di dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, di configurazione sostanzialmente simile a quella dei dispositivi delle figure 20-29 e 30-31.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 è configurata come elemento separabile dal corpo 2 in cui è definito il percorso 3.

Come già accennato, il corpo 21 della sezione 20 può essere configurato come componente distinto rispetto al corpo 2, accoppiato meccanicamente ed idraulicamente ad esso in modo separabile, oppure essere costituito da una porzione del corpo 22, che è formata integrale con una seconda porzione del corpo 22.

Il dispositivo MD delle figure 32-34 è realizzato in accordo al secondo caso citato, con il corpo 22 che è predisposto per consentire la separazione tra le due suddette

porzioni di corpo, particolarmente tramite rottura o taglio.

Dalle figure in questione si nota come, nell'esempio raffigurato, la regione "I" di interfaccia o unione tra la porzione principale del corpo 22 e la sua porzione ausiliaria che definisce il corpo 21 della sezione 20, presenta mezzi 2b di indebolimento, o di pre-rottura, quali un assottigliamento o una linea di frattura predeterminata. Nell'esempio raffigurato sono previsti simili mezzi di indebolimento 2b, quali un assottigliamento o una linea di frattura, anche nella regione di interfaccia o unione tra il corpo del coperchio 26 e la sua porzione che definisce il coperchio 26a della sezione di raccolta 20.

In questo modo, come si intuisce, l'intera sezione 20 può essere agevolmente separata dal resto del corpo 2 e del coperchio 26, ad esempio tramite rottura o taglio, particolarmente a fini di successivo impiego in attività di analisi o di laboratorio, quale un impiego su di una apparecchiatura di analisi (ad esempio un microscopio o un sistema di rilevazione ottica), oppure per una coltura delle cellule obiettivo separate. Questa misura o struttura quindi, oltre a semplificare la realizzazione del dispositivo, ne agevola l'impiego pratico.

In una forma di attuazione il corpo 2 e/o la sezione di raccolta 20 hanno condotti capillari o di sezione ridotta nella zona di taglio o rottura, i quali condotti possono essere chiusi meccanicamente tramite una deformazione del materiale del corpo 2 o 21, ad esempio realizzato in materiale termoplastico. Nella suddetta zona questi condotti possono ad esempio essere configurati per schiacciarsi o deformarsi a seguito del taglio o della rottura, onde chiudere sostanzialmente i condotti stessi, oppure ridurre la luce di passaggio, formando una sorta di menisco, e così evitare delle perdite per mezzo dell'adesione tra le molecole del fluido e quelle del materiale costituente il corpo 2 o 21.

In una forma di attuazione, il dispositivo microfluidico secondo l'invenzione comprende mezzi di identificazione. Questi mezzi di identificazione possono ad esempio essere apposti sul corpo principale 2, o sul corpo 21 della sezione 20, o ancora sui relativi coperchi 25 e/o 25a, o sul corpo inferiore 30 (figura 15), ad esempio in forma di etichette oppure stampati con idoneo inchiostro, oppure formati integralmente in tali corpi e/o coperchi. La figura 35 si riferisce a questo secondo caso ed in essa è visibile una porzione del corpo 2 in cui è integralmente definito un codice a barre BC. Un simile codice può essere previsto, come detto, anche nel corpo 21 e/o nel coperchio 26 e/o nel

coperchio 26a.

Il codice a barre può essere ottenuto ad esempio tramite stampaggio, deformazione o incisione su almeno una parte del corpo del dispositivo MD, quale il corpo 2, il corpo 21, il coperchio 26, il coperchio 26a. In questo caso il codice BC è ottenibile ricavando incavi e/o rilievi sulla suddetta parte di corpo, dove ogni incavo e/o rilievo ha forma corrispondente ad una relativa barra del codice BC.

In una forma di attuazione, il corpo di interesse ha, in corrispondenza di una barra del codice BC, uno spessore ridotto rispetto allo spessore di zone adiacenti alle barre, in modo tale per cui il materiale che realizza le barre può essere più facilmente attraversato da un raggio ottico (si determinano in sostanza zone trasparenti o meno al raggio ottico), ai fini della rilevazione del codice BC. In un'altra realizzazione gli incavi e/o i rilievi vengono resi riflettenti, ad esempio tramite vernice riflettente o inserti metallici, oppure vengono colorati e resi opachi, rispetto alle zone adiacenti del corpo di interesse, che potrebbero invece essere trasparenti o riflettenti.

In altre forme di attuazione, i mezzi di identificazione possono comprendere un dispositivo elettronico provvisto di mezzi di memoria, quale un dispositivo RFID, in particolare un dispositivo atto a ricevere e trasmettere segnali e/o dati senza fili o *wireless*, del tipo comprendente almeno un'antenna e/o un opportuno circuito elettronico (un esempio di tale attuazione verrà in seguito descritto con riferimento alla figura 77).

A prescindere dall'implementazione pratica, in una forma di attuazione, i mezzi di identificazione contengono dati o parametri di calibrazione di una apparecchiatura di analisi, sulla quale il dispositivo MD o la sezione 20 vengono impiegati, quali dati o parametri predefiniti in fase di produzione del dispositivo secondo l'invenzione, in particolare atti a consentire il riconoscimento del dispositivo e/o atti a fornire informazioni all'apparecchiatura di analisi.

In aggiunta o in alternativa, i mezzi di identificazione possono essere di tipo atto a consentire la modifica dei suddetti dati o parametri durante almeno una fase del ciclo di utilizzo del dispositivo, ad esempio tramite scrittura di dati in una memoria del dispositivo, ed in particolare possono contenere informazioni identificative del soggetto a cui appartiene il fluido biologico e/o del tipo di campione di fluido e/o del tipo di analisi a cui il campione deve essere sottoposto.

I mezzi di identificazione possono quindi servire per identificare il dispositivo MD in base al tipo di misura per cui è predisposto: in tale ottica l'apparecchiatura di analisi può essere vantaggiosamente configurata per rilevare automaticamente le informazioni identificative, a fini di auto-calibrazione e/o per preselezionare automaticamente il funzionamento dell'apparecchiatura in base al tipo di dispositivo MD (considerando il fatto che potrebbero esistere più tipologie di dispositivi MD, ad esempio ottimizzate in termini di forma in base al tipo di cellula da selezionare). Un tale sistema di identificazione consente anche al sistema di controllo dell'apparecchiatura di analisi di segnalare un eventuale errato montaggio di un dispositivo MD, ad esempio non corrispondente al tipo di processo selezionato sull'apparecchiatura, come nel caso di un test selezionato dall'utente tramite un programma su Personal Computer non corrispondente al tipo di dispositivo montato sullo strumento di analisi.

Nelle figure 36-39 è rappresentato in forma schematica un altro esempio di dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, di configurazione sostanzialmente simile a quella dei dispositivi delle figure 20-29 e 20-31, particolarmente un dispositivo con struttura di separazione a flusso miscelato; anche in queste figure vengono utilizzati i medesimi numeri di riferimento già sopra impiegati, per indicare elementi tecnicamente equivalenti.

Secondo la forma di attuazione delle figure 36-39 (in cui non è stato rappresentato il coperchio del dispositivo), il corpo 2 ha una sagoma sostanzialmente circolare. La sezione di raccolta 20 è inoltre direttamente integrata nel corpo 2.

Questa configurazione del corpo 2, che potrebbe comunque avere forma diversa dalla forma circolare, consente di inserire il dispositivo, eventualmente privato del relativo coperchio, in supporti standard di analisi impiegati nel settore bio-tecnologico, quali in particolare supporti del tipo identificati con il nome "piastre Petri" e simili, aventi tipicamente sagoma cilindrica. In alternativa, il dispositivo secondo l'invenzione può essere conformato in modo da poter essere alloggiato in dispositivi o supporti aventi altra forma, quali delle piastre o piatti Petri di altro tipo, ad esempio di forma squadrata. Secondo una variante preferenziale, quindi, almeno una parte del dispositivo secondo l'invenzione può avere forma analoga o congruente a supporti standard di analisi impiegati nel settore bio-tecnologico, quali in particolare supporti del tipo identificati

con il nome “piastre Petri” e simili.

Questa misura consente di agevolare talune operazioni, quali operazioni di analisi impiegando apparecchiature standard già predisposte per i suddetti supporti, quali dispositivi di visione ottica (microscopi), o operazioni di immagazzinamento, ad esempio utilizzando apparati già predisposti per detti supporti.

Tale configurazione può risultare particolarmente vantaggiosa anche ai fini dell’eventuale impiego del dispositivo MD per la realizzazione di colture di cellule: in tale caso il dispositivo sarà provvisto, preferibilmente in corrispondenza della sua sezione 20, di un ingresso o attacco per l’immissione di un terreno di coltura, nonché almeno un condotto di aerazione, non raffigurati.

Nel caso in cui sia necessaria un’apertura di aerazione, questa sarà preferibilmente dotata di mezzi di tenuta che, pur garantendo il passaggio di aria, si oppongano all’infiltrazione di sostanze estranee, quali batteri. Questi mezzi di tenuta possono includere una membrana a porosità calibrata permeabile all’aria, ad esempio in Goretex® o simili materiali microporosi. Come risulterà in seguito, inoltre, il dispositivo secondo l’invenzione può essere provvisto di mezzi valvolari tra il corpo 2 e la sezione 20, e tali mezzi valvolari possono essere vantaggiosamente sfruttati per l’immissione del suddetto terreno di coltura. Il dispositivo secondo l’invenzione può essere provvisto anche di mezzi valvolari sugli ingressi del corpo 2, e tali mezzi valvolari possono essere vantaggiosamente sfruttati per evitare reflussi e/o per consentire l’immissione di fluidi - anche in modo pulsato e/o alternato- senza reflussi dal corpo 2.

La figura 36 illustra il caso di dispositivo MD provvisto di ingresso 6’ e percorso 8’ per un buffer contenente bead, ma tali elementi potrebbero naturalmente essere omessi, in quanto non essenziali.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 comprende un tratto terminale del percorso 3, definito nel corpo principale 2. Questa caratteristica è inclusa, ad esempio, nel dispositivo di figura 36 ed è visibile particolarmente nei dettagli di cui alle figure 37-39. In una tale attuazione, la sezione 20 non è separabile o distinta dal corpo 2, ma risulta comunque utile, sia quando prevista in dispositivi di configurazione circolare (ad esempio per il posizionamento in piastre Petri), o anche in dispositivi di altra forma (ad esempio rettangolare), per un più agevole posizionamento su strumenti di

analisi, quali un microscopio.

In particolare dalla figura 39 si evince come, anche in questo caso, il percorso 3 sfoci all'interno della sezione di raccolta 20, con l'argine 10 ed il percorso 8 che si estendono all'interno della sezione stessa.

In una forma di attuazione, o comunque secondo un aspetto autonomamente inventivo, almeno una porzione della sezione di raccolta 20 è conformata in modo tale da convogliare le cellule o particelle bersaglio in una zona ristretta e/o predefinita, in particolare al fine di migliorarne la concentrazione e/o agevolarne l'identificazione. A tale fine, riferendosi ad esempio alla figura 38, con 24b è indicata una tale zona di raccolta delle particelle bersaglio che, in questo esempio, è rappresentata da una porzione terminale o ristretta definita tra l'elemento di separazione 24 e la parete laterale 2a". Come si vede, la suddetta zona di raccolta può essere definita mediante una disposizione inclinata dei mezzi di separazione 24 rispetto alla direzione principale del flusso e/o ad una parete laterale della sezione di raccolta, preferibilmente a definire sostanzialmente un angolo acuto.

Nelle figure 40-45 è illustrato un ulteriore dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, particolarmente con struttura a flusso miscelato; anche in tali figure sono impiegati i numeri di riferimento delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli in precedenza già descritti.

In questa versione di dispositivo, e come ben visibile nelle figura 40 e 41, il corpo 2 è interposto tra un corpo superiore di chiusura o coperchio 26 ed un corpo inferiore di supporto 30. Il corpo 2 ha configurazione generale simile a quella del dispositivo MD di figura 36, per quanto ciò non sia indispensabile.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 è montata o almeno parzialmente integrata nel corpo inferiore 30, con il corpo inferiore 30 che è eventualmente separabile dal corpo 2. La figura 42 si riferisce in modo specifico al primo caso citato, in cui il corpo 21 della sezione 20 - formato ad esempio in materia plastica - è montato sul corpo inferiore 30, particolarmente ma non necessariamente in modo separabile. Si apprezzerà comunque che il corpo 21 può anche essere definito integralmente nel corpo inferiore 30, ad esempio anch'esso realizzato in materiale plastico o in vetroresina. Nell'esempio non limitativo illustrato, il corpo inferiore 30 è

provvisto di fori, nei quali sono destinati ad essere inseriti passanti rispettivi raccordi inferiori di ingresso o uscita del corpo 2. Questi fori passanti sono indicati in figura 42 con 4c, 6c, 6c' e 7c, rispettivamente per i raccordi indicati con 4b, 6b, 6b' e 7b in figura 41.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 risulta operativamente accoppiata alla faccia inferiore del corpo 2 e l'uscita 5 del percorso 3 include un passaggio o foro passante del corpo stesso. In una forma di attuazione, il corpo 2 definisce un alloggiamento in cui la sezione di raccolta 20 è almeno parzialmente ricevuta.

Il dispositivo MD delle figure 40-45 include entrambe queste caratteristiche, come ad esempio ben visibile in figura 44, dove con 5 è indicato il foro passante del corpo 2 che realizza l'uscita del percorso 3, mentre con 33 è indicato un alloggiamento in cui è atto ad essere ricevuta, particolarmente ma non necessariamente in modo asportabile, parte del corpo 21 della sezione di raccolta. In questa realizzazione la sezione 20 non necessita di un rispettivo coperchio. In questa realizzazione, l'uscita 5 sfocia in corrispondenza dell'alloggiamento 33.

La sezione di raccolta 20 è qui configurata come parte distinta sia rispetto al corpo 2, sia rispetto al corpo inferiore 30 e presenta un rispettivo corpo di raccolta 21. Il fondo della cavità 21a del corpo 20, integrante i mezzi di separazione 24, può essere formato integralmente dal corpo 21 o, come nel caso raffigurato, essere costituito da un rispettivo substrato 40, ad esempio in vetro o in materiale semiconduttore, sul quale sono definiti i mezzi 24. Nel caso di impiego di un materiale semiconduttore, nel suddetto substrato possono essere integrati dispositivi elettrici e/o elettronici e/o elettromeccanici, quali ad esempio mezzi di illuminazione, mezzi sensori ottici, elettrodi per elettroforesi o separazione di particelle o cellule, elettrodi per l'attrazione e/o repulsione di bead BE, elettrodi per rilevazione e/o il conteggio e/o l'allineamento di particelle o cellule, elettrovalvole e/o pompe elettriche miniaturizzate, eccetera, preferibilmente realizzati con tecnologia MEMS o NEMS; nel caso di un substrato in vetro, dispositivi elettrici e/o elettronici possono essere posizionati nel corpo 21 al di sotto del suddetto substrato. Nel caso in cui la sezione 20 includa anche mezzi sensori per l'analisi del campione di particelle obiettivo, come precedentemente accennato, non è

indispensabile prevedere la possibilità di rimozione della sezione 20 dalla sezione 1.

In una forma di attuazione, quale quella rappresentata nelle figure 40-45, la sezione 20 è provvista di un rispettivo raccordo inferiore di uscita. Questo raccordo di uscita, che è preferibilmente formato integrale con il corpo 21, è ben visibile in figura 45, dove è indicato con 23b, ed è in comunicazione di fluido con l'uscita 23 della sezione 20. Nel caso in cui il corpo 21 della sezione 20 sia definito integralmente nel corpo inferiore 30, anche il raccordo 23b sarà di preferenza ricavato in un pezzo unico con il corpo inferiore. Inoltre, nel caso in cui il fondo recante i mezzi di separazione 24 sia configurato come substrato a parte rispetto al corpo 21, tale substrato sarà provvisto di un idoneo passaggio o foro passante, per lo scarico del fluido in eccesso dal campione di particelle obiettivo, con tale foro che si troverà in corrispondenza, o comunque in comunicazione di fluido, con l'uscita 23 formata nel corpo 21.

Come si intuisce, particolarmente dalle figure 41 e 42, nella condizione assemblata del dispositivo, il corpo 21 della sezione 20 è accoppiato al corpo inferiore 30 con il raccordo di uscita 23b della sezione 20 che è innestato passante nel foro indicato con 7c (figure 41 e 42) del corpo 30, mentre la parte superiore del corpo 21 è ricevuta almeno in parte nell'alloggiamento 33 (vedere in particolare figure 43 e 44).

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 è meccanicamente ed idraulicamente accoppiata al corpo 2. Tale caratteristica è ad esempio presente nel caso del dispositivo MD delle figure 40-45, in cui l'alloggiamento 33 consente di realizzare sia un collegamento idraulico che meccanico del corpo 21 al corpo 2. In una realizzazione preferita, come detto, il corpo 2 è formato con un materiale almeno leggermente elastico, quale un materiale siliconico, e questo agevola il preciso accoppiamento a tenuta della sezione 20 al corpo 2; ovviamente nulla vieta di prevedere specifici mezzi di tenuta, ad esempio una o più guarnizioni, che operano lungo la periferia del corpo 21 in corrispondenza della sua parte operativamente inserita nell'alloggiamento 33.

Nella configurazione assemblata (vedere figura 43), la sezione 20 risulta disposta inferiormente al foro di uscita 5 del percorso 3; si noti che, come in precedenza spiegato, nel foro 5 può eventualmente confluire anche il condotto 8 o 8' del buffer. In particolare, al di sotto di tale foro 5 si troverà la porzione della sezione 21 che è a monte dei mezzi

di separazione 24.

In una forma di attuazione, sul corpo inferiore 30 sono montati componenti elettrici e/o elettronici. Questo è ad esempio il caso del dispositivo delle figure 40-45, in cui oltre alla sezione 20, sul corpo inferiore 20 sono montati componenti elettrici, comprendenti gli elettrodi 31, 32 per realizzare una dielettroforesi in corrispondenza di almeno un tratto del percorso 3, nonché a terminali 34.

In una forma di attuazione, almeno uno tra il corpo superiore 26 ed il corpo inferiore 30 è configurato almeno in parte per realizzare funzioni di circuito stampato. Anche tale caratteristica è presente nel caso del dispositivo delle figure 40-45: come ben visibile in figura 42, gli elettrodi 31 e 32 sono qui configurati come piste elettricamente conduttive depositate o comunque formate direttamente (ad esempio tramite tecnica serigrafia o incisione) sulla faccia del corpo inferiore 30 rivolta al corpo 2. Gli elettrodi 31 e 32 sono elettricamente connessi ai terminali 34 di un connettore, che realizzano mezzi di interconnessione elettrica del dispositivo MD, ad esempio ad una apparecchiatura di analisi o di controllo. I terminali 34, sostanzialmente di tipo pin, sono passanti nello spessore del corpo inferiore 30, con rispettive parti sporgenti da entrambe le facce di tale corpo 30. Di preferenza, quindi, nella faccia inferiore nel corpo 2 è previsto almeno un alloggiamento atto a ricevere parzialmente anche componenti diversi dalla sezione 20, montati sul corpo 30. Una tale alloggiamento, che riceve parte dei terminali 34, è indicato con 35 in figura 44. Ovviamente, nel caso in cui sul corpo inferiore 30 siano montati altri componenti elettrici e/o elettronici, quale ad esempio un circuito integrato, l'alloggiamento 35 può avere dimensioni maggiori di quelle esemplificate, o possono essere previsti una pluralità di alloggiamento aventi forma e dimensioni adeguate ai componenti da ricevere parzialmente.

Dalla parte opposta del corpo inferiore 30 i terminali 34 sporgono, in misura significativa, nell'ambito di un corpo connettore, indicato con 36 nelle figure 41-43. Il corpo connettore 36, qui di sezione quadrangolare, può essere formato integrale con il corpo inferiore 30 oppure essere configurato come pezzo distinto.

Nel caso in cui la sezione di raccolta 20 integri componenti elettrici e/o elettronici, sulla faccia del corpo inferiore 30 avente funzioni di circuito stampato possono essere anche previste piste di collegamento, per l'interconnessione elettrica

dell'unità 20. Questa forma di attuazione è anche rappresentata in figura 42, in cui le suddette piste di collegamento sono indicate con 37; in questa attuazione il corpo 21 ha rispettivi terminali o elementi di contatto esposti (non visibili) che, nella condizione montata, sono in contatto elettrico con le piste 37, per la necessaria alimentazione e/o trasporto di segnali rispetto ai mezzi elettrici e/o elettronici presenti nella sezione 20.

Si noti che un circuito stampato o PCB può essere configurato come componente aggiunto, ad esempio ricavato in un corpo inferiore 30, o in un coperchio 26, oppure può essere ricavato direttamente sul corpo 2, quando questo è formato con un materiale idoneo, quale ad esempio vetro o silicio. Anche in questo secondo caso, le piste conduttive possono essere ottenute ad esempio con tecnica serigrafica direttamente sul corpo 2, eventualmente provvisto almeno in parte di opportuno strato isolante.

Anche il coperchio 26 può essere eventualmente configurato almeno in parte per realizzare funzioni di circuito stampato, similmente a quanto descritto per il corpo inferiore 30, con montaggio di componenti elettrici e/o elettronici.

In una forma di attuazione, tra il corpo 2 ed il corpo 21, ovvero la sezione di raccolta 20, può essere prevista una interconnessione elettrica. Ad esempio, facendo riferimento a forme di attuazione del tipo di quelle delle figure 16-17 o 20-21, il dispositivo MD può comprendere un circuito stampato o PCB con una porzione che si estende a cavallo del corpo 2 e del corpo 21, il quale PCB realizza funzioni di interconnessione tra parti elettriche/elettroniche di pertinenza del corpo 2 e parti elettriche/elettroniche di pertinenza del corpo 21. In un tale caso, eventualmente, nella zona di interfaccia tra i corpi 2 e 21 il suddetto circuito stampato può essere predisposto per la rottura o il taglio, similmente a quanto descritto in precedenza con riferimento alle figure 32-34 per i corpi 2 e 21.

Naturalmente, anche con riferimento ad altre forme di attuazione illustrate, un'interconnessione tra parti elettriche/elettroniche del corpo 2 e parti elettriche/elettroniche del corpo 21 potrebbe essere ottenuta tramite un relativo sistema di connessione, ad esempio del tipo maschio-femmina.

In una forma di attuazione il dispositivo secondo l'invenzione comprende almeno uno tra un riscaldatore elettrico ed un sensore di temperatura. Tali mezzi possono risultare utili per mantenere il fluido biologico ad una temperatura predeterminata (ad

esempio circa 37°C) nel corso dell'analisi.

Il riscaldatore e/o il sensore di temperatura possono essere montati direttamente sul corpo 2 o, come nel caso esemplificato in figura 46, in un corpo inferiore 30 del dispositivo. La figura 46 si riferisce appunto al caso di posizionamento di un sensore di temperatura TS, ad esempio di tipo PTC o NTC, e di un riscaldatore elettrico EH, ad esempio in forma di resistenza serigrafata, posizionati su di un corpo inferiore 30 del tipo di quello precedentemente descritto con riferimento alle figure 40-45, ad esempio in vetro. Si noti che anche il riscaldatore HE potrebbe essere di tipo PTC, ottenibile eventualmente anch'esso con tecnica serigrafica; in caso di un riscaldatore PTC non è necessario prevedere un apposito sensore di temperatura TS, in virtù delle caratteristiche di autoregolazione in temperatura proprie di un resistore a coefficiente di temperatura positivo; il sensore di temperatura TS potrebbe comunque essere utile anche per altre funzioni e/o per una più corretta elaborazione dei dati.

Nelle figure 47-49 è illustrato un altro dispositivo microfluidico secondo l'invenzione, particolarmente con struttura di micro-separazione a flusso miscelato; anche in tali figure sono impiegati i numeri di riferimento delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli in precedenza già descritti.

Come visto precedentemente, nel dispositivo delle figure 40-45 il corpo 21 della sezione di raccolta 20 è configurato come componente montato o ricavato almeno in parte in corrispondenza della faccia superiore del corpo 30, ovvero la faccia rivolta verso il corpo 2: le figure 47-49 si riferiscono ad un dispositivo concettualmente simile a quello delle figure 40-45, ma nel caso di montaggio o integrazione del corpo 21, e quindi della sezione 20, in corrispondenza della faccia inferiore del corpo 30.

Come si vede in figura 48, la faccia inferiore del corpo 30 può essere eventualmente configurata come circuito stampato, sul quale sono montati, oltre che la sezione 20, anche altri componenti elettrici e/o elettronici, quali i terminali 34 del connettore 36 ed un circuito integrato 38. Si noti che in figura 48 non sono state rappresentate le piste elettricamente conduttive per il collegamento dei vari componenti elettrici e/o elettronici

Si nota, particolarmente nelle figure 48 e 49, come dal corpo 21 della sezione di raccolta 20 sporgano terminali o elementi di contatto 39 destinati al collegamento con

relative piste ricavate sulla faccia inferiore del corpo 30, tale sezione di raccolta 20 essendo sostanzialmente configurata come un componente elettronico del tipo a montaggio superficiale. Anche in questa realizzazione il corpo inferiore 30 presenta un rispettivo corpo connettore 36, nell'ambito del quale sporgono i terminali 34 di interconnessione del dispositivo MD verso l'esterno, ad esempio verso un'apparecchiatura di analisi. Il corpo 30 ha un passaggio o foro passante 5b che, nella condizione assemblata del dispositivo MD si trova in corrispondenza del foro di uscita 5 del percorso 3: tramite tale foro 5b il fluido giunge alla sezione 20.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta del dispositivo microfluidico secondo l'invenzione include un substrato di materiale semiconduttore, particolarmente in silicio, integrante almeno uno tra un dispositivo fluidico, un dispositivo elettromeccanico, un dispositivo elettrico, un dispositivo elettronico in forma miniaturizzata, un dispositivo di trasmissione e/o ricezione di dati, dispositivi MEMS o NEMS, come già in precedenza citato.

Un tale caso è esemplificato nelle figure 50 e 51, relative ad una sezione di raccolta 20 utilizzabile, ad esempio in abbinamento ai dispositivi MD delle figure 40-45 o delle figure 47-49. L'idea di prevedere un substrato di materiale semiconduttore, e particolarmente silicio, integrate dispositivi elettrici e/o elettronico e/o elettromeccanici è comunque impiegabile anche in altre forme di attuazione dell'invenzione, dotando la sezione 1 o la sezione 20 di mezzi di interconnessione elettrica.

Nella forma di attuazione di cui alle figure 50 e 51, la sezione 20 ha un rispettivo corpo di raccolta o di involucro 21, formato ad esempio in materia plastica, definente almeno in parte la cavità 21a. Il fondo di tale cavità è, nell'esempio realizzato da un substrato in silicio, indicato complessivamente con 40. Il corpo 21 che alloggia il substrato 40 integra almeno parzialmente condotti idraulici, quali il foro di uscita 23 ed il relativo raccordo 23b; al corpo 21 sono inoltre associati i mezzi di connessione elettrica 39, collegati al substrato 40, ad esempio tramite *wire-bonding*, in una zona protetta dal flusso idraulico.

Nell'esempio, il substrato 40 è quindi microlavorato per definire uno o più dispositivi miniaturizzati. In termini generali, questi dispositivi possono comprendere un filtro o mezzi di separazione, un circuito integrato, un dispositivo di misurazione e/o di

elaborazione di informazioni e/o grandezze fisiche, un dispositivo di illuminazione, un dispositivo ottico di rilevazione, un dispositivo di memoria, un dispositivo di conteggio e/o allineamento e/o rilevazione di caratteristiche e/o della tipologia di particelle, un dispositivo sensore in generale.

Nel caso specifico rappresentato, oltre che i mezzi 24, nel substrato 40 sono identificabili due micro-valvole MEMS 40a, pareti 40b che realizzano un canale microfluidico, una coppia di elettrodi 40c per elettroforesi e/o rilevazione cellule, una parte di elaborazione e/o sensoristica 40d, che può quindi integrare funzioni di microcontrollore e di memoria, nonché di mezzi di illuminazione e di mezzi sensori. Nell'esempio questa unità è raffigurata schematicamente a monte dei mezzi 24, ma la stessa unità, o un'unità simile, può essere prevista a valle dei mezzi 24. In una forma di attuazione, la parte 40d comprende mezzi di illuminazione o eccitazione e/o mezzi atti ad evidenziare le cellule o particelle, presenti in particolare nella camera 40e che risulta compresa tra la microvalvola 40a ed i mezzi di separazione 24. I suddetti mezzi di illuminazione, ad esempio comprendenti uno o più elementi emettitori di luce di tipo LED o allo stato solido, sono preferibilmente atti a generare almeno una lunghezza d'onda di uno spettro elettromagnetico atta allo scopo, quale una lunghezza d'onda atta ad eccitare opportunamente bead BE attaccate a cellule TC, o atta ad evidenziare predefinite caratteristiche delle particelle o cellule, quali la forma.

La parte 40d – realizzabile con tecnica nota nel campo della fabbricazione di microcontrollori a wafer di silicio – può essere in parte isolata ed in parte a contatto e/o in corrispondenza del fluido, preferibilmente integrando mezzi di trasmissione e/o ricezione per lo scambio di informazioni con un dispositivo di trasmissione e/o ricezione esterno, ad esempio previsto su di un'apparecchiatura di analisi. In una tale realizzazione, quindi, i mezzi di identificazione del dispositivo in precedenza citati ed esemplificati in forma di codice a barre, possono essere di tipo elettronico ed includere mezzi di trasmissione (ed eventualmente ricezione) di segnali, ad esempio per inviare dati identificativi del dispositivo MD e/o risultati di misurazioni/analisi effettuate all'interno della sezione 20 e/o altre informazioni o dati, e per eventualmente ricevere informazioni identificative, parametri di configurazione e/o di settaggio, o comandi specifici per componenti elettrici/elettronici interni alla sezione stessa 20.

Atteso che nel substrato in silicio 40 possono essere convenientemente ricavati mezzi di memoria non volatile, nel substrato stesso può anche essere implementato con vantaggio un dispositivo RFID, ad esempio del tipo precedentemente citato, preferibilmente contenente dati identificativi, relativi ad esempio a informazioni rappresentative del campione in analisi, del tipo di analisi a cui il campione deve essere sottoposto, di dati o parametri di calibrazione di una apparecchiatura di analisi, di dati identificativi del soggetto a cui appartiene il fluido biologico, eccetera.

I sensori integrati nel substrato in silicio 40 possono comprendere mezzi di conteggio delle particelle, ad esempio realizzati tramite elettrodi che variano il comportamento, quale la resistenza elettrica o la capacità o l'oscillazione, in proporzione alle cellule con cui sono a contatto. Potrebbero vantaggiosamente essere integrati nel substrato 40 anche dispositivi microfluidici o sensori miniaturizzati atti a controllare le portate e/o pressioni dei fluidi circolanti, come anche la relativa temperatura e/o altri parametri fisici atti allo scopo.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 comprende un corpo di involucro 21 configurato come parte distinta rispetto al corpo 2, che integra almeno parzialmente condotti idraulici e mezzi di interconnessione elettrica. Una tale realizzazione è ad esempio rappresentata nelle figure 52-54, che utilizzano i medesimi numeri delle figure precedenti.

In questa realizzazione, la sezione 20 ha un rispettivo corpo 21, ad esempio di materiale plastica, che definisce sia un raccordo di uscita inferiore 23b, sia un corpo connettore 41, nell'ambito del quale sporgono rispettivi terminali elettrici 42. Questi terminali 42 sono collegati a componenti elettrici e/o elettronici presenti all'interno del corpo 21, ad esempio integrati in forma miniaturizzata in un substrato in silicio del tipo precedentemente indicato con 40, come visibile ad esempio nella vista esplosa di figura 54, provvisto del relativo foro di uscita 23 in comunicazione di fluido con il raccordo di uscita 23b. In alternativa, il fondo della cavità del corpo 21 può essere definito da un substrato in vetro, nel qual caso i componenti elettrici e/o elettronici della sezione 20 potranno essere almeno in parte posizionati al di sotto di tale substrato in vetro (vedere ad esempio la precedente parte di descrizione in relazione alla sezione di raccolta di figura 45).

In una forma di attuazione, quale quella rappresentata nelle figure 52-54, il corpo della sezione 20 può anche includere un rispettivo elemento di chiusura che integra mezzi di connessione idraulica. Anche una tale realizzazione è visibile nelle figure 52 e 54, dove si vede come il coperchio 26a della sezione 20 definisce un raccordo superiore 22b, che realizza l'ingresso 22 della sezione 20. I raccordi della sezione 20 potrebbero essere disposti diversamente, così come il connettore 41, ed essere in numero differente da quello esemplificato.

In una forma di attuazione, l'intera sezione di raccolta 20 è configurata come unità separabile dal corpo 2 ed è accoppiata operativamente alla faccia del corpo 2 opposta a quella in cui è definito il percorso 3. In una tale attuazione, l'uscita del percorso 3 è di preferenza configurata come foro passante 5 del corpo 2 e/o come raccordo idraulico rispetto al raccordo 22b. In una forma di attuazione, la sezione 20 ha mezzi di interconnessione meccanica ed idraulica, accoppiabili in modo separabile con mezzi di interconnessione meccanica ed idraulica del primo corpo 2.

Il dispositivo di cui alle figure 55-58 evidenzia entrambe queste caratteristiche, peraltro non necessariamente coesistenti. Nelle figure 55-58 sono impiegati numeri di riferimento già in precedenza utilizzati, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli già descritti.

Nella realizzazione esemplificata il dispositivo MD non comprende il corpo inferiore 30 ed il corpo 2 ha configurazione generale simile a quella del corpo 2 di figura 36, ma priva del raccordo inferiore di uscita 23b; in questo caso, nella faccia del corpo 2 opposta a quella in cui è definito il percorso 3 è definito un alloggiamento 33', in cui è innestabile almeno parzialmente, in modo asportabile, la sezione di raccolta 20, come ben visibile in figura 56. Nell'esempio illustrato, la sezione 20 ha configurazione analoga a quella descritta con riferimento alle figure 52 e 53.

Anche in questa realizzazione, di preferenza, il corpo 2 è formato in materiale almeno in parte elastico, con la sezione 20 che può quindi essere accoppiata meccanicamente ed idraulicamente, a tenuta, con il corpo 2, particolarmente sfruttando la leggera cedevolezza o elasticità di quest'ultimo. Come si nota, particolarmente in figura 58, nella condizione assemblata del dispositivo, il raccordo di ingresso 22b risulta innestato nel foro passante 5 del corpo 2, che realizza al contempo sia l'uscita del

percorso 3, sia un mezzo di raccordo cooperante con il raccordo 22b; come in precedenza spiegato, nel foro 5 può eventualmente confluire anche un condotto 8 o 8' del buffer, oppure potrebbero essere previsti rispettivi ulteriori raccordi nel corpo 2 e nella sezione 20.

In una forma di attuazione dell'invenzione, almeno uno tra gli ingressi e le uscite del dispositivo microfluidico ha mezzi valvolari, quali valvole unidirezionali e/o valvole di ritegno e/o valvole di antiriflusso. Questi mezzi valvolari possono essere convenientemente formati integrali in un corpo del dispositivo MD, quale ad esempio il corpo 2, oppure essere configurati come componenti aggiunti. Le figure 59-62 e 63-67 illustrano queste due possibilità.

Nel caso della forma di attuazione delle figure 59-60 il corpo 2, rappresentato solo schematicamente in sezione, con il relativo coperchio 26, presenta raccordi inferiori, quali i raccordi 4b, 6b e 7b, all'interno dei quali è definita una membrana 45 presentante un taglio trasversale, in modo da definire due labbri opposti 45a, elasticamente deformabili, combacianti tra loro in tenuta. Simili membrane 45 possono essere previste anche nei raccordi 6b' e 23b, quando previsti.

La deformazione in apertura o in chiusura dei labbri 45a può essere ad esempio indotta dalla pressione o dalla depressione del fluido in ingresso al dispositivo (sangue e/o buffer), oppure dal fluido in uscita (fluido con particelle obiettivo e/o fluido di scarto, quale miscela sangue di scarto e buffer).

Al cessare di tale pressione, o nel caso di una depressione o pressione contraria, i labbri 45a tendono a richiudersi automaticamente, prevenendo anche la fuoriuscita di fluido. La sensibilità di tali valvole o labbri può essere predefinita in base al tipo del materiale e/o spessore della membrana.

In un'altra realizzazione la membrana 45 può anche essere priva del suddetto taglio trasversale, dove preferibilmente la membrana 45 ha una linea o zona di rottura predeterminata e/o una zona di foratura. In una ulteriore realizzazione, come evidenziata nelle figure 61 e 62, l'apparecchiatura di analisi, sulla quale il dispositivo MD deve essere posto, può presentare raccordi di collegamento fluidico 46, provvisti internamente di idonee sporgenze o perni 46a, preferibilmente assiali, aventi sezione sottile o comunque tale da non impedire il transito del fluido. I suddetti perni 46a sono destinati a

sporgere all'interno dei raccordi 4b, 6b, 7b, del dispositivo MD sino a determinare la rottura o taglio della membrana 45, con la conseguente formazione ed apertura dei labbri 45a, oppure i perni 46a sono atti ad inserirsi tra due labbri con taglio preformato, causandone la deformazione in apertura.

In una tale realizzazione, la rimozione del dispositivo MD dall'apparecchiatura determina poi la chiusura dei labbri 45a.

Secondo la suddetta variante con rottura o taglio della membrana 45, il perno 46a potrebbe vantaggiosamente essere configurato come un ago, in particolare atto a forare la membrana 45, la quale si richiude automaticamente alla rimozione del perno.

Nel caso di un utilizzo della suddette valvole come valvole antiriflusso, ovvero atte ad evitare un flusso inverso, i raccordi di collegamento fluidico 46 possono essere sprovvisti delle sporgenze o perni 46a e/o possono essere previste ulteriori valvole, sia ai fini del ritegno che ai fini dell'antiriflusso.

La realizzazione delle figure 59-62 risulta ad esempio vantaggiosa nel caso di un corpo 2 formato con materiale elasticamente deformabile, quale ad esempio un materiale siliconico. Le valvole evitano perdite di fluido a seguito della rimozione del dispositivo, dopo aver fatto transitare un fluido e/o evitano la circolazione di fluidi in zone o versi non desiderati.

Le figure 63-67 si riferiscono invece al caso di valvole, quali valvole unidirezionali e/o di ritegno e/o di antiriflusso, configurate come componenti aggiuntivi, applicati in corrispondenza di raccordi inferiori del dispositivo MD. In questa realizzazione le valvole suddette, indicate con 45' hanno un corpo in materiale elastico, ad esempio di materiale elastomero, con una parte di base a flangia, da cui si eleva una parte essenzialmente conica o troncoconica, con estremità superiore appiattita e provvista di un taglio 45b (figure 65-67) o di una zona predefinita di rottura, o taglio, o foratura. Anche in una tale realizzazione, la divaricazione o la chiusura dei lembi o porzioni della membrana può essere ottenuta sfruttando la pressione del fluido e/o l'inserimento di un perno o di un ago.

Si noti che anche i mezzi valvolari 45' possono essere eventualmente ricavati integralmente da stampaggio nel corpo 2.

Le realizzazioni di cui alle figure 59-62 e 63-67 sono relative all'integrazione di

valvole in ingressi e/o uscite inferiori di un dispositivo MD, ma si apprezzerà che la soluzione è applicabile anche al caso di dispositivo MD dotato di ingressi e/o uscite laterali e/o superiori.

Mezzi valvolari risultano utili al fine di evitare perdite dal dispositivo MD quando questo viene rimosso da un'apparecchiatura di analisi. Considerando infatti che nel dispositivo MD viene fatto transitare un fluido biologico è preferibile che il dispositivo stesso non goccioli durante le manipolazioni; questo anche al fine di mantenere un ambiente isolato all'interno del dispositivo, ad esempio nell'ottica di preservare le cellule o realizzare colture all'interno della sezione 20. Naturalmente la configurazione specifica dei mezzi valvolari potrà essere diversa da quella, pur vantaggiosa, qui esemplificata.

Valvole di antiritorno o valvole unidirezionali possono anche servire sugli ingressi dei condotti 4 e 8 per evitare reflussi, ad esempio in implementazioni in cui flussi di sangue e di buffer vengono immessi nel dispositivo in modo alternato. In tale ottica, anche se viene immessa dapprima una parte di sangue e, successivamente, il buffer, il buffer stesso non può "spingere" all'indietro il sangue, verso tubi e serbatoi di alimentazione del dispositivo, grazie alla presenza dei mezzi valvolari unidirezionali, ad esempio nel tipo già sopra descritto.

In una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 è accoppiata meccanicamente ed idraulicamente in modo separabile al corpo 2 ed ha mezzi valvolari, quali valvole unidirezionali e/o di ritegno, preferibilmente configurati almeno per prevenire la fuoriuscita di materiale del campione obiettivo dal relativo ingresso 22 e/o dalla relativa uscita 23, a seguito della rimozione e/o separazione della sezione stessa dal corpo 2.

Un esempio di una tale attuazione è illustrato nelle figure 68-71, in cui sono impiegati i medesimi numeri delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti ad elementi già sopra descritti.

In questa realizzazione il dispositivo include un corpo 2 ed un coperchio 26, di configurazione generalmente simile a quella del dispositivo MD delle figure 55 e 56. In questo caso, tuttavia, l'uscita del percorso 3 non è passante nello spessore del corpo 2, ma consta invece di un condotto 5 almeno in parte ricavato in una zona interna del corpo 2, ovvero che si estende tra la faccia superiore del corpo 2, in cui è definito il percorso 3,

e la faccia periferica dello stesso corpo 2.

Preferibilmente, ma non necessariamente, in corrispondenza della faccia periferica del corpo 2 in cui si apre il condotto 5 è definita una sede di posizionamento o alloggiamento, quale una spianatura. Si noti, in ogni caso, che la sagoma del corpo 2 non deve essere necessariamente circolare, come nel caso esemplificato.

Il corpo 21 della sezione di raccolta 20 ha, a titolo esemplificativo, una sagoma simile a quella della sezione 20 delle figura 52 e 53, ma con un raccordo di ingresso 22b che sporge lateralmente, anziché superiormente, e che è destinato ad innestarsi in un raccordo o allargamento (si veda figura 70) definito all'estremità del condotto 5. La tenuta tra le due parti accoppiate è ottenibile sfruttando vantaggiosamente l'elasticità del materiale costituente il corpo 2, quando questo è ad esempio un materiale elastomero o siliconico. Possono in ogni caso essere previsti appositi mezzi di tenuta, quale una guarnizione.

Si apprezzerà quindi come, in una forma di attuazione, la sezione di raccolta 20 può essere configurata come componente separabile dal corpo 2, e avere mezzi di interconnessione meccanica ed idraulica accoppiabili in modo separabile con mezzi di interconnessione meccanica ed idraulica del corpo 2.

La sezione 20 è provvista, in corrispondenza del raccordo di ingresso 22b, di mezzi valvolari, preferibilmente del tipo precedentemente indicato con 45' nelle figure 63-67. Simili mezzi valvolari sono previsti in corrispondenza del raccordo di uscita 23b della sezione 20. Ovviamente i mezzi valvolari possono essere di tipo diverso da quello esemplificato.

Si apprezzerà che, in questa realizzazione, una volta ottenuto il campione di particelle obiettivo, il dispositivo MD può essere rimosso dall'apparecchiatura di laboratorio che gestisce i flussi (sangue, buffer, scarico) e/o controlla il dispositivo MD, e la sezione 20 può poi essere rimossa dal dispositivo MD, ovvero separata dalla sezione 1, a fini di successivo impiego, ad esempio analisi da effettuarsi con altre apparecchiature. La presenza dei mezzi valvolari 45' garantisce che, all'atto della rimozione della sezione 20 dal corpo 2, dai raccordi di ingresso 22b ed uscita 23b non si disperda materiale del campione, quali eventuali residui della miscela sangue-buffer con relative particelle obiettivo. Le ridotte dimensioni della sezione di raccolta 20 ne

agevolano la manipolazione in fase di analisi.

In una forma di attuazione la sezione di raccolta 20 ha almeno uno tra un passaggio di aerazione, in corrispondenza del quale è preferibilmente montata una membrana permeabile all'aria avente porosità calibrata, ed un ingresso per l'immissione di un terreno di coltura.

Anche tale attuazione è visibile nelle figure 68-71, in cui il suddetto passaggio di aerazione è indicato con 47, preferibilmente ma non necessariamente definito sul coperchio 26a, in corrispondenza del quale è montata la suddetta membrana, indicata con 47a, ad esempio in Goretex®. In questa realizzazione, come ingresso per l'immissione di un terreno di coltura può essere vantaggiosamente sfruttato il raccordo 22b provvisto dei mezzi valvolari 45'. Ovviamente nulla vieta di prevedere uno specifico ingresso per il terreno di coltura, ad esempio sul coperchio 26a, provvisto di idonei mezzi valvolari, anche del tipo precedentemente indicato con 45.

La figura 72 illustra una variante della sezione di raccolta in cui il passaggio di aerazione 47 è formato direttamente nel corpo 21, in posizione laterale, anziché sul coperchio 26a.

In una forma di attuazione, particolarmente utile per i casi in cui la sezione di raccolta del dispositivo sia separabile/rimuovibile o indipendente dal corpo 2, può essere previsto un supporto o adattatore, volto ad agevolare l'utilizzo e/o la manipolazione della sezione stessa.

Le figure 73-75 illustrano un esempio di supporto o adattatore impiegabile in abbinamento ad una sezione di raccolta separabile, quale la sezione 20 di figura 72. Il supporto, indicato complessivamente con 50 ha un corpo, ad esempio di materia plastica, in cui è definita una cavità passante 51 avente un profilo periferico conforme a quello della sezione di interesse 20, ovvero una sede 51 atta ad almeno in parte ricevere o alloggiare la sezione 20. Di preferenza, in corrispondenza di un'estremità della cavità 51 è definito un gradino o sottosquadro 52, sul quale è destinata ad attestarsi una regione periferica del coperchio 26a della sezione 20. Nel caso di sezioni 20 aventi una o più parti sporgenti lateralmente, quali il raccordo di ingresso 22b ed il passaggio di aerazione 47, la cavità 51 è provvista di impronte laterali 53 di sagoma idonea, per ricever almeno parzialmente le suddette parti sporgenti. Come si intuisce dalle figure 73

e 74, nella condizione accoppiata dei componenti, il coperchio 26a della sezione 20 risulta perfettamente visibile attraverso l'apertura passante 51 del corpo del supporto 50; dalla parte opposta, il corpo connettore 41 coi terminali 42 è accessibile.

Il supporto 50 può convenientemente avere sagoma esterna circolare, per l'inserimento in piastre Petri, oppure il supporto 50 può avere sagoma atta ad essere montata direttamente in apparati del settore, quale una sagoma analoga ad una piastra Petri. Come si intuisce, l'uso del supporto 50 può risultare comunque vantaggioso per semplificare l'impiego e la manipolazione della sezione 20, ad esempio su apparati o strumentazione di analisi.

A titolo indicativo, la sezione 1 (ovvero il corpo 2 quando privo di sezione 20) e/o la sezione 20 e/o il supporto 50 possono avere sagome in pianta e/o dimensioni corrispondenti o prossime ad almeno una tra le seguenti:

- sagoma generalmente circolare, con diametri compresi tra circa 35 e circa 180 mm, quali ad esempio uno dei seguenti diametri: 35 mm, 50 mm, 60 mm, 80 mm, 90 mm, 94 mm, 100 mm, 120 mm, 140 mm, 145 mm, 150 mm, 180 mm;
- sagoma generalmente quadrangolare, con lati compresi tra circa 25 e circa 120 mm, quali ad esempio uno dei seguenti (lato x lato) 26 mm x 76 mm, 100 mm x 100 mm, 120 mm x 120 mm.

Si apprezzerà che, in varie forme di attuazione, la sezione di raccolta 20 - montata o meno su di un supporto - costituisce essa stessa un dispositivo microfluidico, utilizzabile di per sé, una volta separata dal corpo 2. Questo è particolarmente il caso di sezioni di raccolta 20 che integrano dispositivi elettrici e/o elettronici e/o elettromeccanici del tipo precedentemente indicato, con relativi mezzi di interconnessione e/o alimentazione elettrica (cablata o non cablata) e raccordi di collegamento idraulico, nonché di eventuali mezzi di separazione meccanici e/o elettrici. Tali sezioni 20, quindi, oltre che utilizzabili come "vetrini" per analisi visive, ad esempio tramite microscopio, possono essere eventualmente impiegate su apparecchiature di analisi dotate di interconnessioni elettriche e/o idrauliche accoppiabili con quella di tali sezioni.

In figura 76 è rappresentata uno schema di principio di un'apparecchiatura di laboratorio secondo l'invenzione, utilizzabile in abbinamento ad un dispositivo

microfluidico, ad esempio un dispositivo avente una struttura di separazione a flusso miscelato o un dispositivo MD del tipo precedentemente descritto, in particolare per la circolazione e/o la gestione dei flussi di fluidi e/o il controllo del dispositivo stesso.

L'apparecchiatura di figura 76, indicata con EQ, è collegata ad una sorgente di un fluido, preferibilmente un aeriforme AC quale aria compressa, non rappresentata, per alimentare un primo ed un secondo ramo 61 e 71, lungo i quali sono operativi dispositivi regolatori di pressione idonei all'applicazione, indicati con 62 e 72, di tipo meccanico e/o elettrico e/o elettronico, preferibilmente regolatori di pressione di precisione, eventualmente programmabili; in particolare, tali regolatori di pressione sono regolabili in un campo di pressione compreso tra 1 millibar e 1 bar, preferibilmente regolabili tra 10 millibar e 200 millibar.

Secondo una variante, ai regolatori di pressione 62 e 72 sono operativamente associati rispettivi sensori di pressione, non raffigurati, ad esempio in comunicazione di fluido con condotti o percorsi del dispositivo MD, in particolare al fine di ottenere una retroazione e/o regolazione della pressione.

L'aria compressa AC in uscita dai regolatori 62 e 72, a pressioni P_3 e P_8 , rispettivamente, raggiunge rispettivi recipienti ermetici 63 e 73, in cui sono contenuti un fluido biologico, quale sangue, ed un fluido ausiliario, quale il buffer liquido; le pressioni P_3 e P_8 sono preferibilmente comprese in un campo di pressione tra 1 millibar e 1 bar, quale un campo di pressioni tra 10 millibar e 200 millibar.

Preferibilmente, ma non necessariamente, ai recipienti 63 e 73 sono associati rispettivi mezzi agitatori, in particolare per mantenere in sospensione e/o in uniforme distribuzione le particelle e/o le eventuali bead, che possono comprendere ad esempio un agitatore magnetico 64 e 74, ad esempio atto a produrre la movimentazione di almeno un elemento magnetico o una capsula magnetica 64a e 74a posta nei recipienti 63 e 73, rispettivamente.

Un'agitazione o movimentazione del fluido potrebbe eventualmente essere ottenuta tramite un'opportuna eccitazione e/o movimentazione delle bead disperse nel fluido, attuate o movimentate tramite opportuni mezzi di eccitazione, quale mezzi atti ad indurre un campo elettrico.

I recipienti 63 e 73 hanno una rispettiva uscita connessa tramite un relativo

condotto 65 e 75 ai rispettivi raccordi di ingresso 4b e 6b (o 6b') del dispositivo MD; il raccordo di uscita 7b del dispositivo MD è connesso ad un condotto di scarico DR.

I recipienti 63 e 73 comprendono preferibilmente un rispettivo involucro 63a, 73a ed un coperchio 63b, 73b tra loro accoppiati a tenuta, eventualmente tramite opportuni mezzi di tenuta aggiuntivi. I coperchi 63b, 73b sono preferibilmente associati a tenuta ai rispettivi condotti 61, 65 e 71, 75. Preferibilmente i condotti di ingresso 61, 71 si estendono nel rispettivo involucro 63a, 73a per un tratto o lunghezza inferiore rispetto ai condotti di uscita 65, 75; in particolare i condotti 61, 71 terminano ad un livello superiore, prossimo alla parte inferiore dei coperchi 63b, 73b, mentre i condotti 65, 75 terminano ad un livello inferiore prossimo alla parte di fondo dei recipienti 63, 73, pur leggermente sollevata per lasciar defluire il fluido contenuto, oppure provvisti di opportune aperture prossime a tale livello inferiore. I condotti 61, 71 terminano preferibilmente al suddetto livello superiore al fine di evitare che l'aria compressa AC possa formare bolle o schiuma nel fluido contenuto nel relativo recipiente 63 o 73 e/o per evitare il rischio di riflussi di fluido nei condotti dell'aria compressa; l'apparecchiatura potrebbe tuttavia funzionare anche con condotti 61, 71 disposti o terminati a differenti livelli, ovvero maggiormente lunghi all'interno dei recipienti 63, 73.

In un normale ciclo di funzionamento, i regolatori 62 e 72 ammettono ai recipienti 63 e 73 aria compressa AC, alle pressioni P_3 e P_8 , con il sangue, rispettivamente il buffer, che vengono in tal modo immessi in pressione all'interno del dispositivo MD.

Come precedentemente spiegato, preferibilmente, la pressione P_8 è leggermente maggiore rispetto alla pressione P_3 , onde evitare riflussi di sangue dal condotto 3 del dispositivo al condotto 8; come già detto, comunque, le pressioni dei fluidi in ingresso al dispositivo 1, quali le pressioni P_3 e P_8 , sono preferibilmente relativamente basse, ovvero di valore tale da ridurre il rischio di danneggiamenti o lisi delle particelle o cellule.

Si noti che la figura 76 presenta una configurazione schematica riconducibile ad uno qualunque dei dispositivi MD, 1 e 20 precedentemente descritti; ne consegue che potrebbero variare il numero dei condotti e/o degli attacchi e/o dei recipienti e/o dei regolatori di pressione, ed il buffer potrebbe contenere bead o esserne privo.

Si consideri inoltre che quanto descritto per brevità in riferimento ad un sistema

atto a generare pressioni potrebbe anche essere riferito ad un sistema atto a generare depressioni e/o differenze di pressione, in particolare tra almeno un ingresso ed almeno una uscita del dispositivo secondo l'invenzione; analogamente, quanto descritto per brevità in riferimento ad un dispositivo funzionante con pressioni potrebbe anche essere riferito ad un dispositivo operante con depressioni e/o differenze di pressione.

La figura 77 illustra un altro esempio di apparecchiatura EQ inventiva, di tipo simile a quello di figura 76. In questo esempio schematico (in cui sono stati omessi per semplicità la sorgente di aria compressa ed i relativi regolatori di pressione), il dispositivo MD è del tipo avente raccordi di collegamento laterali, provvisti di mezzi valvolari del tipo descritto con riferimento alle figure 59-60 e l'apparecchiatura EQ ha raccordi 46 del tipo illustrato nelle figure 61-62. Si noti che anche gli attacchi idraulici 46 dell'apparecchiatura di figura 77 possono essere eventualmente provvisti di valvole di ritegno o chiusura dei condotti in assenza del dispositivo microfluidico, ad esempio per evitare contaminazioni o dispersioni di fluido.

In figura 77 sono evidenziati per semplicità i soli raccordi 4b, di ingresso del sangue, e 7b di scarico della miscela di scarto; l'apparecchiatura EQ è in ogni caso convenientemente dotata di almeno un ulteriore raccordo per l'immissione del fluido ausiliario (il buffer o il buffer con bead) nel dispositivo MD, all'uopo provvisto del relativo raccordo di ingresso, simile a quelli evidenziati.

La figura 77 evidenzia schematicamente anche un sistema di controllo dell'apparecchiatura EQ, indicato con 80, che può essere collegato ad un elaboratore esterno, quale un personal computer 81, per la ricezione e/o trasmissione di dati, quali l'invio di dati di configurazione al sistema 80 e/o la ricezione dal sistema 80 di risultati di analisi effettuate sul campione di particelle obiettivo. Il sistema di controllo 80 sovrintende alle funzionalità generali dell'apparecchiatura, ivi inclusa la gestione dei relativi regolatori di pressione.

Nel caso specifico rappresentato si nota come, oltre al recipiente 63 per il sangue ed un recipiente RD per il fluido di scarico, sia previsto un recipiente addizionale 73' per un liquido, quale il suddetto buffer o un ulteriore buffer di lavaggio, entrambi tali recipienti essendo connessi - per il tramite di valvole 82 ed 83 - ad un medesima linea 84 che alimenta il raccordo 46 per l'ingresso del sangue. Questa configurazione risulta utile

ai fini dell'effettuazione di una fase di lavaggio con solo buffer del dispositivo MD, al termine della raccolta del campione di particelle obiettivo, al fine di evitare ristagni di sangue all'intero del dispositivo stesso e/o per spingere e far transitare nel dispositivo MD tutto il sangue in circolo. In pratica, quindi, ai fini della separazione/raccolta del campione di particelle obiettivo viene aperta la sola valvola 82, di adduzione del sangue; al termine di tale fase operativa, la valvola 82 viene chiusa e viene aperta la sola valvola 83, per realizzare un lavaggio finale del dispositivo MD con solo buffer.

Naturalmente la configurazione idraulica dell'apparecchiatura EQ può essere diversa da quella esemplificata in figura 77, ad esempio provvista di un unico recipiente per il buffer e di idonei mezzi deviatori controllati dal sistema 80 per indirizzare inizialmente il buffer all'ingresso 6, 6b del percorso 8 del dispositivo MD e, quando deve essere realizzato il lavaggio finale, indirizzare il buffer in luogo del sangue all'ingresso 4, 4b del percorso 3. Come si intuisce, in tal modo, quando il dispositivo MD viene rimosso dall'apparecchiatura, è garantita l'assenza al suo interno di depositi di sangue e/o viene garantito il trattamento di tutto il sangue messo in circolo.

In figura 77 è inoltre esemplificato un sistema di comunicazione e/o di alimentazione senza fili tra l'apparecchiatura EQ ed il dispositivo MD, ad esempio a fini di identificazione, come precedentemente spiegato. Con C1 è indicato un avvolgimento e/o un'antenna, facente parte del circuito di controllo 80 dell'apparecchiatura EQ, e con C2 è indicato un avvolgimento e/o un'antenna integrata nel dispositivo MD, ad esempio nella sua sezione di raccolta (non rappresentata in figura), dove tali avvolgimenti e/o antenne C1 e C2 appartengono ad una disposizione di tipo RFID. Come è noto, talune disposizioni RFID includono un dispositivo "passivo", ossia privo di batteria o alimentazione elettrica (tipicamente avente funzionalità di trasmissione o di ricezione), recante dati ed atto a reagire ad uno specifico campo elettromagnetico induttivo, prodotto da un rispettivo lettore, fornendo in risposta una radiofrequenza modulata rappresentativa di dati; non avendo alcuna sorgente di energia interna, il suddetto dispositivo passivo deriva la propria alimentazione dallo stesso campo elettromagnetico generato dal lettore. Nel caso esemplificato, quindi, a seguito del posizionamento del dispositivo MD sull'apparecchiatura EQ è possibile instaurare una comunicazione tra gli stessi, senza la necessità di cablaggi e senza dover dotare il

dispositivo MD di una propria batteria; secondo una variante, la parte della disposizione RFID portata dal dispositivo microfluidico potrebbe tuttavia comprendere una batteria o una differente alimentazione elettrica.

Va notato che una disposizione circuitale del tipo indicato può anche essere impiegata per l'alimentazione elettrica e/o la scrittura di dati o informazioni in idonei mezzi di memoria presenti nel dispositivo MD, ad esempio dati o informazioni derivanti o risultati dall'analisi o test effettuato sull'apparecchiatura di laboratorio.

La figura 78 evidenzia un'apparecchiatura EQ inventiva, del tutto simile a quella di figura 77, impiegata in abbinamento ad un dispositivo MD avente una diversa configurazione dei percorsi microfluidici, che qui si estendono su due facce opposte del corpo 2.

La figura 78 evidenzia inoltre la presenza di una copertura, indicata con 85, per racchiudere il dispositivo MD in un ambiente TA protetto e termostato, ovvero atto ad essere mantenuto ad una temperatura sostanzialmente predeterminata (ad esempio sfruttando i mezzi dello stesso dispositivo MD in precedenza indicati con TS e/o EH di figura 46). Preferibilmente, anche la zona dell'apparecchiatura EQ in cui si trovano i recipienti 63, 73, 73', RD e relativi condotti è protetta e/o termostata.

Secondo una variante, il dispositivo MD di figura 78 presenta una configurazione in cui i condotti e/o percorsi microfluidici sono realizzati su almeno due lati o facce contrapposte del dispositivo MD e/o del corpo 2, preferibilmente messi in comunicazione da condotti o fori passanti, provvisti di rispettive coperture 26 (o 30).

La figura 79 illustra schematicamente un'attrezzatura EQ secondo l'invenzione, sostanzialmente configurata come kit di parti, per la gestione dei flussi in un dispositivo microfluidico, ad esempio un dispositivo MD del tipo precedentemente descritto, avente finalità sostanzialmente simili a quelle dell'attrezzatura di figura 76, ma di costruzione ed uso semplificati. La figura evidenzia un kit comprendente:

- un tubo flessibile 90,
- un primo connettore 91 con ago per la connessione del tubo 90 al dispositivo MD;
- un secondo connettore 92 con due aghi, per la connessione sia del tubo 90 ad un contenitore o provetta 93 contenente il sangue (o il buffer), sia per la connessione

della provetta 93 ad un ulteriore tubo flessibile 94 per l'adduzione di un fluido o aria compressa;

- un terzo connettore 95 per la connessione del tubo 94 ad una sorgente di un fluido o aria compressa 96 ad idonea pressione.

Di preferenza, almeno parte del kit EQ di figura 79 è di tipo usa e getta, onde evitare contaminazioni e/o per una maggior praticità di utilizzo.

Nell'esempio illustrato il connettore 92 comprende due aghi 92a e 92b, che si inseriscono nella provetta 93, in particolare forando un suo tappo 93a in elastomero, al fine di consentire una agevole connessione senza contaminazioni. Nella condizione assemblata i due aghi sono disposti sfalsati rispetto all'asse centrale della provetta 93, e connessi ai due rispettivi tubi 90 e 94.

La provetta 93 è preferibilmente - ma non necessariamente - una provetta di tipo standard del settore, quale una provetta avente diametro esterno di circa 12,3 mm o 15,2 mm e rispettivo diametro interno di circa 10,7 mm o 13,3 mm, il diametro esterno del tappo 93a essendo di circa 15-16 mm e 16,5-17,5 mm rispettivamente.

Secondo un aspetto vantaggioso, il connettore 92 ha dimensioni tali da poter essere innestato o piantato sulla provetta 93 e/o sul tappo 93a tramite i due aghi 92a, 92b. Di preferenza, il corpo del connettore 92 ha una porzione perimetrale che avvolge almeno in parte il bordo della provetta 93 e/o del suo tappo 93a. In tale ottica, ad esempio, il diametro interno del connettore 92 può essere uguale o leggermente superiore a circa 12,3 mm o 15,2 mm, o a circa 15-16 mm, o a circa 16,5-17,5 mm rispettivamente. Di preferenza, onde facilitare la foratura del tappo 93 con i due aghi del connettore 92, il tappo stesso presenta una porzione centrale a sezione ridotta.

Analogamente a quanto descritto in riferimento alla figura 76, il flusso di aria compressa generato dalla sorgente 96 spinge sul sangue nella provetta 93, forzandolo nel dispositivo MD tramite il tubo 90. Un analogo funzionamento avviene ovviamente per il caso di un recipiente 93 contenente il liquido di buffer da immettere nel dispositivo MD in parallelo al sangue.

In considerazione del fatto che, nei dispositivi MD qui descritti con separazione a flusso miscelato, vengono preferibilmente utilizzati fluidi a relativamente bassa pressione, le tenute possono essere facilmente realizzate e/o possono essere utilizzati componenti o

materiali a basso costo: questo vale ad esempio per la tenuta tra gli aghi 92a e 92b ed il tappo 93a in elastomero della provetta 93 e/o la tenuta tra il tappo 93a in elastomero e la provetta 93 e/o la tenuta dei vari connettori 91, 92, 95, e/o per l'utilizzo di componenti del kit in materiale plastico.

In una variante, il tubo 94 può essere connesso, ad esempio al termine della fase di raccolta del campione di particelle obiettivo o di una fase intermedia di trattamento, ad una sorgente in pressione di un liquido di buffer, anziché ad una sorgente di aria compressa, sia al fine di svuotare completamente la provetta 93 dal sangue, sia al fine di eliminare gli ultimi residui di sangue eventualmente rimasti all'interno del dispositivo MD. In tal modo si ha la possibilità di trattare tutto o quasi il sangue inserito nella provetta 93. Al tempo stesso si ottiene un lavaggio che, per quanto il dispositivo MD, i tubi 90, 94, i raccordi 91, 92 e la provetta 93 siano di tipo "usa e getta", consente una più sicura e pulita manipolazione e successivo smaltimento di tali componenti.

Si noti che un lavaggio del dispositivo MD del tipo in precedenza indicato può essere eventualmente ottenuto prevedendo un apposito accessorio di lavaggio, al quale collegare il dispositivo stesso dopo l'analisi e/o il prelievo dalla sezione 20 del campione di particelle obiettivo.

Come in precedenza spiegato, il corpo 2 del dispositivo MD secondo l'invenzione può essere realizzato con almeno uno di vari materiali, quali un materiale elastomero o siliconico, un materiale termoplastico, un vetro, un semiconduttore quale il silicio.

L'uso di vetro consente di ottenere un'ottima planarità, rispetto ad un particolare microstampato in elastomero; peraltro, come detto, anche nel caso di un corpo 2 microlavorato in elastomero, la presenza del coperchio 25 e/o del corpo inferiore 30 fissati - ad esempio tramite incollaggio o saldatura - al corpo 2 consentono di garantire la necessaria planarità.

In caso di impiego di vetro è di preferenza prevista una prima fase di lavorazione (ad esempio lapidellatura), onde ottenere una lastra perfettamente piana, su cui realizzare le microlavorazioni per incisione (incisione chimica, abrasione, laser, plasma, eccetera), o eventualmente per deposizione, onde forma le pareti e/o argini dei percorsi 3, 8, 9.

In un esempio di tale processo, sia il vetro che il silicio possono essere lavorati

come superficie piana, su cui poi viene posizionato o depositato uno strato di materiale protettivo (quale una maschera metallica o un *resist* polimerico) che lascia liberi i percorsi da ottenere nel sottostante materiale (vetro o silicio), il quale viene scavato ed asportato tramite opportuno processo noto, ad esempio incisione chimica o microabrasione; il materiale in questione, sia esso vetro o silicio, può anche essere scavato in altri modi, ad esempio tramite laser o plasma.

Per definire i percorsi 3, 8, 9 e/o gli argini 10, 11 possono essere impiegate anche tecniche di deposizione; ad esempio depositando un materiale atto a formare le pareti e gli argini delimitanti i vari percorsi. Tale deposizione può essere realizzata con molteplici tecnologie note, quale ad esempio una serigrafia o una stampa a getto d'inchiostro, considerando che esistono inchiostri di vario tipo (a base metallica, NPs, dielettrici, drogati e non, semiconduttori, sostanze biologiche, eccetera).

Tra le varie tecniche impiegabili per la realizzazione di un dispositivo MD si cita il *wafer-bonding*, che si presta per forme di attuazione in cui un primo circuito microfluidico realizzato con un primo materiale (ad esempio in silicone o in vetro, per il corpo 2 o il corpo 21) viene associato ad un secondo circuito microfluidico realizzato in un secondo materiale (ad esempio in silicio, per il substrato 40 della sezione 20). Il corpo 2 è anche realizzabile con un procedimento di stampaggio, includente una o più fasi di stampaggio e/o formatura.

La figura 80 illustra in forma meramente schematica un esempio di procedimento di stampaggio di un dispositivo secondo l'invenzione, quale un dispositivo di separazione a flusso miscelato. L'esempio si riferisce ad uno stampaggio di tipo imprinting sub micrometrico di un corpo 2 formato in materiale elastomero o siliconico, quale il PDMS, o in materiale termoplastico, quale il PMMA (polimetilmetacrilato).

La parte A della figura evidenzia l'impiego di un primo stampo, includente due semi-stampi 90 e 91, aventi rispettive impronte 90a, 91a per la definizione di particolari del corpo 2, preferibilmente non aventi dimensioni micrometriche, quali ad esempio dei condotti 8, 9 e/o dei relativi raccordi di collegamento idraulico 6b, 7b (vedere parte B della figura) e degli elementi o labbri di tenuta, quali dei labbri S perimetrali.

Nell'esempio, l'impronta 90a del semistampo superiore 90 è anche configurata per la realizzazione di almeno un elemento in rilievo R, conformato in detta prima fase di

stampaggio, finalizzata alla realizzazione di un semilavorato, indicato con T nella parte B della figura; sull'elemento in rilievo R vengono effettuate microlavorazioni in una seconda fase di stampaggio, in particolare con tecnica imprinting.

L'elemento di tenuta S può essere configurato come un labbro corre lungo il perimetro del corpo 2, ad esempio per effettuare una tenuta verso l'esterno rispetto ad un coperchio 26, quale una tenuta dall'interno, ad esempio rispetto ai condotti idraulici, e/o una tenuta dall'esterno, ad esempio rispetto ad infiltrazioni di sporcizia nel dispositivo. Eventualmente l'elemento S e/o l'elemento in rilievo R possono essere destinati a ricevere microlavorazioni nella suddetta seconda fase di stampaggio, ad esempio per variarne almeno in parte la forma.

Una volta ottenuto il semilavorato T, ad esempio in materiale siliconico o termoplastico, questo viene inserito in una ulteriore attrezzatura di stampaggio o formatura, come evidenziato nelle parti C e D della figura 80. Questa attrezzatura di formatura o imprinting include uno stampo superiore 95 ed un contro stampo o supporto inferiore 96. Lo stampo 95 è provvisto di impronte 96, 99b che realizzano almeno le microlavorazioni della superficie o faccia superiore del semilavorato T. Si noti che l'attrezzatura potrebbe essere configurata per realizzare la formatura o imprinting contemporaneamente su almeno due diverse superfici, quali due superfici opposte; con riferimento all'esempio illustrato, quindi, anche il supporto 96 potrebbe essere provvisto di impronte di imprinting.

Di preferenza, il secondo stampo 95 è provvisto di sedi o cavità 97 atte ad accogliere l'elemento o gli elementi formati nella prima fase di stampaggio, quali gli elementi S e/o R e/o i condotti 4, 6 e/o i raccordi 4b, 6b, in modo da non danneggiarli.

Sempre preferibilmente, lo stampo 95 necessario alla formazione delle microlavorazioni presenta sia sporgenze 98 nelle parti coincidente con regioni "vuote" del pezzo T, sia spallamenti laterali 99a per contenere il materiale durante la seconda fase di stampaggio. La presenza delle suddette sporgenze e spallamenti laterali evita che il materiale su cui vengono stampate le microlavorazioni si deformi lateralmente, senza offrire una debita resistenza meccanica alla compressione e/o deformazione assiale esercitata dallo stampo 95, in particolare nel verso o asse di movimentazione di almeno parte dello stampo. In altri termini, al momento della discesa o movimento assiale dello

stampo 95 sul pezzo T, in particolare per imprimere la forma dei percorsi microfluidici, il materiale opportunamente scaldato potrebbe cedere elasticamente verso il basso e/o verso l'esterno, ed in tal caso lo stampo 95 potrebbe non riuscire ad imprimere adeguatamente la propria forma. La presenza dei suddetti spallamenti e sporgenze consente di evitare questa eventualità. Ovviamente l'estensione verso il basso delle sporgenze e degli spallamenti suddetti può essere maggiore di quella esemplificata in figura.

Di preferenza lo stampo 95 è provvisto di impronte 96, in particolare di larghezza ed altezza inferiore, e di impronte 99b, in particolare di larghezza ed altezza superiore, le quali realizzano delle microlavorazioni della superficie o faccia superiore del semilavorato T, quali dei rispettivi microcanali di larghezza e profondità minore e dei microcanali di larghezza e profondità maggiore, rispettivamente (si veda ad esempio quanto descritto con riferimento alla figura 3C).

A titolo indicativo, la larghezza massima e l'altezza massima dei rilievi dello stampo (e quindi di profondità e larghezza dei percorsi/canali del dispositivo) è preferibilmente entro un rapporto pari a circa 30.

Si consideri che le varie forme o caratteristiche descritte in riferimento al dispositivo delle figure 80, realizzato in due fasi di processo, potrebbe anche essere realizzato con una unica fase di processo, quale una fase di stampaggio o una fase di imprinting; ad esempio un corpo 2 come nella parte D di figura 80 potrebbe essere realizzato solo con stampaggio o iniezione di materiale in uno stampo, in particolare uno stampo provvisto di lavorazioni o sedi micrometriche.

Nelle figure 81-83 è illustrata una ulteriore forma di attuazione di un dispositivo microfluidico secondo l'invenzione. In tali figure sono impiegati i numeri di riferimento delle figure precedenti, per indicare elementi tecnicamente equivalenti a quelli già descritti.

Il dispositivo MD delle figure 81-83 è di concezione generale simile ai dispositivi precedentemente descritti con configurazione dei percorsi 3, 8 e 9 a spirale (si veda ad esempio figura 22 o 36), ma il relativo concetto è applicabile anche a dispositivi MD di diversa configurazione. In questa soluzione l'ingresso 4 è ricavato superiormente al corpo 2, e più particolarmente nel coperchio 26. In questa forma di attuazione l'ingresso

4 è essenzialmente costituito da un innesto cavo ricavato in una regione del coperchio 26 che, nella condizione assemblata del dispositivo, ha l'estremità inferiore affacciata ad una regione iniziale del percorso 3, delimitata da una parete 2a".

Su tale ingresso 4 superiore è innestabile un recipiente o serbatoio 100 contenente ad esempio del sangue; a tal fine il recipiente 100 ha un corpo 101 provvisto di un attacco idraulico inferiore 102, preferibilmente provvisto dei mezzi o valvole di ritegno del tipo già descritto (non raffigurati), oppure di una chiusura atta ad essere perforata in fase d'innesto sul dispositivo MD; a tale scopo, il raccordo del dispositivo MD che realizza l'ingresso 4 è nell'esempio conformato similmente ad un ago.

Il recipiente 100 include un coperchio o tappo superiore 103, con un relativo raccordo o attacco 104, preferibilmente provvisto di detti mezzi o valvole di ritegno (non raffigurati), al fine di iniettare un fluido in pressione finalizzato a spingere il sangue nel dispositivo MD. Il fluido di spinta può essere ad esempio aria compressa e/o un liquido di buffer. Sempre a titolo di esempio, in una prima fase può essere iniettata aria e poi, quando tutto il sangue è fuoriuscito dal recipiente 100, può essere iniettato un liquido di buffer; eventualmente, a tale scopo, al recipiente possono essere associati mezzi sensori di livello, ad esempio di tipo ottico, interfacciati ad una apparecchiatura di analisi o di gestione dell'alimentazione dei flussi al dispositivo MD; analoghi mezzi sensori di livello possono essere previsti anche per gli ulteriori recipienti 63, 73, 93 precedentemente descritti.

Questa soluzione consente di eliminare o comunque ridurre notevolmente la lunghezza del percorso che il sangue deve compiere tra un relativo recipiente ed il dispositivo MD, particolarmente senza la necessità di tubi di collegamento. In questo modo la quantità di sangue necessaria al test tramite il dispositivo MD può essere ridotta. La soluzione consente anche di evitare ristagni di sangue nei tubi di collegamento tipicamente previsti per l'alimentazione dei dispositivi microfluidici noti, con i conseguenti possibili errori nei test che richiedono una analisi su volumi predefiniti di sangue. Si evita inoltre di dover buttare ogni volta anche dei tubi sporchi di sangue o altro fluido in esame.

Il dispositivo MD secondo la forma di attuazione proposta consente infatti di riempire il recipiente 100 con una quantità predefinita di sangue o altro fluido, ridotta

rispetto alla tecnica nota, e di farlo poi transitare completamente nel dispositivo MD, senza il rischio di ristagni.

Nell'esempio di attuazione il recipiente 100 è raffigurato come un contenitore separato, che può essere vantaggiosamente riempito a parte e poi innestata sul dispositivo MD; si apprezzerà tuttavia che, in accordo ad una possibile variante, il recipiente 100 può essere direttamente associato o integrato o ricavato di pezzo nel dispositivo MD, particolarmente nel suo coperchio 26, eventualmente come serbatoio realizzato a parte e poi fissato o saldato o incollato al dispositivo MD.

Un recipiente avente le funzionalità di quello precedentemente indicato con 100 può essere integrato con vantaggio nel dispositivo MD, ad esempio nel corpo 2 o nel coperchio 26, quando realizzato in elastomero. In un tale recipiente integrato può essere caricato o iniettato il sangue (tramite uno sportello o tappo, oppure iniettato forando una sottile parete elastica di chiusura, o tramite una valvola di ritegno del tipo già descritto); analogamente, l'aria potrebbe essere poi iniettata nel recipiente tramite una opportuna apertura o un ago piantato in detta apposita parete perforabile. Considerando che le pressioni di spinta sul sangue sono relativamente basse, la stessa elasticità del materiale elastomero potrebbe garantire le opportune tenute anche in fase di pressurizzazione.

Si apprezzerà che la soluzione di associare o integrare un recipiente o serbatoio al dispositivo MD secondo quanto poco sopra descritto è valida anche nel caso in cui un tale o analogo recipiente sia in comunicazione di fluido con un'uscita di scarico del dispositivo stesso, eventualmente anche un'uscita della sezione 20. Tale soluzione consente ad esempio di raccogliere il liquido di scarto, per smaltirlo successivamente con il corpo 2 o la sezione 20 (in caso di integrazione), oppure avere un serbatoio di raccolta separabile, in modo da poter smaltire tale serbatoio separatamente rispetto al corpo 2 o la sezione 20.

Le figura 84 illustra una ulteriore forma di attuazione dell'invenzione. Il dispositivo MD di questa figura è illustrato, a mero scopo esemplificativo, come avente una struttura simile a quella del dispositivo di figura 1, ma la soluzione in seguito descritta è evidentemente applicabile anche ad altre configurazioni di dispositivo microfluidico.

In questa forma di attuazione, il dispositivo MD è provvisto di due sezioni di

raccolta 20 e 20', ciascuna delle quali in comunicazione di fluido con una rispettiva uscita 5 e 5' del percorso 3 e/o del dispositivo MD.

Nell'esempio non limitativo illustrato, l'argine 11, con le relative vie di passaggio, è configurato per eliminare - man mano che il fluido avanza nel percorso 3 - particelle di dimensioni via via crescenti ed alla fine isolare nelle due sezioni 20, 20' particelle più grandi, separate per dimensioni in base alla larghezza delle vie 11a dell'ultima sezione dell'argine 11. Nell'esempio, la sezione 20 rappresentata più in alto è destinata a raccogliere cellule tumorali TC, mentre la sezione 20' rappresentata più in basso è destinata a raccogliere monociti M.

In una realizzazione di questo tipo, quindi, le vie 11a dell'argine 11 possono essere usate come mezzo di separazione di particelle obiettivo, ad esempio cellule tumorali di differenti dimensioni (si rimanda a quanto precedentemente detto in riferimento ai dimensionamenti preferiti delle vie 11a, nelle varie sezioni o porzioni dell'argine 11).

Nell'esempio sono evidenziate due sole sezioni di raccolta, ma nulla vieta di avere altre configurazioni, con un maggior numero di sezioni 20, 20'. Inoltre, sezioni di raccolta possono essere previste in corrispondenza di vari tratti dell'argine 11 contraddistinti da vie di passaggio aventi dimensioni diverse, come in precedenza spiegato. Come si nota in figura 84 (così come in figura 1), a ciascun suddetto tratto dell'argine 11 corrisponde un rispettivo ramo 9b di collegamento al percorso 9; diversamente dal caso illustrato - in cui i rami 9b confluiscono in un unico canale - al termine di ciascuno dei rami 9b potrebbe essere collegata in comunicazione di fluido una rispettiva sezione 20, per la raccolta di particelle di diverse dimensioni (eventualmente anche scartando le particelle più grandi, nel qual caso l'uscita 5, o ciascuna uscita 5', sarebbe un'uscita di uno scarto del dispositivo MD, non necessariamente collegata ad una sezione di raccolta).

I rami 9b e/o almeno parte delle vie 11a possono essere intesi come tratti o canali tortuosi, predisposti per prevenire un flusso ritorno dal percorso 9 al percorso 3. In un'altra forma di attuazione, non rappresentata, possono essere previsti specifici mezzi antiritorno, quali mezzi valvolari unidirezionali, ad esempio comprendenti membrane che si flettono in apertura dietro la spinta del flusso dal condotto 3 al condotto 9 e si flettono in chiusura in presenza di una spinta contraria. Tali membrane possono essere

eventualmente realizzate da stampo e/o dal corpo 2, nel caso di un corpo 2 in materiale elastomerico o siliconico.

Il caso di figura 84 si riferisce ad una configurazione in cui le due sezioni 20, 20' sono connesse al percorso 3 sostanzialmente in parallelo. Si apprezzerà tuttavia che è anche possibile prevedere una configurazione con almeno due sezioni collegate in serie tra loro, una di seguito all'altra, ovvero con l'uscita di una prima sezione che è collegata all'ingresso di una seconda sezione. Ovviamente, per un tale caso, i passaggi dei mezzi di separazione 24 della prima sezione saranno più larghi rispetto a quelli della seconda sezione.

La realizzazione di figura 84 evidenzia inoltre come, in una forma di attuazione, il corpo 2 può essere provvisto di un solo condotto 8, impiegabile con un buffer provvisto o meno di bead BE: nel secondo caso, quindi, la separazione delle particelle avverrà in base alla sola dimensione delle particelle stesse, senza l'ausilio di bead.

Va ancora notato che nell'esempio di figura 84 la sezione 20' corrisponde ad un'uscita "intermedia", con le particelle più grandi che rimangono nel condotto 3 e che non costituiscono necessariamente le particelle obiettivo. Nel caso in cui l'impiego del dispositivo MD sia finalizzato alla raccolta di particelle aventi una dimensione intermedia (e non quelle più grandi), l'uscita 5 del condotto 3 può essere utilizzata come uscita di scarto (e quindi senza necessariamente prevedere la sezione 20), con l'uscita 5' connessa invece alla sezione 20' per la raccolta delle particelle di interesse.

Come in precedenza spiegato, il dispositivo MD secondo l'invenzione può essere provvisto di un dispositivo di rilevazione, quale un conta-particelle, associato al corpo 2 o alla sezione 20.

Un tale dispositivo può essere di tipo elettrico, ovvero con elettrodi, oppure di tipo ottico, ovvero con un trasmettitore ed un ricevitore di radiazione luminosa, o ancora di tipo acustico, ad esempio basato su effetto Doppler o simili. Uno schema di principio di un tale conta-particelle è evidenziato in figura 85.

Nell'esempio di figura 85 le particelle, includenti le particelle obiettivo che qui si suppongano essere dei monociti M, vengono fatte transitare singolarmente in successione in una sezione includente un passaggio calibrato o capillare, sui due lati dei quali si trovano in posizioni contrapposte due elettrodi 120 e 121, nel caso di un conta-

particelle elettrico. La sezione includente il suddetto passaggio calibrato può essere, come nell'esempio raffigurato, un tratto terminale del percorso 3, opportunamente dimensionato per consentire il passaggio in successione delle particelle obiettivo; un tale passaggio calibrato può in ogni caso essere definito lungo il percorso 3 o anche all'interno della sezione 20.

Nel funzionamento, tra i due elettrodi 120, 121 viene fatta transitare una corrente elettrica, preferibilmente costante. Il passaggio di una particella tra gli elettrodi 120 e 121 causa un'alterazione della corrente elettrica che transita tra i due elettrodi, ovvero una variazione di resistenza elettrica, consentendone il relativo conteggio. In generale, la variazione di corrente, o di resistenza, sarà proporzionale alle dimensioni della particella, consentendo la rilevazione della sua tipologia. La suddetta variazione può essere poi trasformata in un relativo impulso di tensione per ogni particella transitata. Tramite una logica di controllo viene quindi memorizzata l'ampiezza in tensione di ogni impulso, dove la differente ampiezza corrisponde ad una differente dimensione della particella, per poter infine conteggiare il numero di cellule differenziate in base alla dimensione (ovvero la tipologia). Un tale tipo di implementazione può essere agevolato conoscendo la conducibilità del fluido circolante; campi di conducibilità possono essere ricavati sperimentalmente e memorizzati in una logica di controllo del dispositivo MD; in ogni caso, in considerazione del fatto che nel tratto terminale del percorso 3 le particelle sono in massima parte disperse nel solo buffer, le caratteristiche di conducibilità di quest'ultimo possono essere agevolmente conosciute a priori. In tale ottica, di preferenza, il buffer impiegato ha caratteristiche fisiche e/o elettriche predefinite, quale una conducibilità elettrica nota; preferibilmente il buffer ha una conducibilità predefinita e caratteristiche tali da non danneggiare eventuali legami funzionalizzati e/o anticorpi, in particolare ai fini della separazione e/o della rilevazione delle particelle.

Si noti che la disposizione di principio della figura 85 può essere intesa anche per il caso di un dispositivo di rilevazione ottico, nel quale caso gli elementi indicati con 120 e 121 saranno un emettitore ed un ricevitore di radiazione luminosa, rispettivamente; in tal caso il buffer ha preferibilmente una buona trasparenza al segnale ottico.

Nel caso di un dispositivo di rilevazione acustico, gli elementi 120-121 possono consistere di due trasduttori oppure essere sostituiti da un unico trasduttore. Ad

esempio, un trasduttore unico può essere concepito per indirizzare nel fluido energia sonora, preferibilmente energia ultrasonica a larga banda, operando sia da trasmettitore che da ricevitore. Una particella che si viene a trovare nella regione focale del trasduttore riflette l'energia, generando un impulso di eco proporzionale alla dimensione della particella.

Il dispositivo secondo l'invenzione può ulteriormente essere provvisto di una disposizione o sezione configurata per allineare le particelle, ovvero disporle sostanzialmente in fila l'una dietro l'altra, ad esempio ai fini di un successivo conteggio tramite un conta-particelle.

Un esempio schematico di questo tipo è illustrato in figura 86, in accordo al quale il dispositivo MD ha una sezione 130-131 di allineamento acustico delle particelle, a monte di un dispositivo rilevatore 120-121, che qui si supponga essere un conta-particelle 120-121. Il conta-particelle 120-121 può essere del tipo con elettrodi (resistivo o capacitivo), oppure ottico, o ancora di tipo acustico, preferibilmente distinto dal sistema di allineamento. L'impiego di un sistema di allineamento, nel corpo 2 o nella sezione 20, consente ad esempio il conteggio della particelle anche in condotti non necessariamente capillari, ovvero con larghezza maggiore di quella della cellula, in quanto l'allineamento non viene realizzato dal condotto, ma tramite mezzi acustici.

In figura 86, 130 e 131 indicano i mezzi atti a generare il segnale acustico di allineamento, ad esempio in forma di elettrodi o trasduttori contrapposti. Nell'esempio le sezioni 120-121 e 130-131 sono ubicate lungo il percorso 3, ad esempio in prossimità del suo termine, oppure all'ingresso 22 della sezione 20; preferibilmente il relativo tratto dell'argine 10 è privo di vie di passaggio, onde evitare in questo tratto turbolenze che vanificherebbero l'allineamento. Preferibilmente il buffer ha caratteristiche tali da agevolare la generazione e/o propagazione e/o rilevazione del segnale acustico.

La figura 87 illustra invece il caso di mezzi per separare o spostare particelle tramite onde acustiche. Questi mezzi comprendono ad esempio una sezione includente due trasduttori 140-141 acustici, quali elettrodi di forma opportuna o interdigitati, il sistema di separazione essendo preferibilmente basato sulla tecnica della foresi acustica.

Secondo il principio della foresi acustica, le particelle grandi M vengono concentrate al centro del percorso 3, mentre le particelle più piccole, indicate con m,

vengono spostate ai lati del percorso 3, per poi essere scaricate in almeno un condotto periferico, qui due condotti indicati con 9c, preferibilmente comunicanti con i condotti di scarico 9 o 23.

Preferibilmente i trasduttori 140-141 sono ubicati in una prima zona di un condotto microfluidico del dispositivo MD, quale il percorso 3, mentre i mezzi di rilevazione 120-121 sono ubicati in una seconda zona di un condotto microfluidico del dispositivo MD, quale il percorso 3; in particolare, il condotto o i condotti periferici 9c sono collegati al detto condotto microfluidico 3 in una zona compresa tra detta prima zona e detta seconda zona.

Una sezione del tipo illustrato in figura 87 può essere impiegata come affinamento della separazione, ovvero dopo aver effettuato una prima separazione con metodo differente, quale una separazione meccanica o filtrazione; ad esempio, un sistema di foresi acustica è utilizzabile per separare le eventuali particelle residue (quali globuli rossi o globuli bianchi che non sono di interesse) dalle particelle obiettivo.

Si apprezzerà che, in varie forme di attuazione dell'invenzione, i mezzi di separazione o filtraggio a flusso miscelato comprensivi dagli relativi argini 10 e 11 con i relativi percorsi 8 e 9 potrebbero essere sostituiti da mezzi di separazione o filtraggio secondo altre soluzioni tecniche o tecnica nota, ferme restando altre caratteristiche dell'invenzione, quali ad esempio la separabilità della sezione 20, la previsione di una sezione di raccolta impiegante un substrato di materiale semiconduttore, l'uso di mezzi di separazione e/o conteggio e/o allineamento di tipo elettrico/elettronico, apparecchiature o kit per l'uso in abbinamento del dispositivo.

Come visto precedente i dispositivi secondo l'invenzione, ovverosia il dispositivo MD, considerato nel suo complesso, o le sue singole sezioni 1 e 20 considerate disgiuntamente, possono integrare componenti o disposizioni elettriche e/o elettroniche, ed in tale caso sono previsti opportuni mezzi di alimentazione elettrica rispetto ad un sistema esterno, quale ad esempio mezzi di connessione elettrica rispetto ad un'apparecchiatura di analisi.

Secondo una vantaggiosa versione inventiva, almeno una tra le sezioni 1 e 20 è provvista di mezzi di alimentazione elettrica che operano in base ad un accoppiamento di tipo senza fili, ovvero di tipo *wireless* o *pinless*, quale un accoppiamento con isolamento

galvanico o con un'induzione di energia tramite avvolgimenti accoppiati, comprendenti ad esempio un'antenna o un avvolgimento appartenente al dispositivo MD (sezioni 1 e/o 20) ed un'antenna o avvolgimento appartenente al suddetto sistema esterno.

Con riferimento alla figura 77, un dispositivo secondo l'invenzione può essere provvisto di un sistema comprendente avvolgimenti o antenne, che può essere sfruttato sia per fornire l'energia elettrica necessaria per l'effettuazione di funzioni di trasmissione e/o ricezione dati, sia l'energia elettrica necessaria all'esecuzione di almeno una delle ulteriori funzioni elettriche/elettroniche del dispositivo microfluidico precedentemente descritte.

La configurazione degli elementi indicati con C1 e C2 in figura 77 si presta a descrivere anche il caso in cui gli elementi C1 e C2 non appartengano ad un sistema di trasmissione e/o ricezione dati, ma ad un accoppiamento di potenza di tipo induttivo (noto anche come *pinless power coupling*) senza trasmissione di dati in radiofrequenza, del tipo includente un avvolgimento primario C1 schermato dietro un idoneo strato isolante, per l'accoppiamento induttivo con un avvolgimento secondario C2.

Anche in una tale attuazione, quindi, gli avvolgimenti C1 e C2 consentono quindi di alimentare la circuiteria elettronica del dispositivo MD, o delle sue sezioni 1 e/o 20, pur senza trasmissione o scambio di dati. Questa soluzione può essere particolarmente utile, ad esempio, per la sezione 20 del dispositivo che, anche quando separata dal corpo 2, può essere alimentata elettricamente in modo agevole. In tale realizzazione, quindi, la sezione 20 comprenderà l'antenna o avvolgimento secondario C2, ricevendo l'energia tramite l'antenna o avvolgimento primario C1. L'alimentazione elettrica così fornita può essere utilizzata per espletare le varie funzionalità elettriche/elettroniche integrate nella sezione 20, ad esempio per illuminare o eccitare particelle raccolte nella sezione stessa, tramite una sorgente ottica integrata, o ancora per fornire l'energia elettrica ad un riscaldatore, per un riscaldamento localizzato delle cellule, ad esempio per la coltura.

L'impiego di un sistema di alimentazione elettrica wireless o pinless presenta anche il vantaggio di consentire una rapida e agevole manipolazione del dispositivo MD o delle sezioni 1 e/o 20, evitando il rischio di rottura di terminali elettrici a seguito di errata e/o forzata inserzione. A questo scopo si consideri che i terminali per connettori possono risultare delicati, soprattutto quando appartenenti a connettori elettrici

miniaturizzati, Un'alimentazione di tipo wireless o pinless fa venire meno la necessità di un connettore elettrico, con i rischi di rottura conseguenti.

L'antenna o l'avvolgimento C2 può essere vantaggiosamente ottenuta su di un circuito stampato o PCB di cui la sezione 2 o 20 è provvista, come in precedenza già esemplificato, o ancora su parti in materiale isolante di tali sezioni, ad esempio in vetro o in plastica, con tecniche di per sé note, ad esempio tramite serigrafia o deposizione di paste conduttive. L'antenna o avvolgimento citato può naturalmente essere integrato anche in un supporto in silicio del dispositivo.

Va ancora notato che un circuito di controllo del tipo precedentemente indicato con 80, 81 con riferimento alla figura 77 può appartenere ad un apparati di laboratorio o di analisi aventi funzionalità diverse da quelle esemplificate, e quindi apparati non necessariamente destinati a far circolare uno o più fluidi. Un tale circuito di controllo può ad esempio essere integrato in un sistema di visione o in un microscopio, ad esempio al fine della rilevazione di particelle nella sezione 20 dopo averla separata dal corpo 2, oppure essere integrato in un apparato di supporto o immagazzinamento per dispositivi MD, oppure ancora integrato in un apparato di coltura.

La tecnica di separazione con flusso miscelato è stato descritta precedentemente con riferimento ad una miscelazione di un buffer del percorso 8 con un fluido biologico o sangue del percorso 3. Si consideri tuttavia che, al fine di realizzare la tecnica di separazione descritta, nel percorso 8 potrebbe essere fatta transitare una porzione dello stesso fluido biologico o sangue oggetto di analisi. Anche in una tale attuazione, il flusso ausiliario di sangue del percorso 8 viene convogliato tramite le vie 10a nel percorso 3, onde miscelarsi con l'altra porzione di sangue, ai fini già descritti, in particolare per determinare componenti di spinta, forze o moti turbolenti o irregolari nel flusso nel percorso 3. In tale modalità di impiego, quindi, sia nell'ingresso 4 che nell'ingresso 8 verrebbe iniettato il fluido da trattare o sangue.

E' chiaro che numerose varianti sono possibile per la persona esperta del ramo al dispositivo microfluidico descritto a titolo di esempio, senza per questo uscire dall'ambito dell'invenzione così come definita nelle rivendicazioni che seguono.

Le vie 10a dell'argine 10 sono state precedentemente descritte in riferimento ad una forma generalmente inclinata rispetto alla normale direzione di flusso nel percorso 3.

Tuttavia, in altre forme di attuazione di strutture di separazione a flusso miscelato, le vie 10a, o almeno alcune di esse, possono avere un orientamento o una forma differente, ad esempio essere ortogonali o inclinate in senso opposto al verso del flusso nel condotto 3, come evidenziato schematicamente nelle zone indicate con Z in figura 1. Anche una tale differente configurazione si dimostra adatta ad indurre turbolenze nel flusso del fluido biologico del condotto 3, a seguito dell'immissione in esso, tramite tali vie 10a, di un flusso di un fluido ausiliario, sia esso un buffer o sangue.

* * * * *

* * *

RIVENDICAZIONI

1. Un dispositivo microfluidico per separare o concentrare una sotto-popolazione di particelle da un fluido biologico, il dispositivo (MD) comprendendo:

- una prima sezione (1) o un primo corpo (2) provvisto di primi mezzi di filtraggio o di separazione sostanzialmente meccanica del fluido (3, 8, 9, 10, 11), i primi mezzi di separazione includendo almeno un primo percorso microfluidico (3), definito almeno in parte nella prima sezione (1) o primo corpo (2) ed avente un primo ingresso (4), per l'immissione di un fluido biologico (BL) nel primo percorso (3), ed almeno un'uscita (5, 5'), per il rilascio di un campione di fluido arricchito in una detta sotto-popolazione di particelle, il primo percorso (3) estendendosi almeno in parte tra il primo ingresso (4) e l'uscita (5, 5') per definire almeno una direzione di flusso;

- una sezione comprendente mezzi elettrici (20; 120-121; 130-131; 140-141) avente un rispettivo ingresso (22), in comunicazione di fluido con detto percorso microfluidico (3) e/o detta almeno un'uscita (5, 5') ed includente almeno uno tra secondi mezzi di filtraggio o separazione (24, 140-141), mezzi microfluidici (24), un dispositivo elettro-meccanico (40a), un dispositivo elettrico (40c), un dispositivo elettronico in forma miniaturizzata (40d), mezzi di rilevazione elettrici/elettronici (40, 120, 121), un dispositivo di trasmissione e/o ricezione di segnali (40d, C2), un dispositivo di tipo MEMS (40a), un dispositivo di tipo NEMS (40a).

2. Il dispositivo secondo la rivendicazione 1, in cui la sezione comprendente mezzi elettrici (20; 120-121; 130-131; 140-141) include un substrato o un dispositivo di materiale semiconduttore (40), particolarmente in silicio.

3. Il dispositivo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la sezione comprendente mezzi elettrici (20) ha un rispettivo ingresso (22) in comunicazione di fluido con la prima uscita (5; 5'), una rispettiva apertura di scarico (23) e mezzi elettrici e/o elettronici operativi a monte dell'apertura di scarico (23).

4. Il dispositivo secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui la sezione comprendente mezzi elettrici (120-121; 130-131; 140-141):

- comprende un corpo di raccolta (21) che è accoppiato meccanicamente ed idraulicamente in modo separabile al primo corpo (2), oppure

- comprende un corpo di raccolta (21) costituito da una prima porzione del primo corpo (2) che è formata integrale con una seconda porzione del primo corpo (2), il primo corpo (2) essendo predisposto per consentire la separazione tra la prima e la seconda porzione, particolarmente tramite rottura o taglio, oppure

- comprende un tratto del primo percorso (3) definito nel primo corpo (2).

5. Il dispositivo secondo la rivendicazione 2, in cui la sezione comprendente mezzi elettrici (20) comprende un corpo di involucro (21) che alloggia il substrato o dispositivo di materiale semiconduttore (40) ed integra almeno parzialmente condotti idraulici (22b, 23b) e/o mezzi di connessione elettrica (39; 42; C1) collegati al substrato o dispositivo di materiale semiconduttore (40).

6. Il dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui al primo corpo (2) è associato almeno uno tra un corpo superiore (26) ed un corpo inferiore (30), dove l'almeno uno tra il corpo superiore (26) ed il corpo inferiore (30)

- è configurato almeno in parte per realizzare funzioni di circuito stampato, e/o

- su di esso sono montati o integrati componenti elettrici e/o elettronici (31, 32, 34, 37, 39, 40; TS, EH), e/o

- integra o porta almeno parte (21, 40) di una sezione di raccolta o separazione (20) di un campione di fluido arricchito in detta sotto-popolazione di particelle.

7. Il dispositivo secondo la rivendicazione 1, comprendente almeno uno tra: mezzi di identificazione, quali un codice a barre (BC) o un dispositivo RFID (40d; C2), mezzi di memoria (BC; 40d), mezzi per la trasmissione e/o la ricezione di dati in modalità senza fili (C2), mezzi di alimentazione elettrica di tipo induttivo (C2), mezzi di interconnessione elettrica (39; 41-42; C2).

8. Il dispositivo secondo la rivendicazione 7, in cui almeno uno tra i mezzi di identificazione (BC) ed i mezzi di memoria (BC; 40d) contiene informazione rappresentativa di almeno uno tra tipo di campione, tipo di analisi a cui il campione deve essere sottoposto, dati o parametri di calibrazione di una apparecchiatura di analisi, dati identificativi del soggetto a cui appartiene il fluido biologico, dati derivanti da un'analisi, caratteristiche di almeno parte del campione.

9. Il dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente mezzi controllabili elettricamente (30, 31; 40c, 120-121, 130-131, 140,

141) per:

- applicare un campo elettrico o un segnale acustico atto ad indurre uno spostamento di particelle presenti nel flusso; e/o
- indurre agitazioni o turbolenze di particelle funzionalizzate o bead (BE) aggiunte al fluido biologico o a un fluido ausiliario; e/o
- effettuare una rilevazione di caratteristiche di particelle presenti nel flusso; e/o
- effettuare un conteggio di particelle presenti nel flusso; e/o
- realizzare un allineamento di particelle presenti nel flusso.

10. Il dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre almeno uno tra un riscaldatore elettrico (EH) ed un sensore di temperatura (TS).

11. Il dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre almeno uno tra un circuito integrato, un dispositivo di misurazione e/o di elaborazione di informazioni e/o grandezze fisiche, un dispositivo di illuminazione o di eccitazione, un dispositivo ottico di rilevazione, un dispositivo di memoria, un dispositivo di conteggio di particelle, un dispositivo sensore.

12. Il dispositivo secondo la rivendicazione 1, in cui il primo corpo (2) è configurato per:

- l'immissione di particelle funzionalizzate o bead (BE) separatamente rispetto al fluido biologico (BL), preferibilmente per il tramite di un relativo ingresso (6, 6') diverso dal primo ingresso (4), ed il successivo legame delle particelle funzionalizzate (BE) con particelle obiettivo (TC) proprie del fluido biologico all'interno del dispositivo (MD), preferibilmente nell'ambito del primo percorso (3), e/o
- l'immissione di un fluido ausiliario (LB) separatamente rispetto al fluido biologico.

13. Il dispositivo secondo la rivendicazione 9 o la rivendicazione 12, in cui i mezzi controllabili elettricamente comprendono mezzi per sottoporre le particelle funzionalizzate o le bead (BE) a forze di attrazione o repulsione mediante campi elettrici.

14. Il dispositivo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente inoltre almeno un secondo ingresso (6; 6') e/o un secondo percorso microfluidico (8; 8') per un fluido ausiliario (LB) destinato a miscelarsi nel primo

percorso (3) con il fluido biologico (BL), ed almeno una seconda uscita (7), per lo scarico di una frazione di una miscela (LB+BL) formata dal fluido biologico (BL) e dal fluido ausiliario (LB), particolarmente una frazione di miscela arricchita in particelle diverse dalle particelle di detta sotto-popolazione, dove in particolare almeno una parte del primo percorso (3) è delimitata lateralmente da almeno una parte del secondo percorso (8; 8') o è definito tra il secondo percorso (8; 8') ed un terzo percorso microfluidico (9) aventi ciascuno almeno una rispettiva porzione che è adiacente ad una porzione del primo percorso (3).

* * *

CLAIMS

1. A micro-fluidic device for separating or concentrating a sub-population of particles of a biological fluid, the device (MD) comprising:

- one first section (1) or one first body (2) provided with first means (3, 8, 9, 10, 11) for a substantially mechanical filtration or separation of the fluid, the first separation means including at least one first micro-fluidic flow path (3), defined at least partly in the first section (1) or first body (2) and having one first inlet (4), for admission of a biological fluid (BL) in the first flow path (3), and at least one outlet (5; 5') for releasing a fluid sample enriched in one said sub-population of particles, the first flow path (3) extending at least in part between the first inlet (4) and the first outlet (5, 5') for defining at least a flow direction;

- one section comprising electric means (20; 120-121; 130-131; 140-141) having a respective inlet (22), in fluid communication with said micro-fluidic flow path (3) and/or said at least one outlet (5, 5') and including at least one of second means for filtration or separation (24, 140-141), one micro-fluidic means (24), one electro-mechanical device (40a), one electric device (40c), one miniaturized electronic device (40d), electric/electronic detection means (40, 120, 121), one device for transmission and/or reception of signals (40d, C2), one MEMS-type device (40a), one NEMS-type device (40a).

2. The device according to claim 1, wherein the section comprising electric means (20; 120-121; 130-131; 140-141) includes a substrate or a device made of a semiconductor material (40), particularly made of silicon.

3. The device according to claim 1 or 2, wherein the section comprising electric means (20) has one respective inlet (22) in fluid communication with the first outlet (5; 5'), one respective discharge opening (23) and electric and/or electronic means operative upstream of the discharge opening (23).

4. The device according to any one of the preceding claims, wherein the section comprising electric means (120-121; 130-131; 140-141):

- comprises an accumulation body (21) which is mechanically and hydraulically coupled in a separable manner with the first body (2), or

- comprises an accumulation body (21) consisting of a first portion of the first body (2) which is formed integral with a second portion of the first body (2), the first body (2) being prearranged for allowing separation between the first and the second portion, particularly by breaking or cutting, or

- comprises an end portion of the first flow path (3) defined in the first body (2).

5. The device according to claim 2, wherein the section comprising electric means (20) comprises one casing body (21) housing the substrate or device of semiconductor material (40) and integrates at least partly hydraulic conduits (22b, 23b) and/or electric connection means (39; 42; C1) connected to the substrate or device of semiconductor material (40).

6. The device according to any one of the preceding claims, wherein the first body (2) is associated to at least one of an upper body (26) and a lower body (30), wherein the at least one of the upper body (26) and the lower body (30)

- is configured at least in part for performing the functions of a printed circuit, and/or

- has electric and/or electronic components (31, 32, 34, 37, 39, 40; TS, HE) mounted thereon, and/or

- integrates or carries at least part (21, 40) of an accumulation or separation section (20) of a fluid sample enriched in said sub-population of particles.

7. The device according to claim 1, comprising at least one of: identification means, such as a bar code (BC) or a RFID device (40d; C2), memory means (BC; 40d), means for wireless transmission and/or reception of data (C2), inductive-type electric supply means (C2), electric interconnection means (39; 41-42; C2).

8. The device according to claim 7, wherein the identification means (BC) and/or the memory means (BC; 40d) contain information representative of at least one of type of sample, type of analysis which the sample must undergo, calibration data or parameters of analysis equipment, identification data of the subject to whom the biological fluid belongs, data deriving from an analysis, characteristics of at least part of the sample.

9. The device according to any one of the preceding claims, comprising electrically controllable means (30, 31; 40c, 120-121, 130-131, 140, 141) for:

- applying an electric field or an acoustical signal adapted to induce a displacement of particles present in the fluid; and/or
- induce agitation or turbulence of functionalized particles or beads (BE) added to the biological fluid or to an auxiliary fluid; and/or
- carrying out a detection of particles present in the flow; and/or
- carrying out a computation of particles present in the flow; and/or
- obtaining an alignment of particles present in the flow.

10. The device according to any one of the preceding claims, also comprising at least one of an electric heater (EH) and a temperature sensor (TS).

11. The device according to any one of the preceding claims, also comprising at least one of an integrated circuit, a device for measuring e/o elaborating information and/or physical quantities, a lighting or excitation device, an optical detection device, a memory device, a device for computing particles, a sensor device.

12. The device according to claim 1, wherein the first body (2) is configured for:

- admission of functionalized particles or beads (BE) separately from the biological fluid (BL), preferably by means of corresponding inlet (6, 6') other than the first inlet (4), and the subsequent bonding of the functionalized particles (BE) with target particles (TC) proper of the biological fluid within the device (MD), preferably within the first flow path (3), and/or

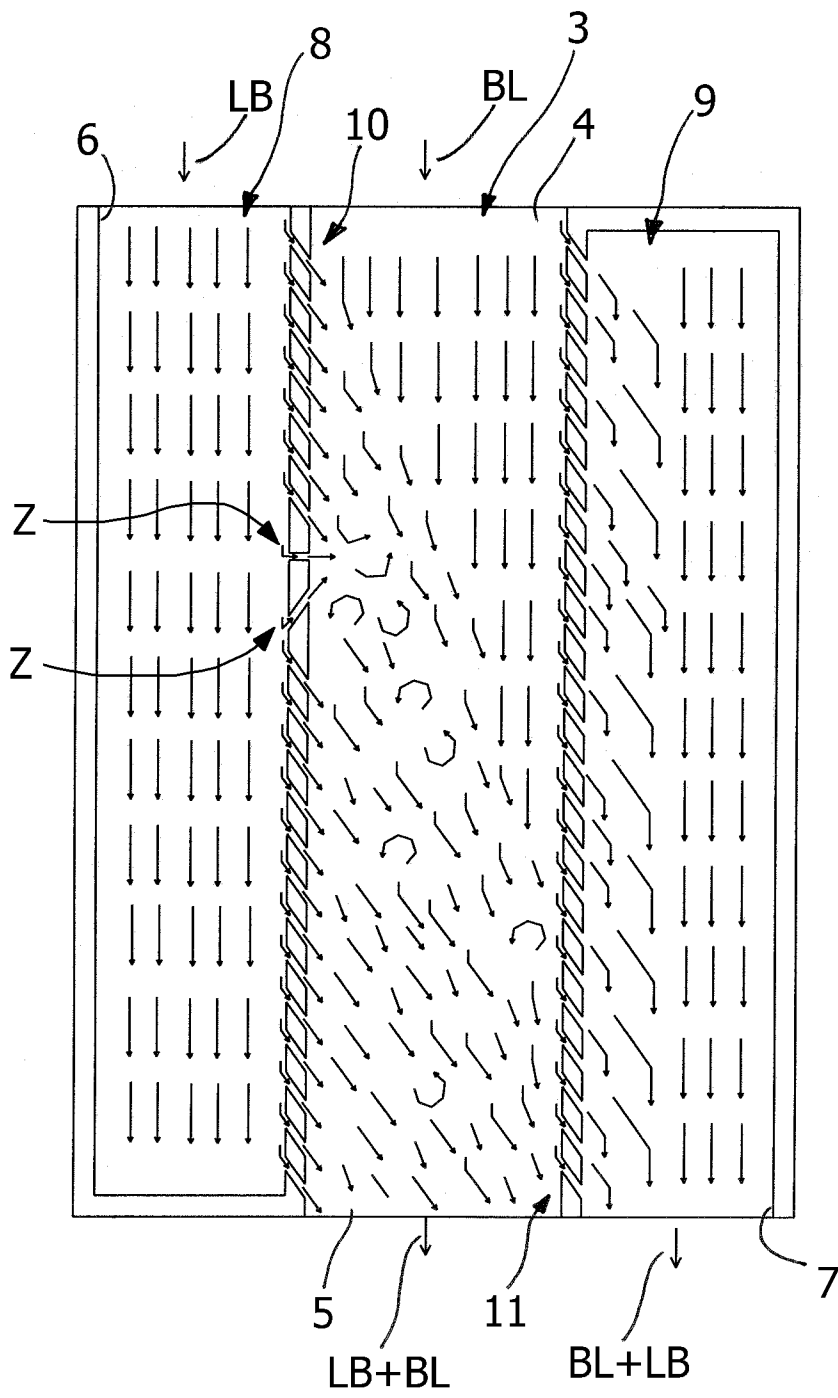
- admission of an auxiliary fluid (LB) separately from the biological fluid.

13. The device according to claim 9 or claim 12, wherein the electrically controllable means comprise means for subjecting the functionalized particles or beads (BE) to attraction or repulsion forces by electric fields.

14. The device according to any one of the preceding claims, also comprising at least one second inlet (6; 6') and/or a second micro-fluidic flow path (8; 8') for an auxiliary fluid (LB) designed for mixing in the first flow path (3) with the biological fluid (BL), and at least one second outlet (7), for discharging of a fraction of a mixture (LB+BL) formed by the biological fluid (BL) and the auxiliary fluid (LB), particularly a fraction of mixture enriched in particles other than the particles of said sub-population, where in particular at least one part of the first flow path (3) is sideways delimited by at least one part of the second flow path (8; 8') or is defined between the second flow path

(8; 8') and a third micro-fluidic flow path (9), each having at least one respective portion which is adjacent to a portion of the first flow path (3).

Fig. 1



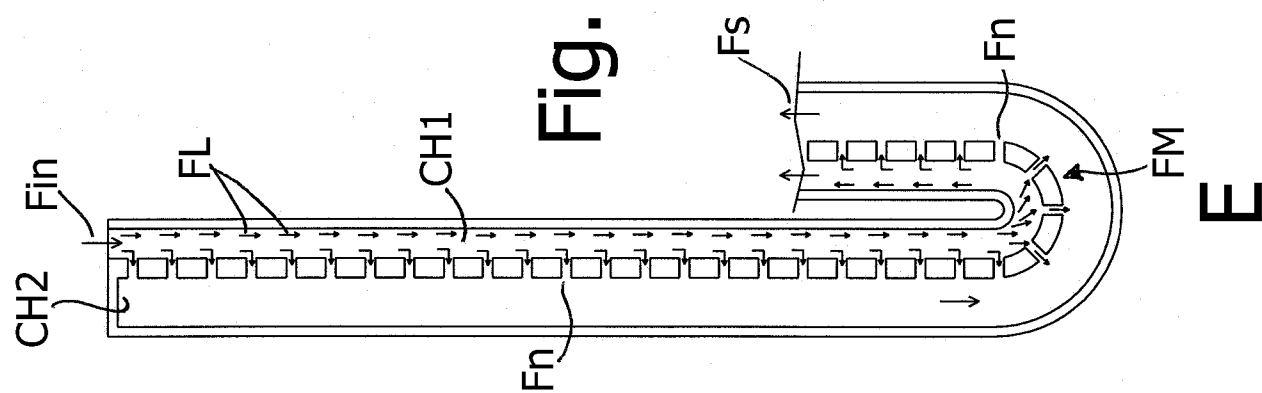
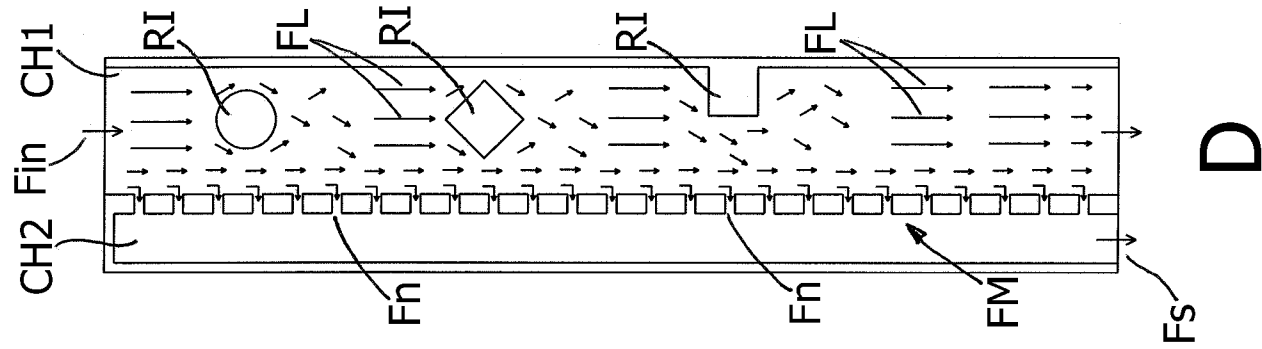
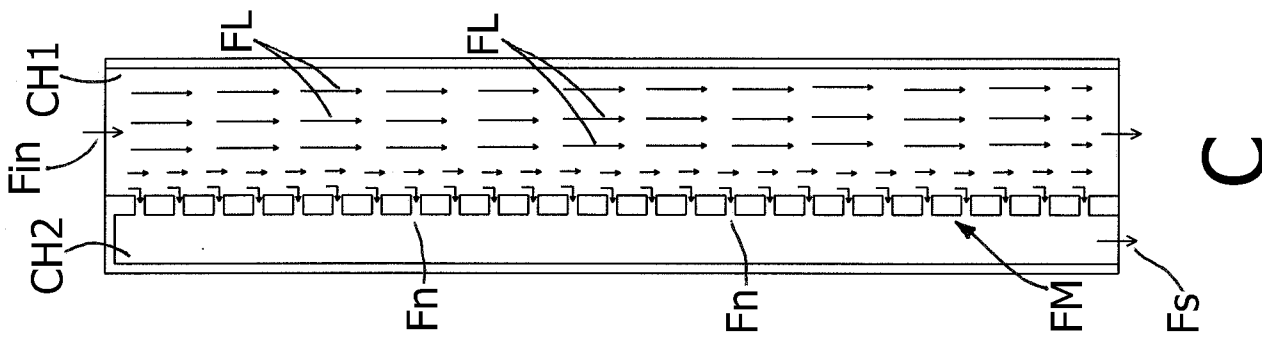
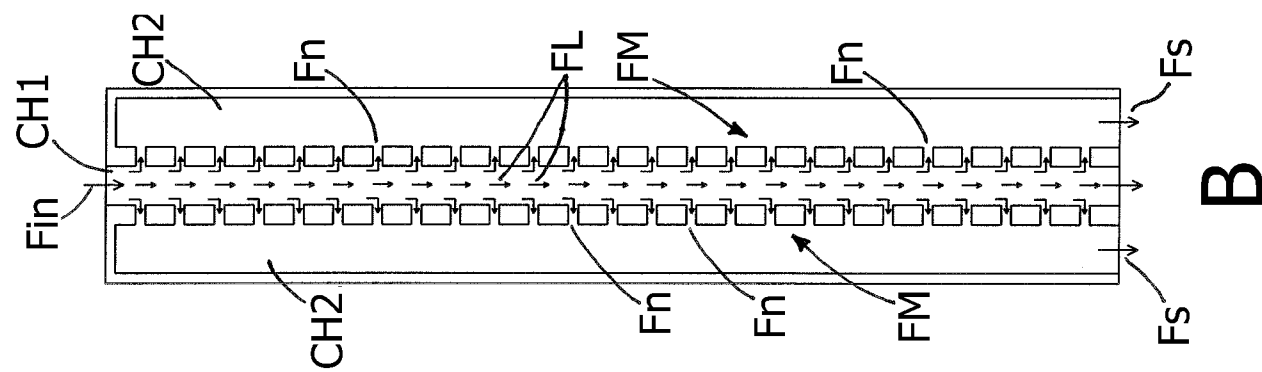
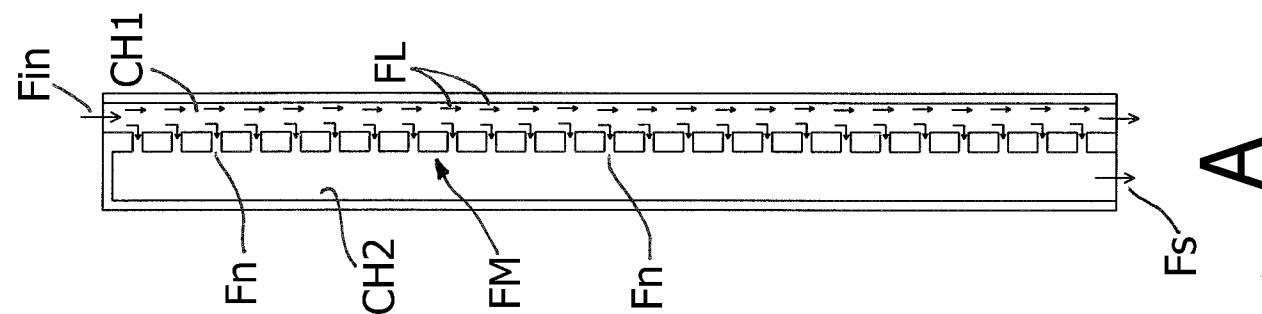


Fig. 2

Fig. 3

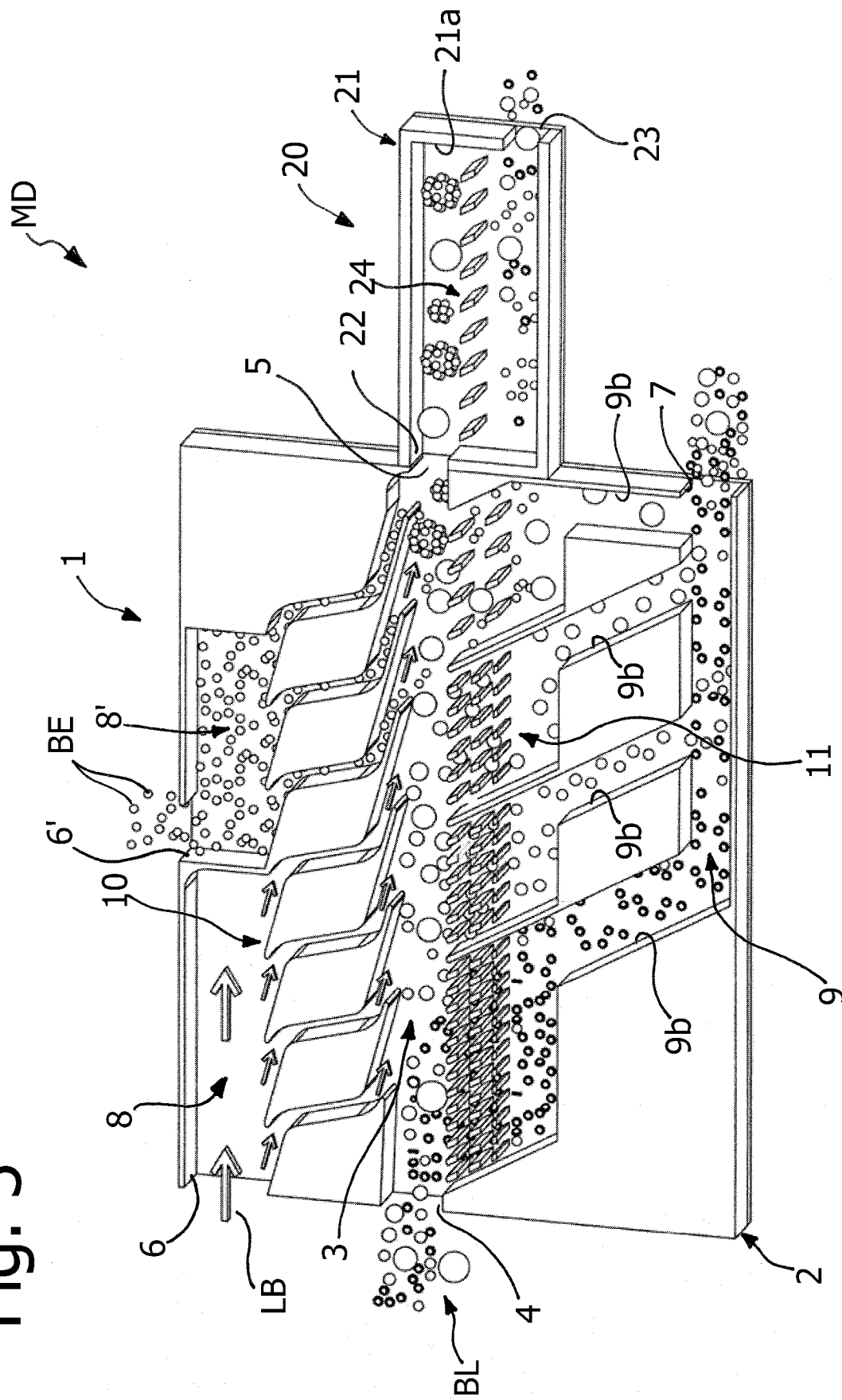
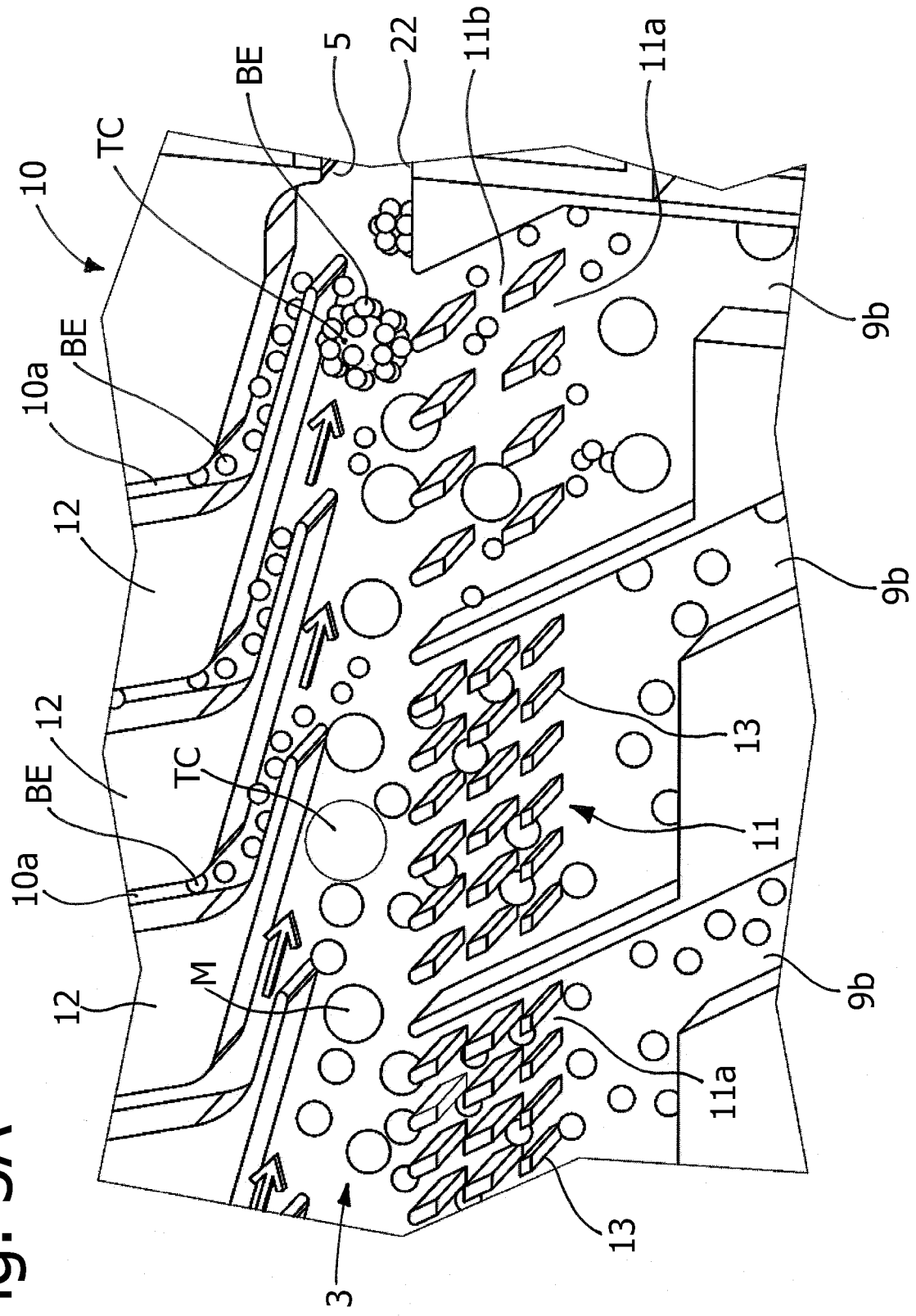
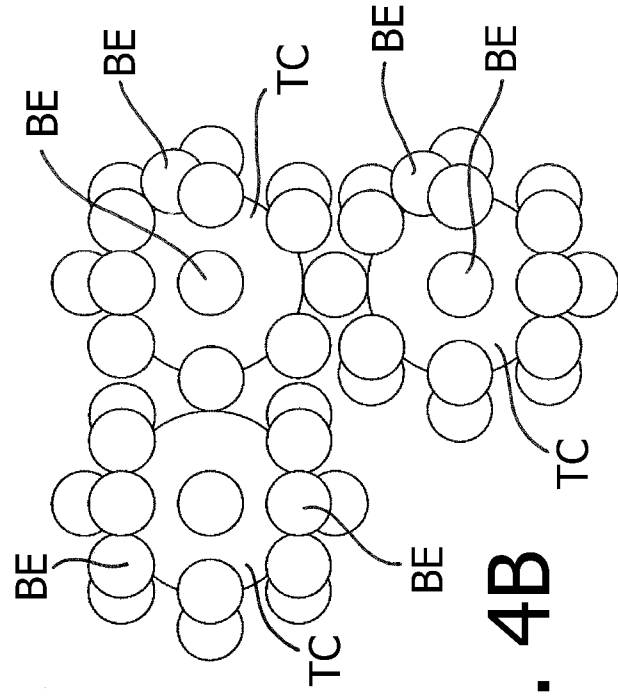
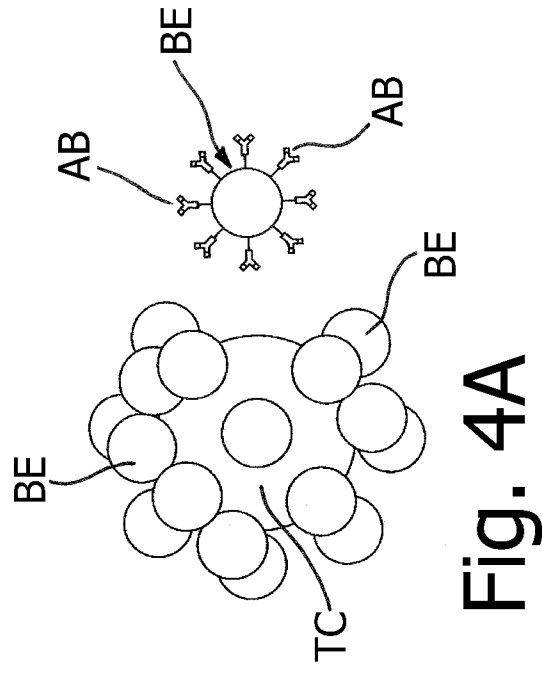
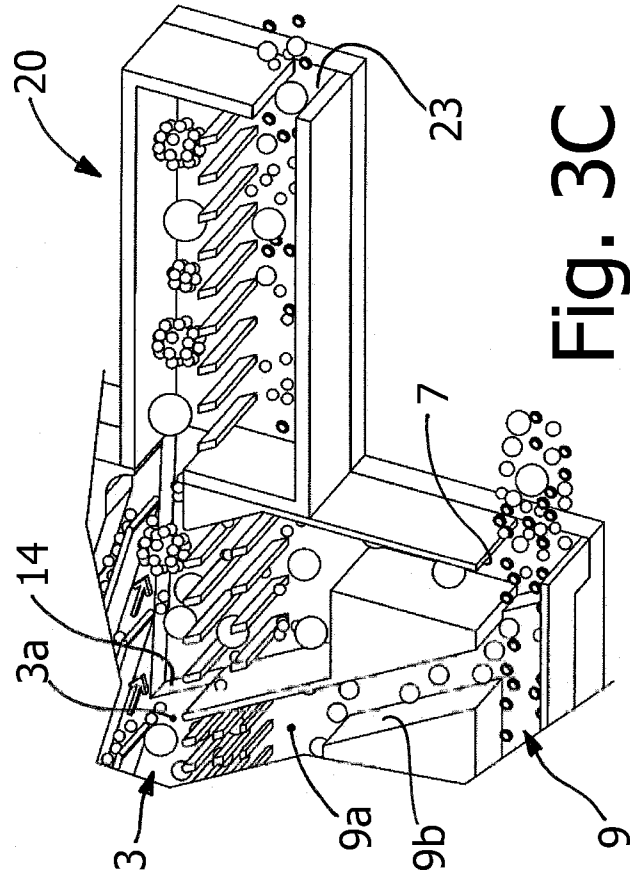
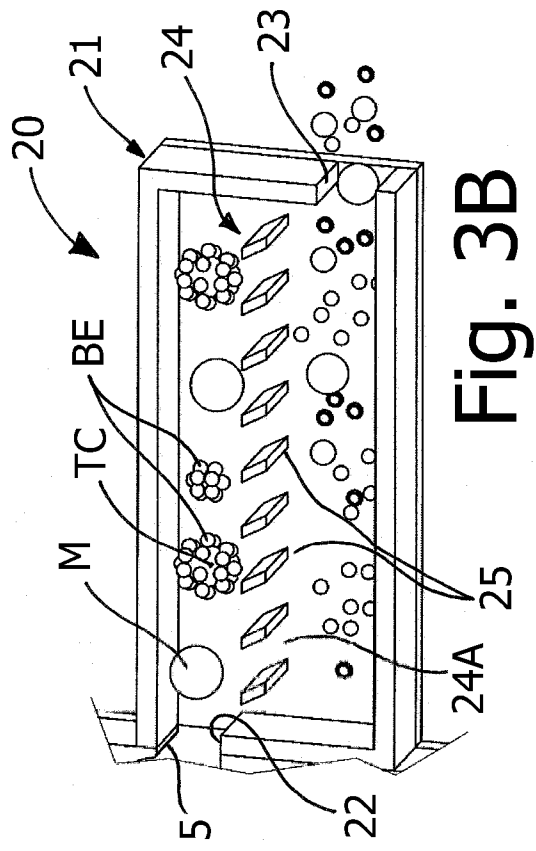


Fig. 3A





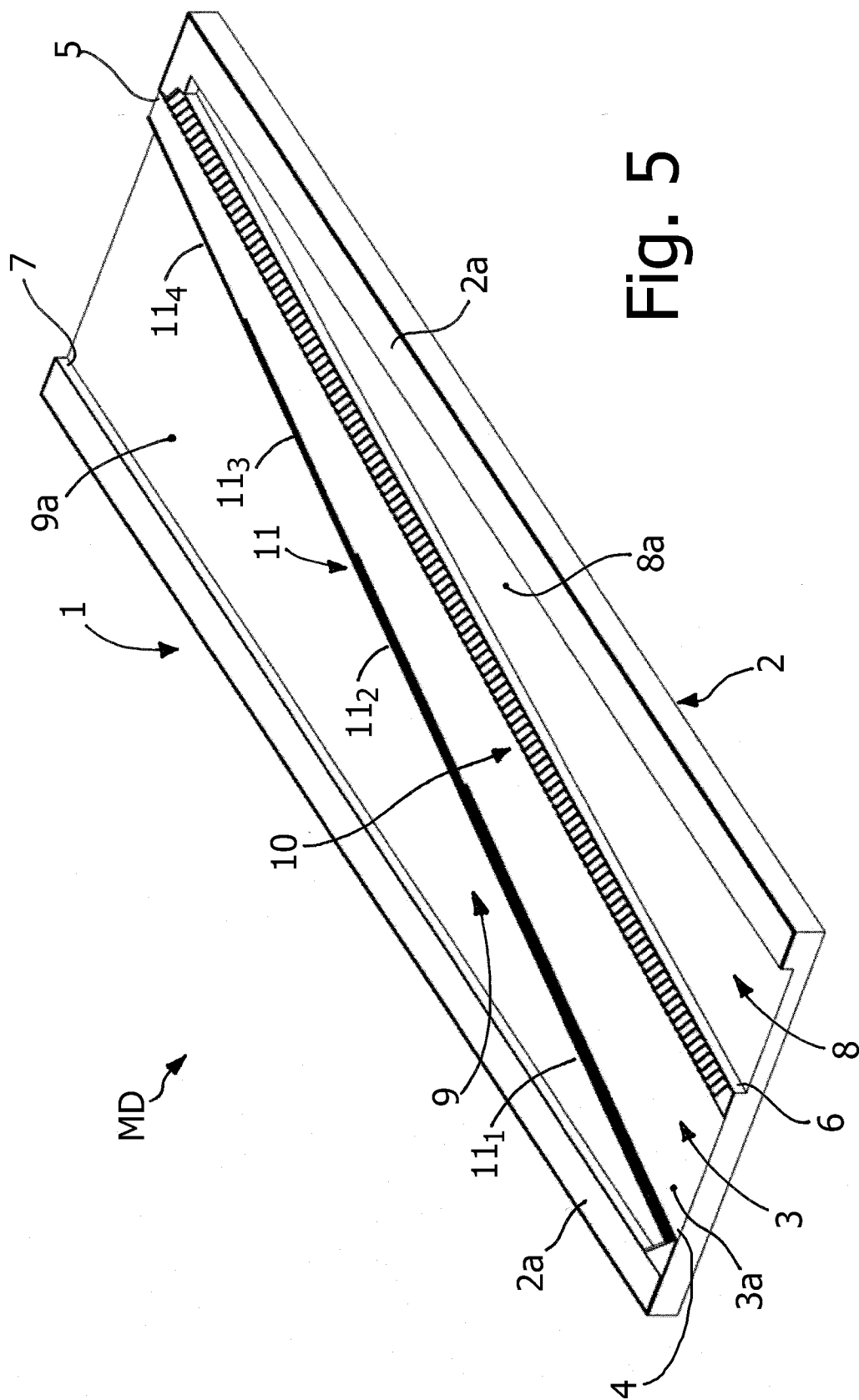
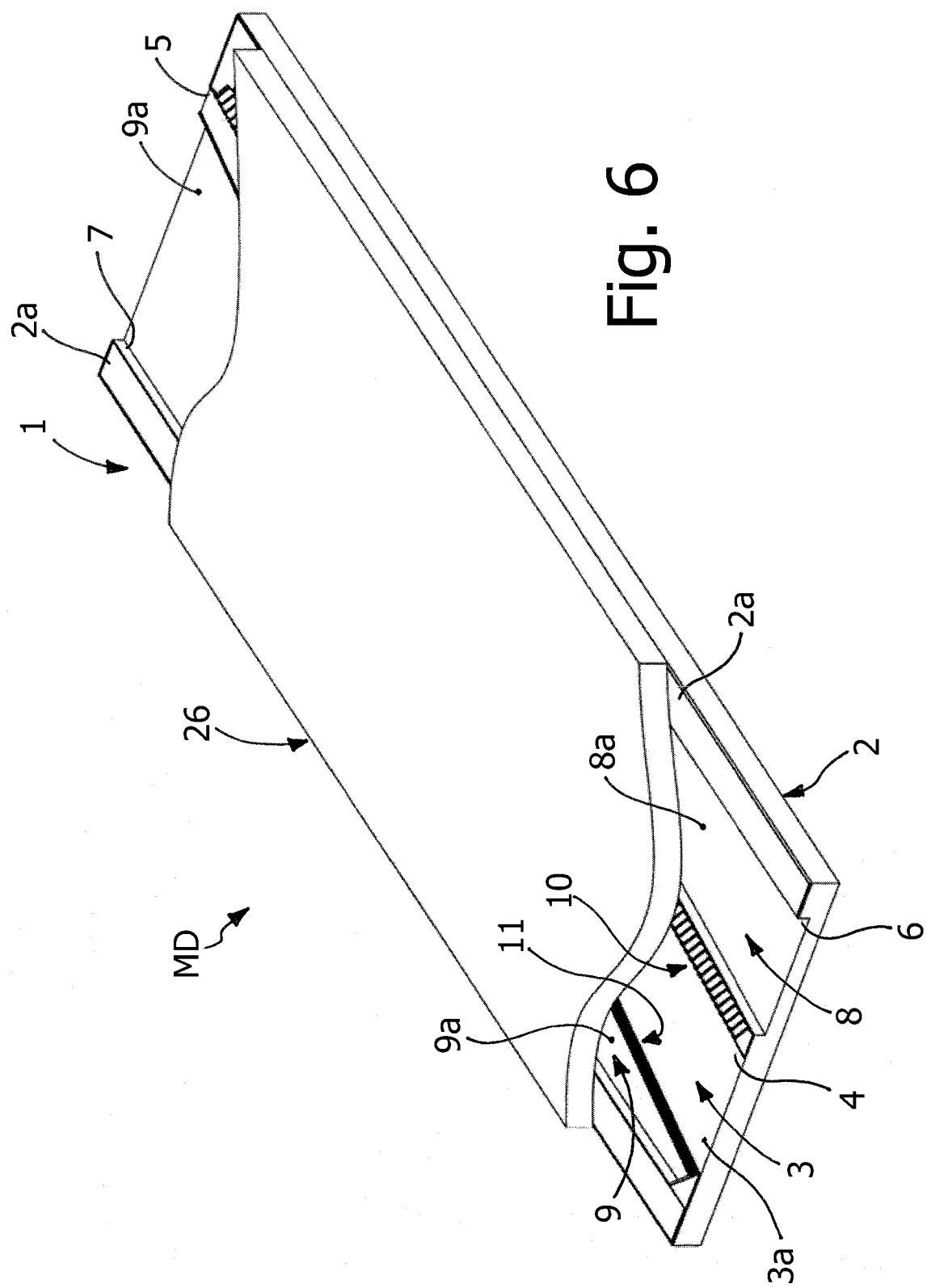


Fig. 5



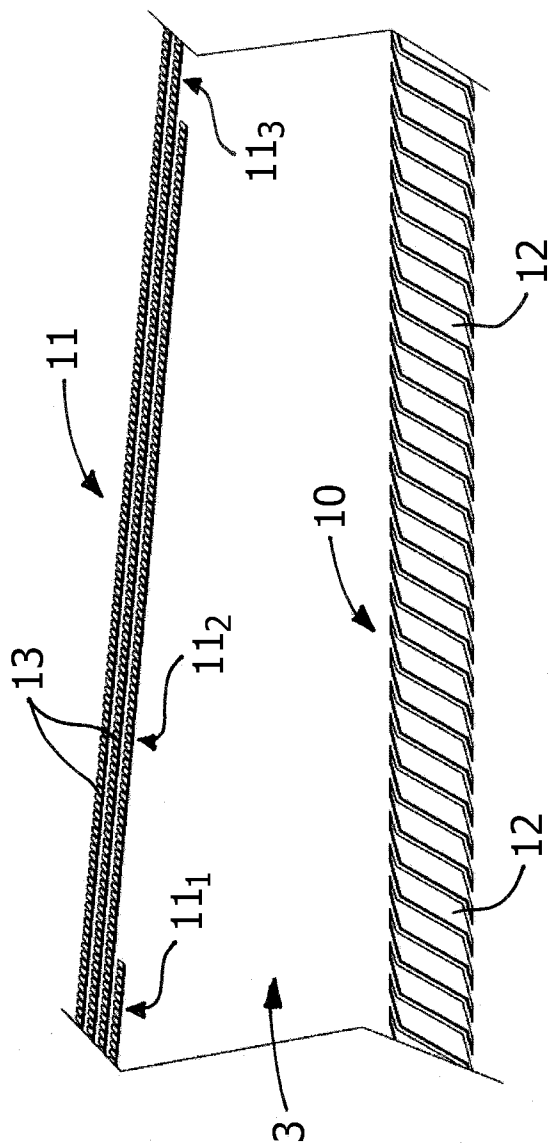


Fig. 7

Fig. 8

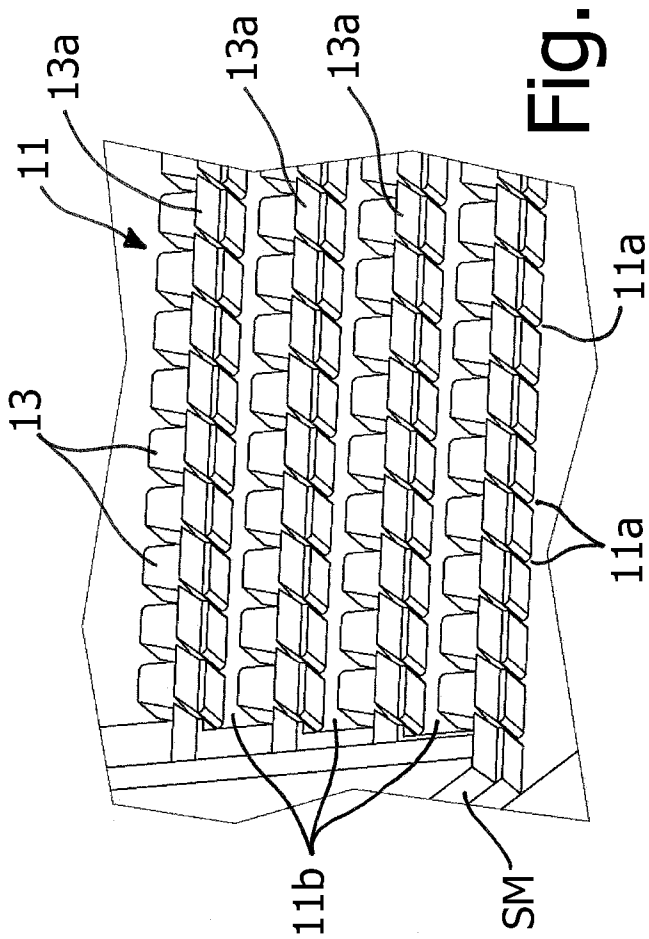
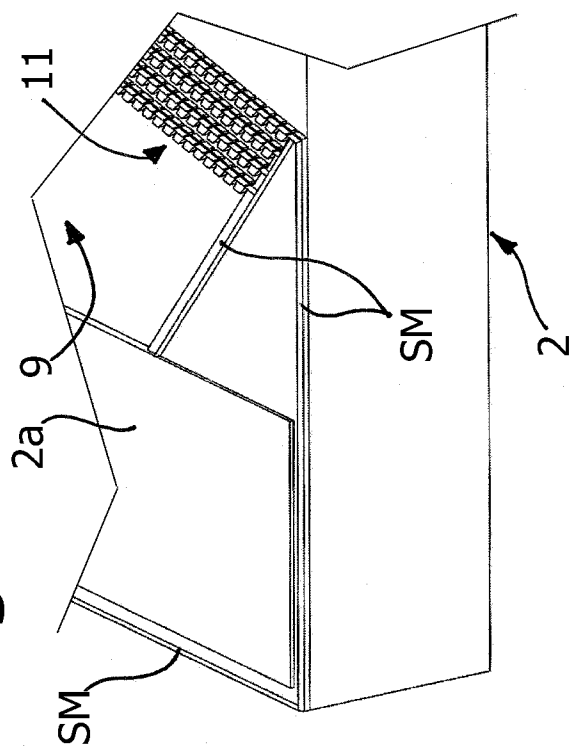


Fig. 9

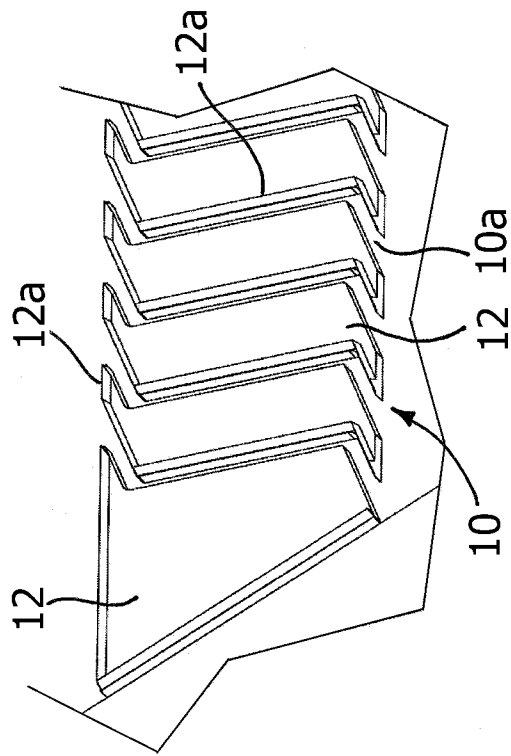


Fig. 10

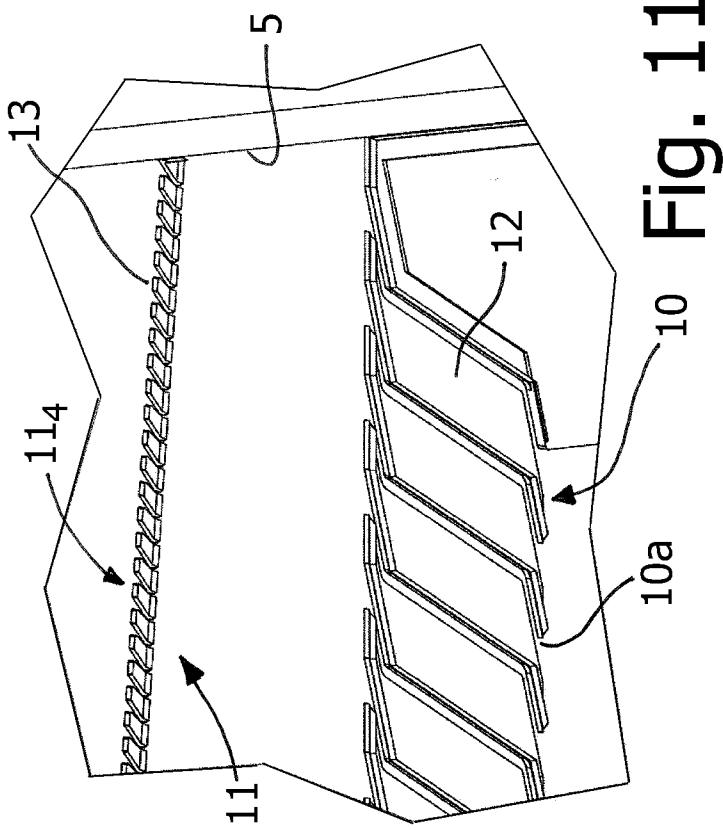


Fig. 11

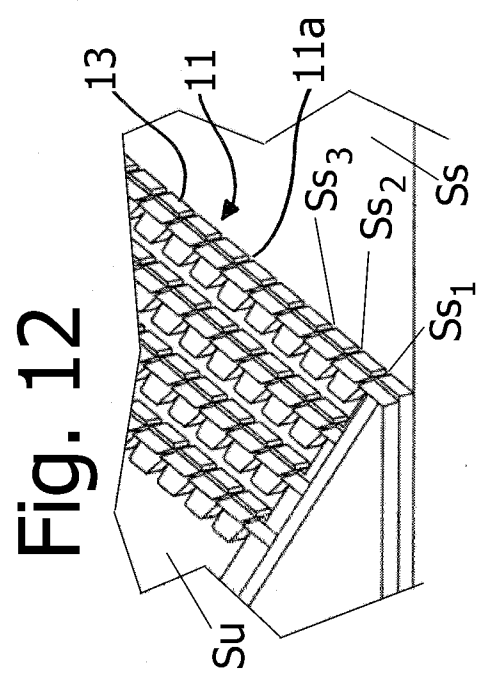


Fig. 12

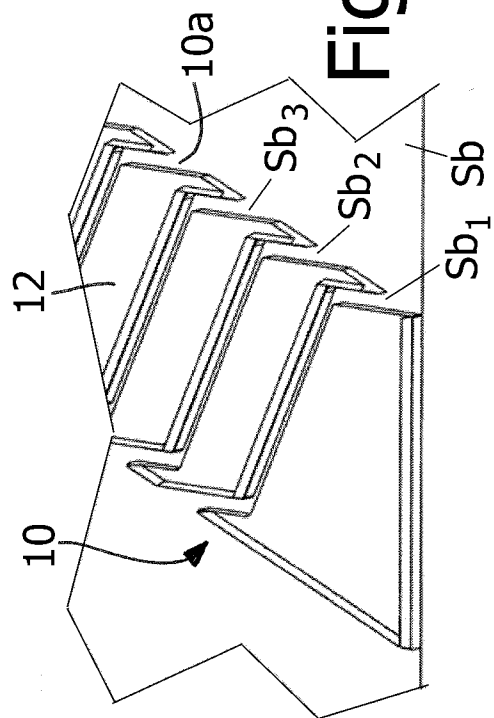


Fig. 13

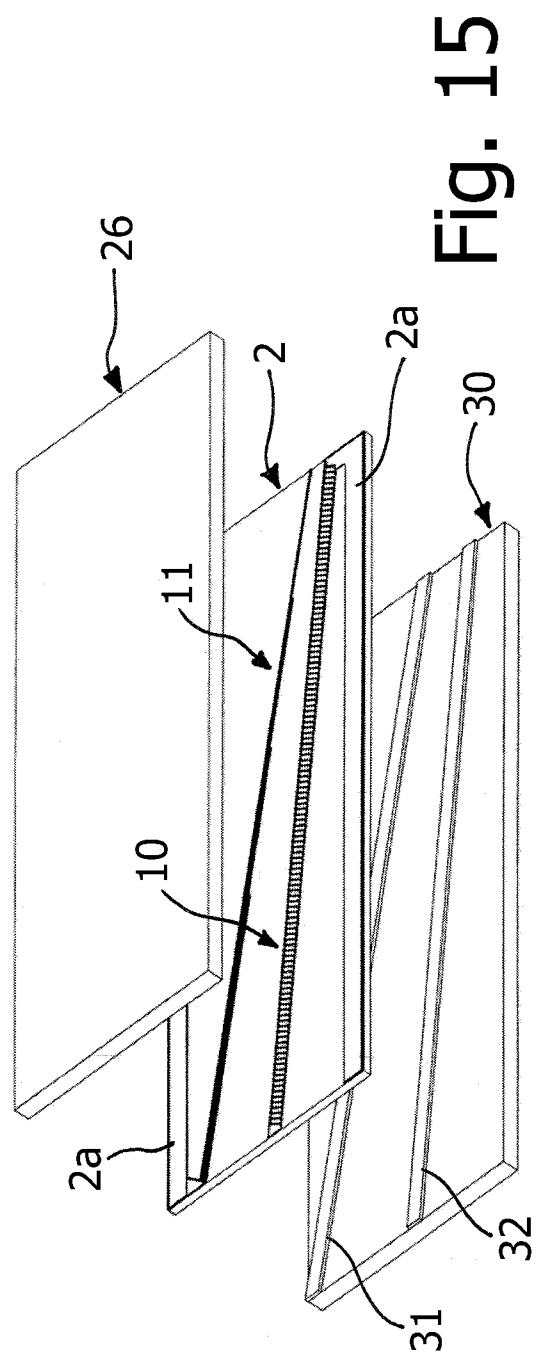
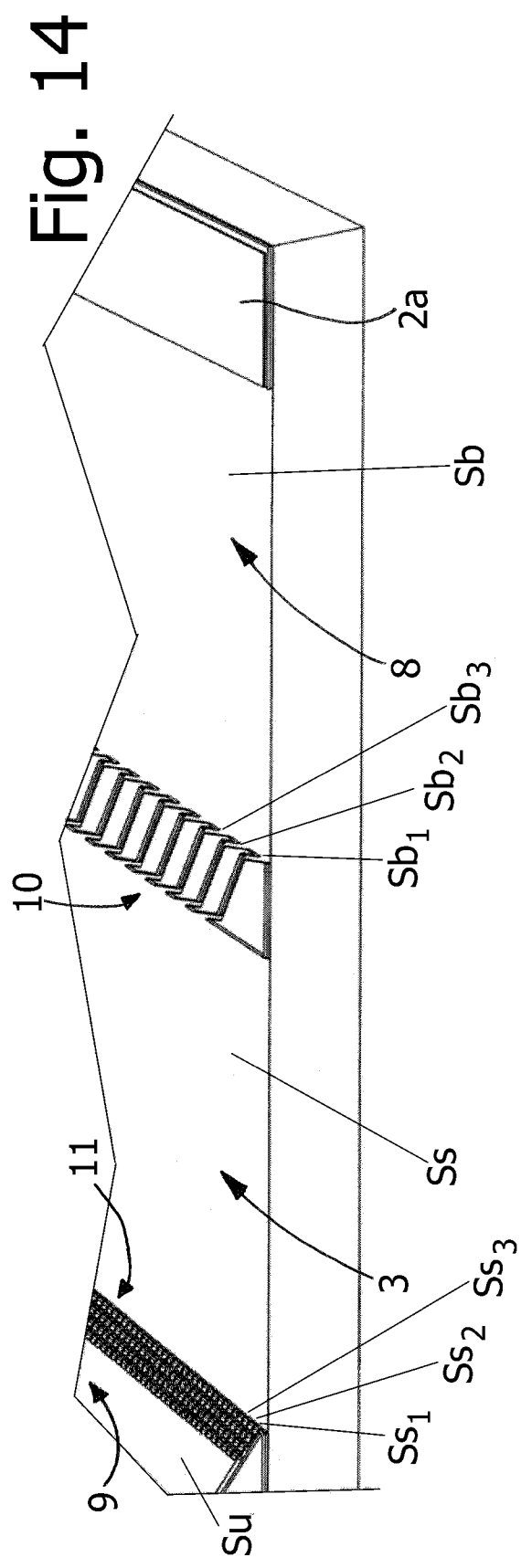


Fig. 16

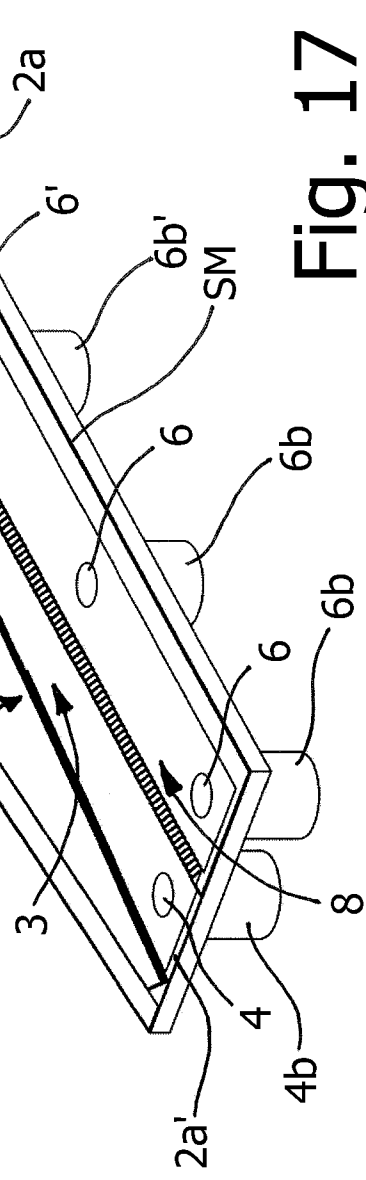
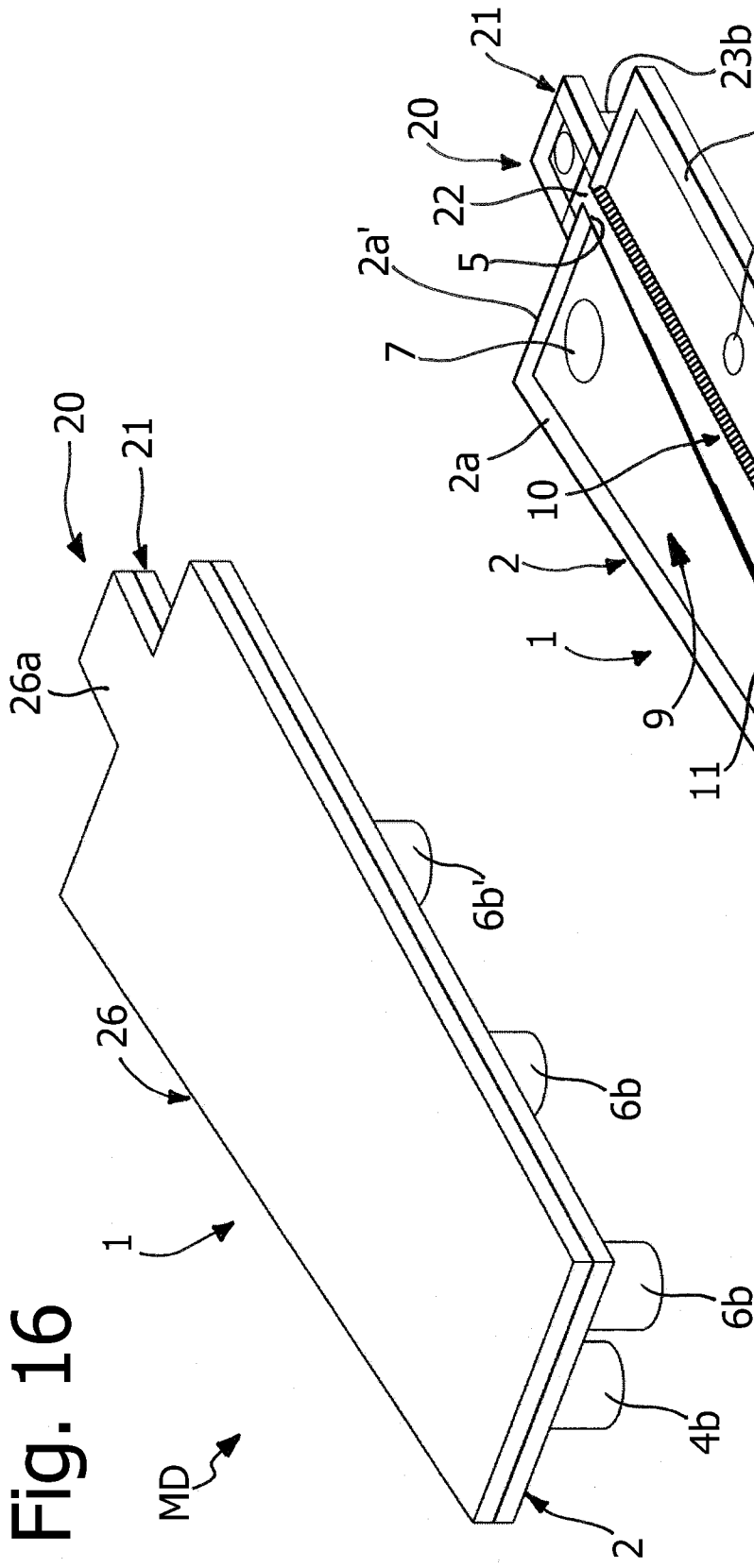


Fig. 17

Fig. 22

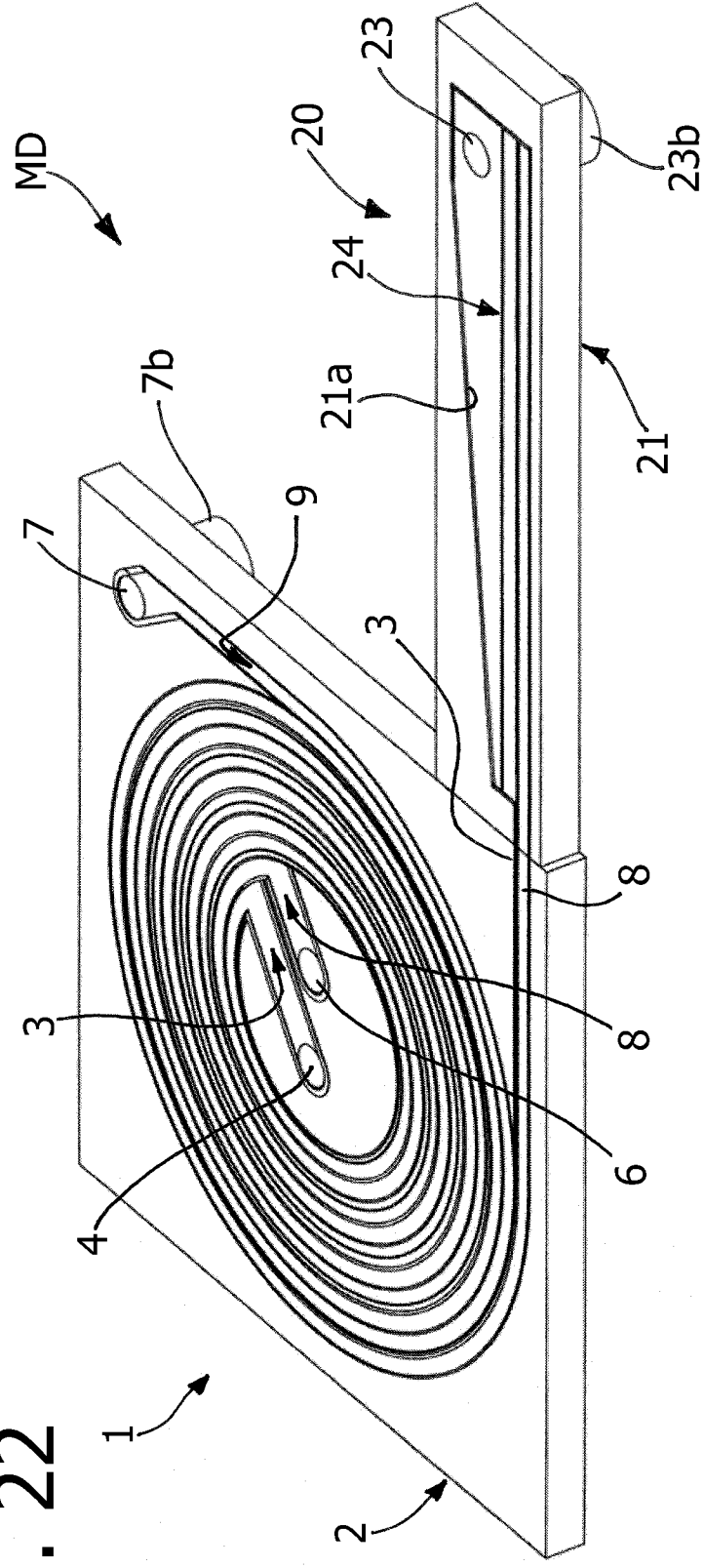


Fig. 25

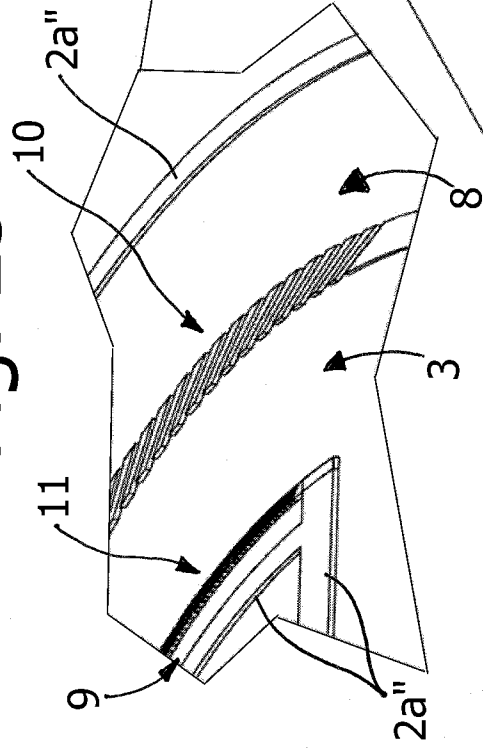


Fig. 24

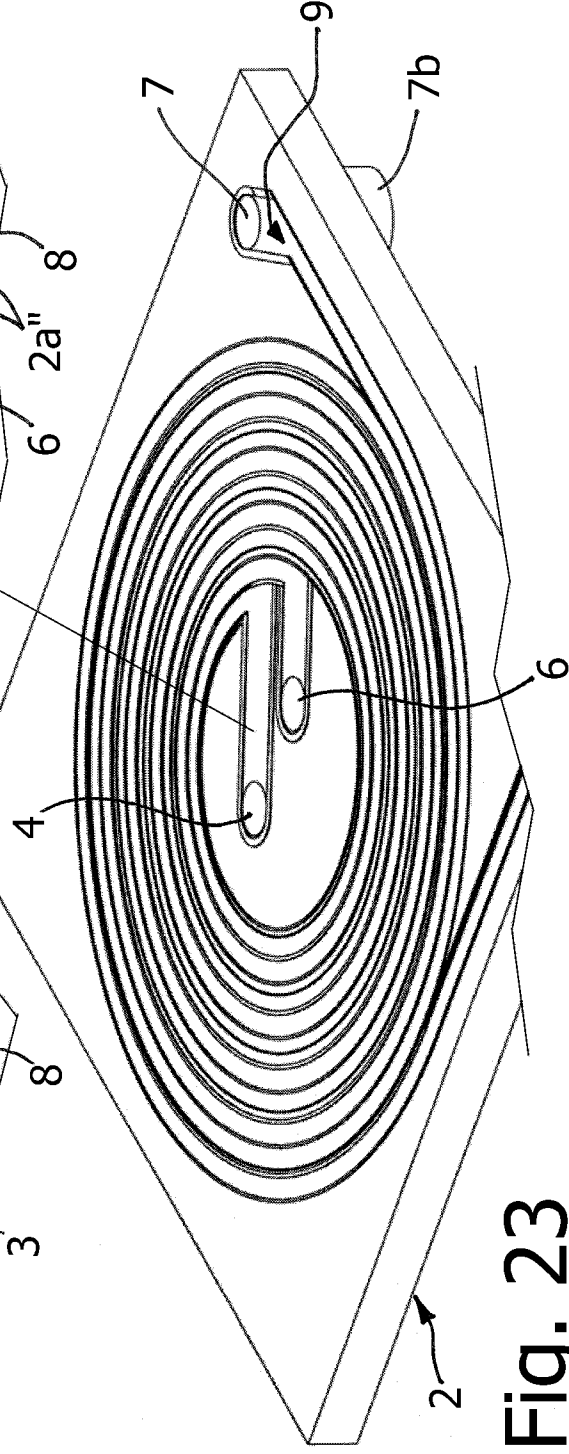
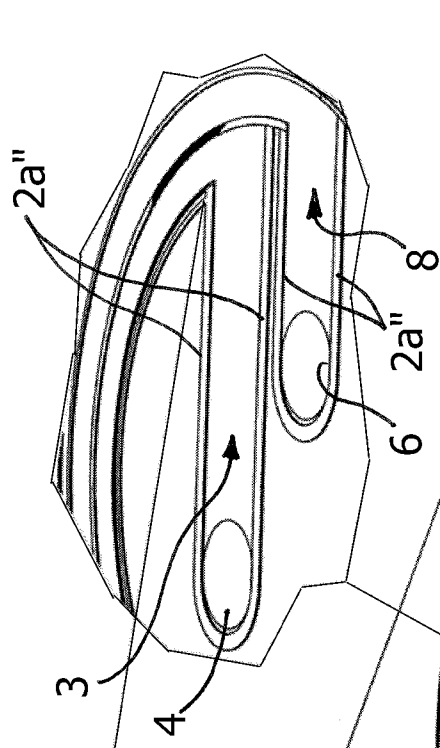


Fig. 23

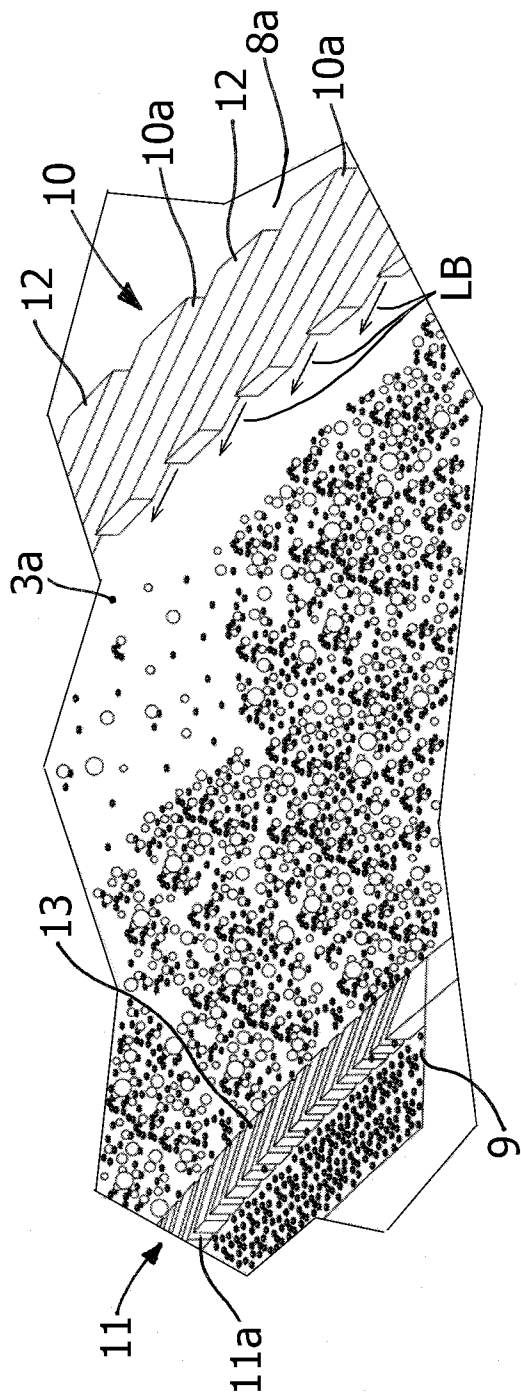


Fig. 26

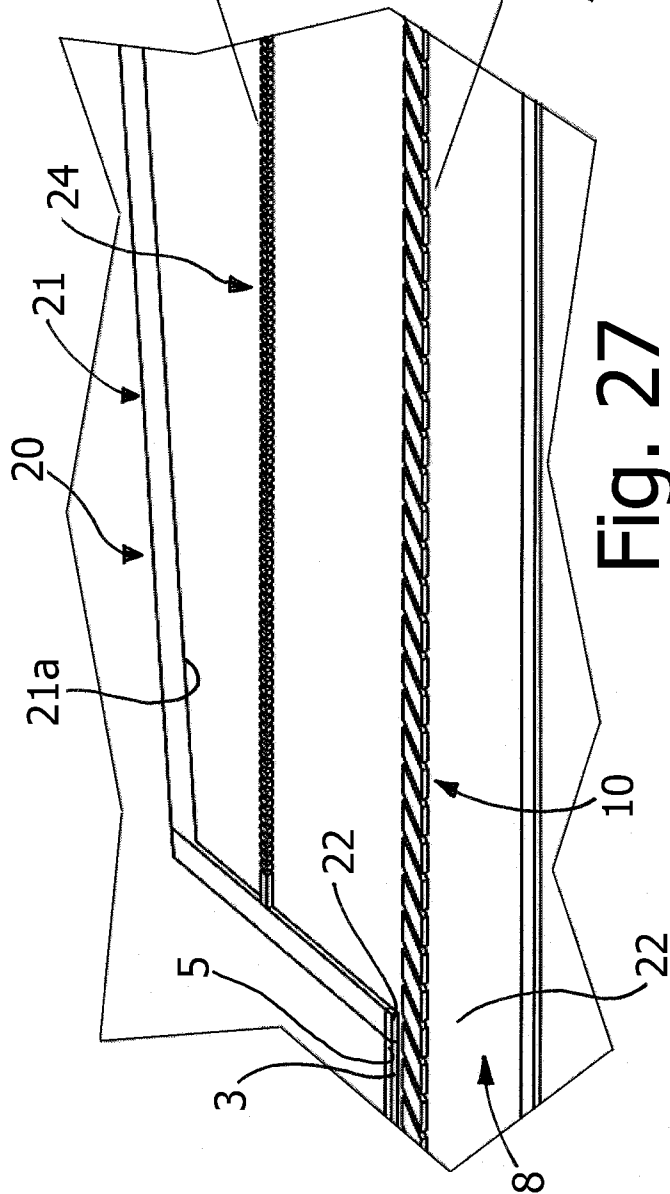


Fig. 27

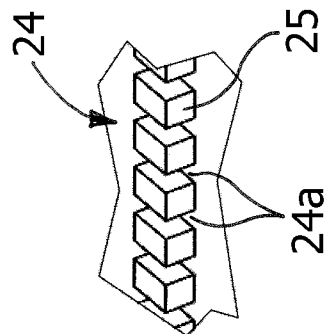


Fig. 28

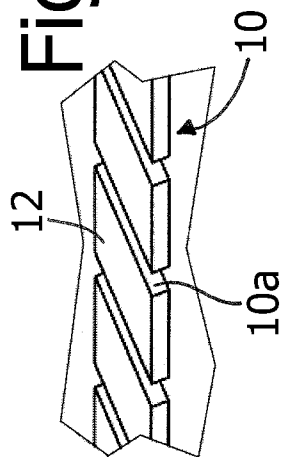


Fig. 29

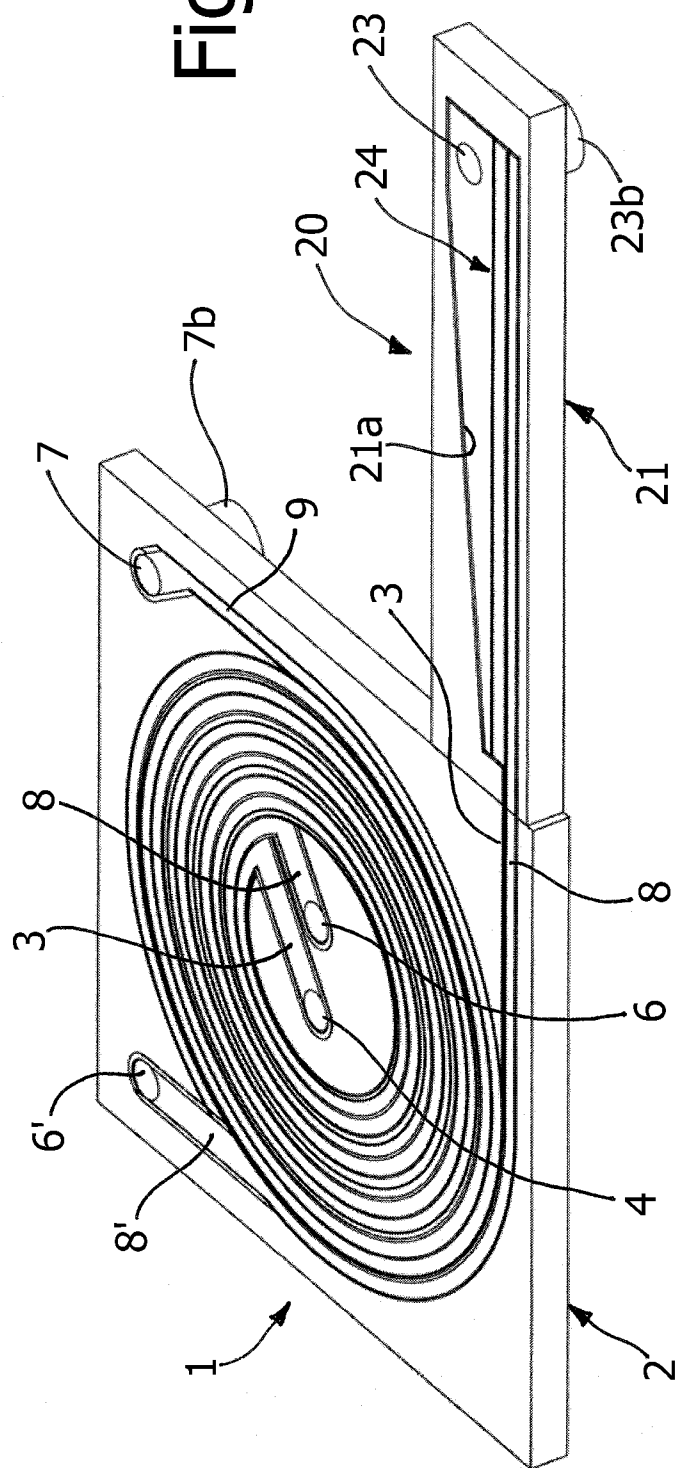
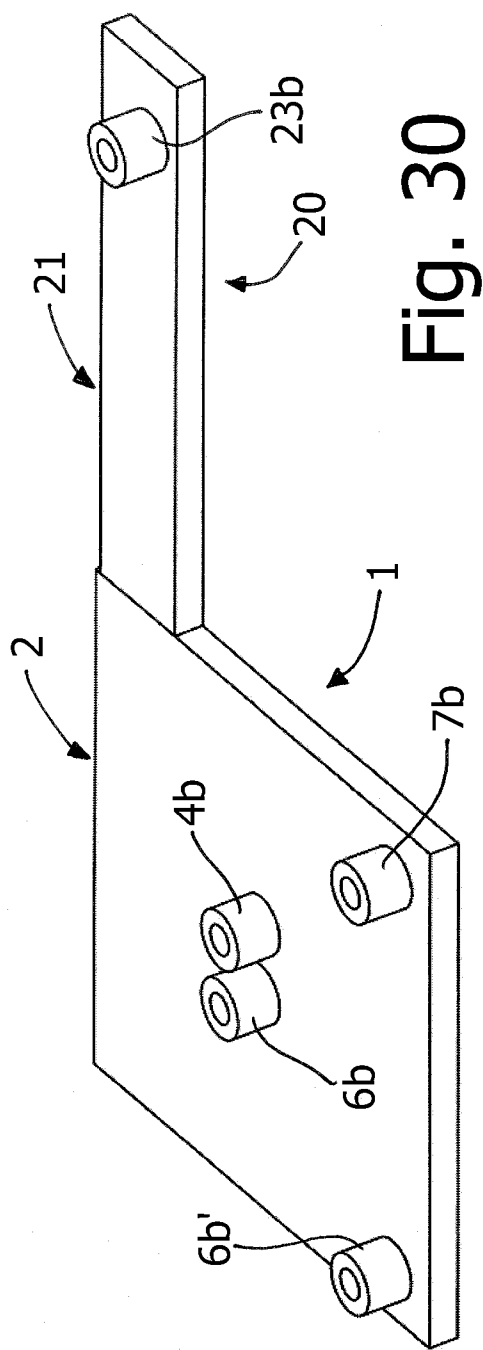


Fig. 32

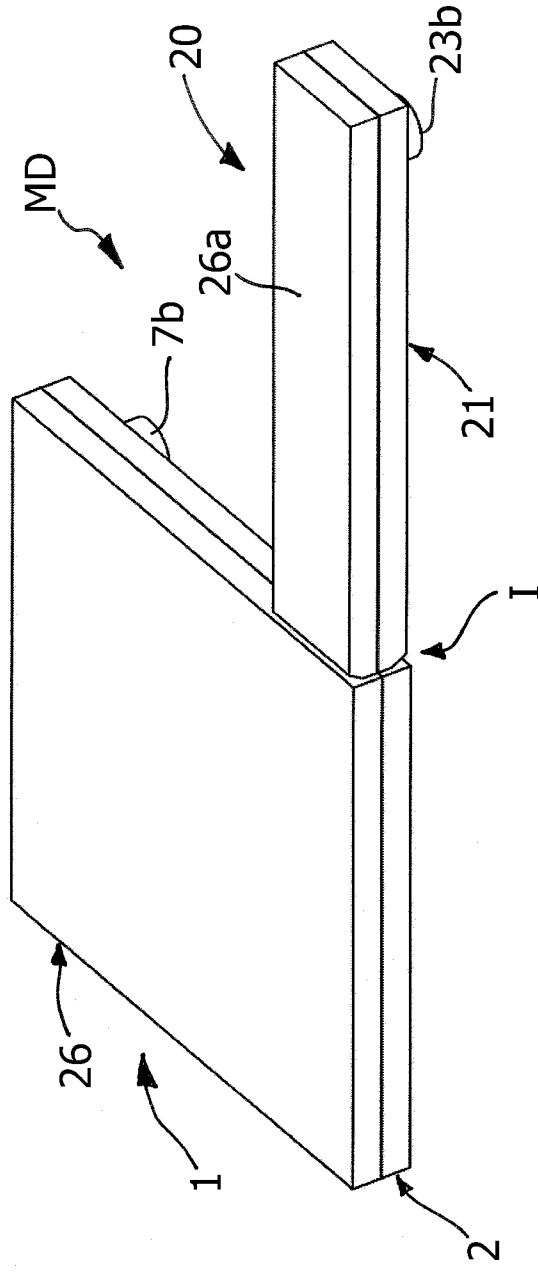


Fig. 34

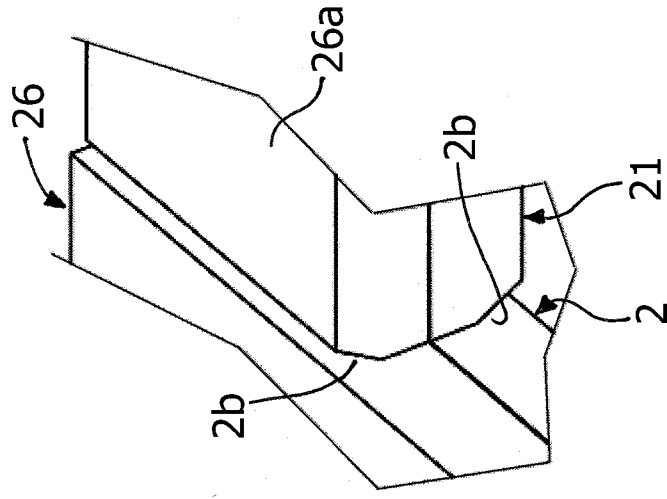
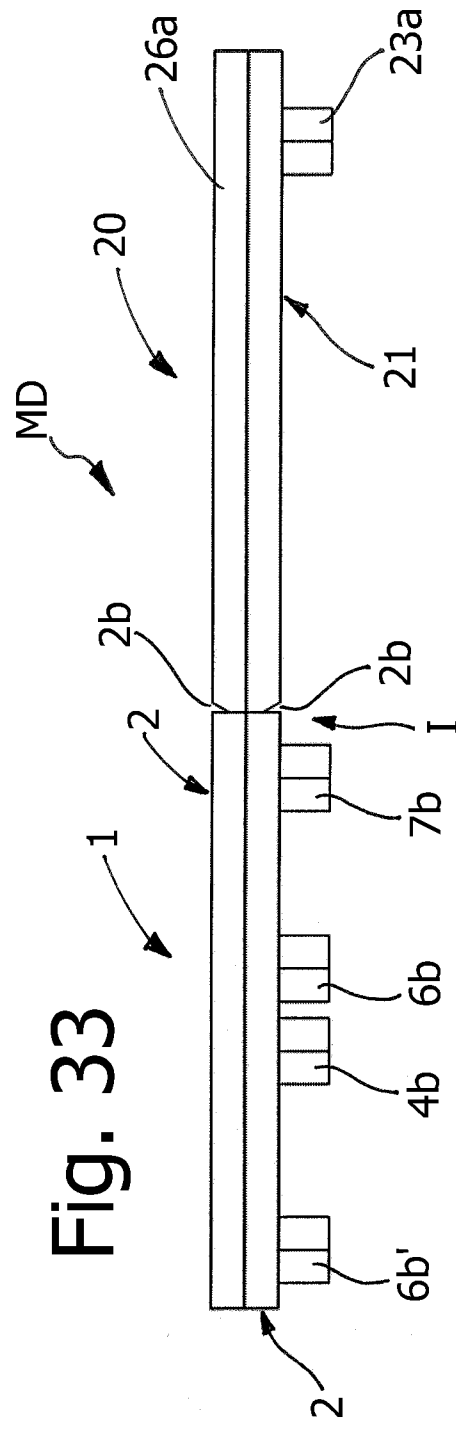


Fig. 33



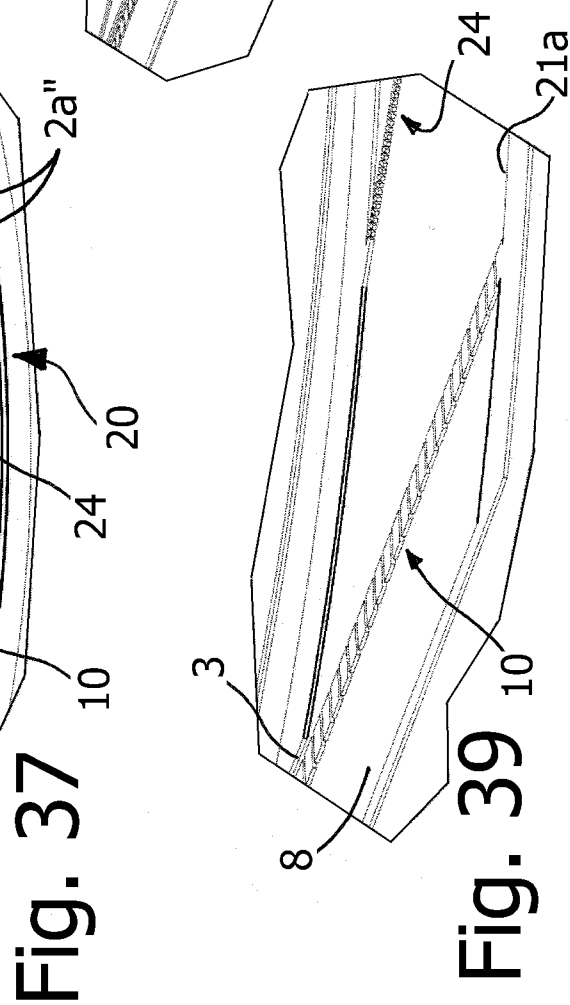
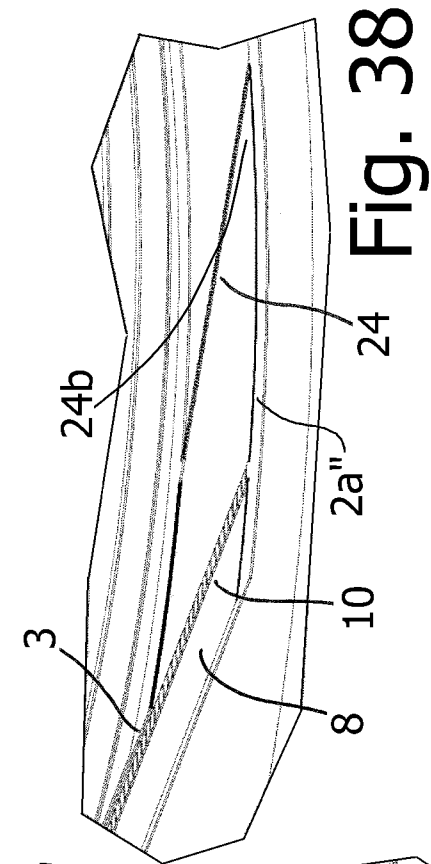
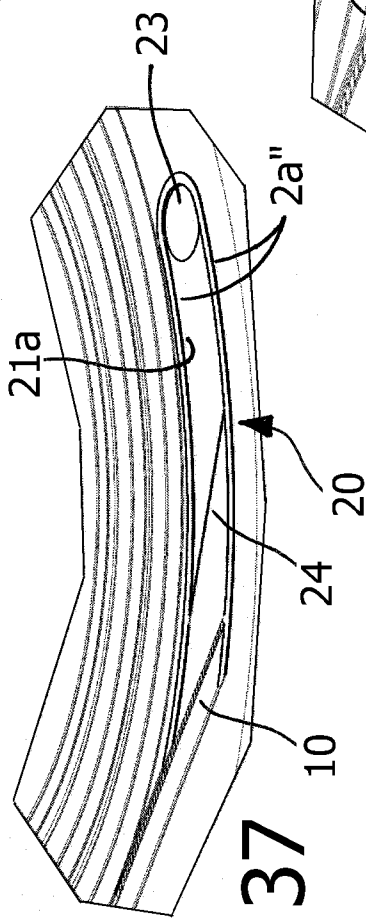
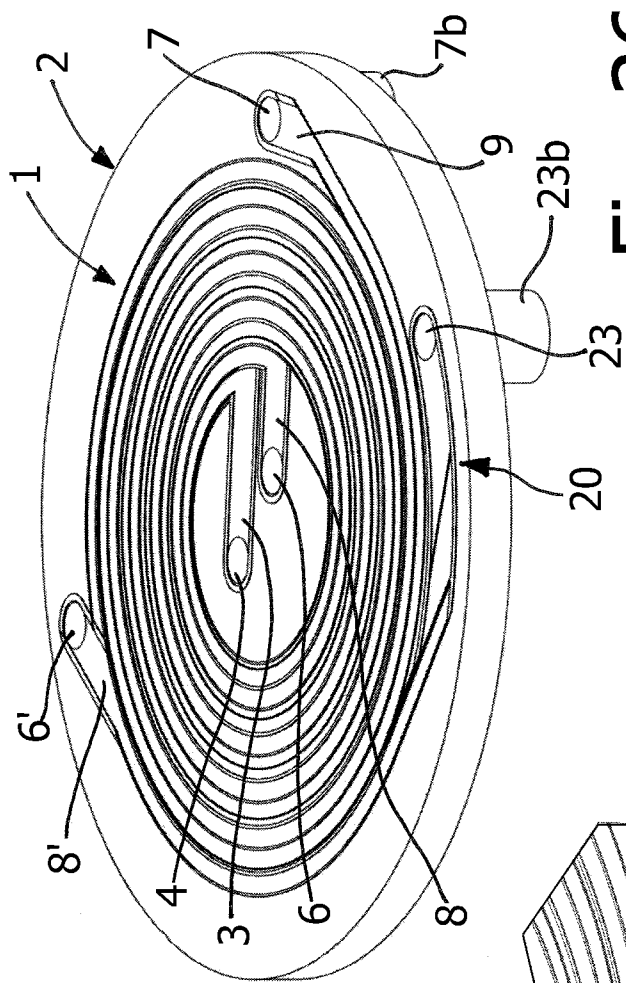
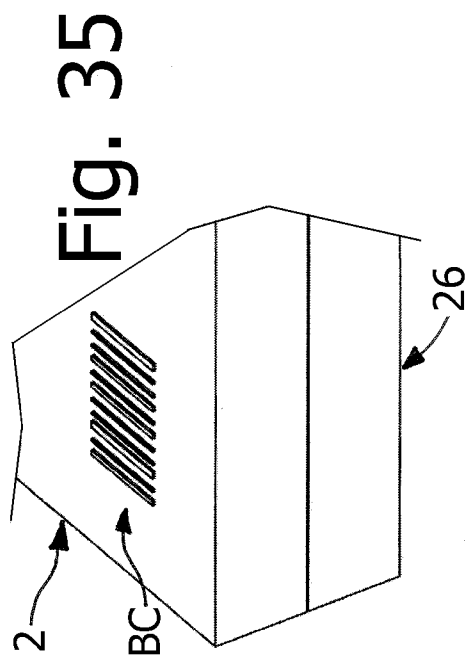


Fig. 42

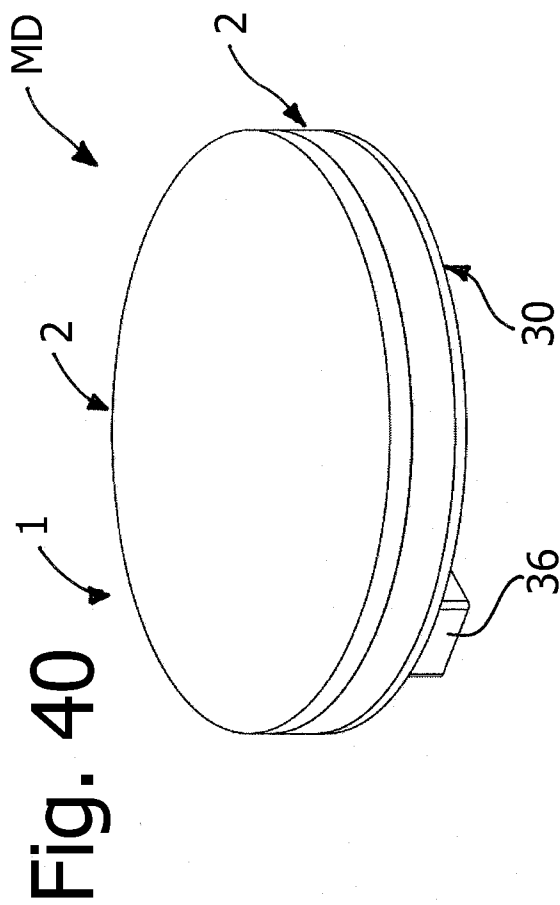
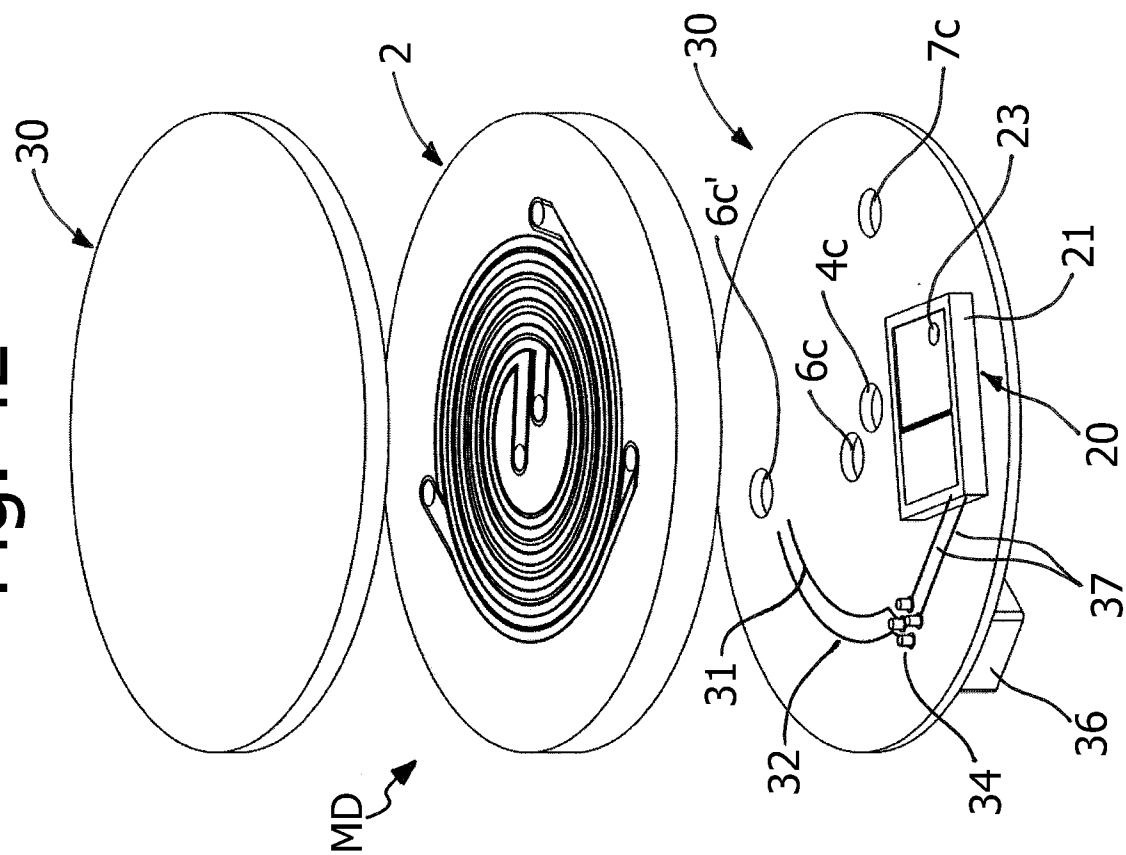


Fig. 41

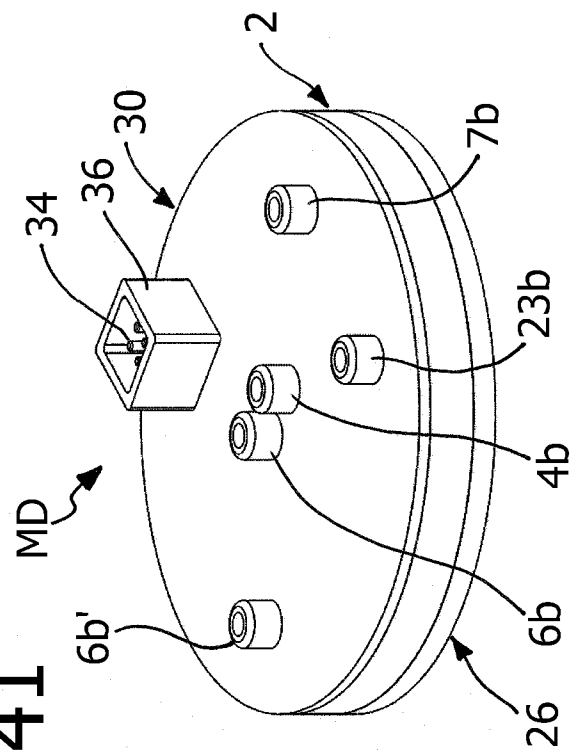


Fig. 43

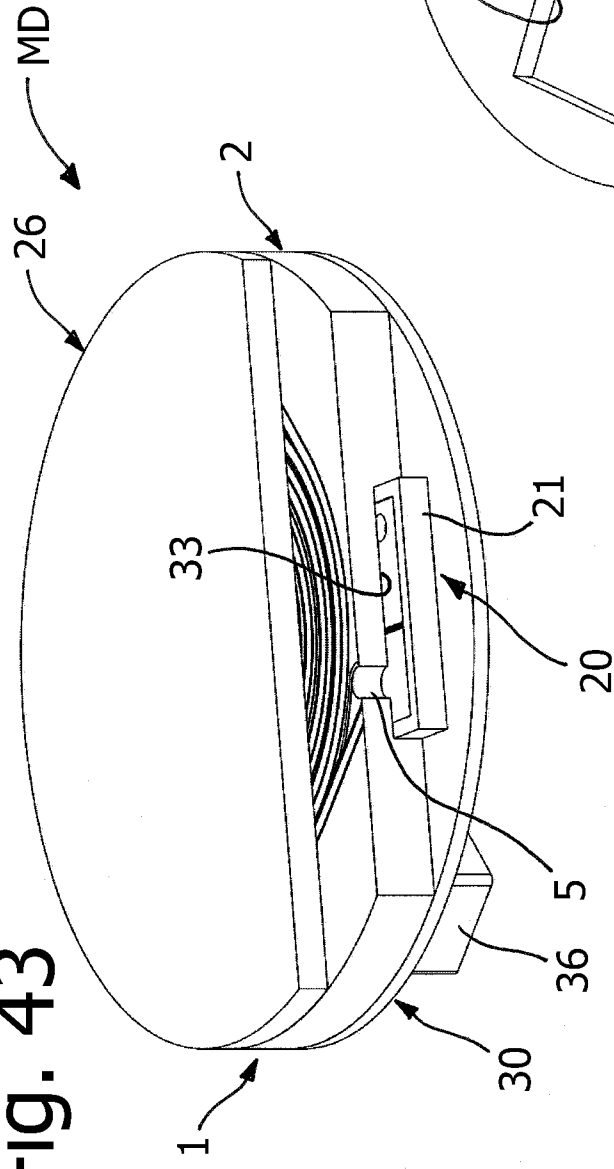


Fig. 44

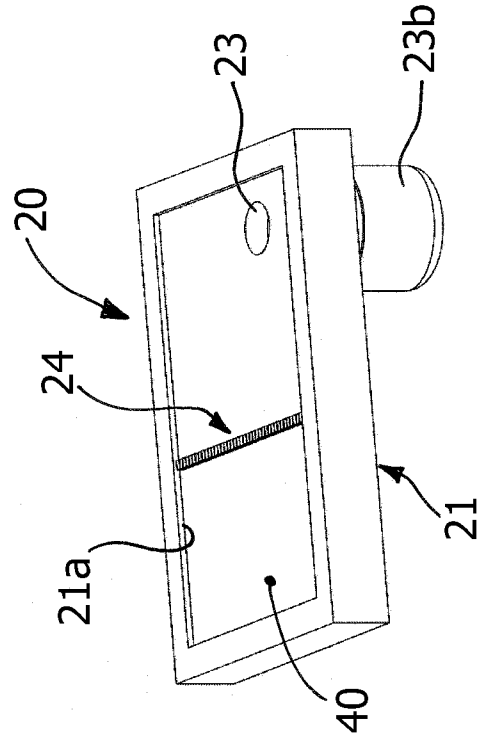
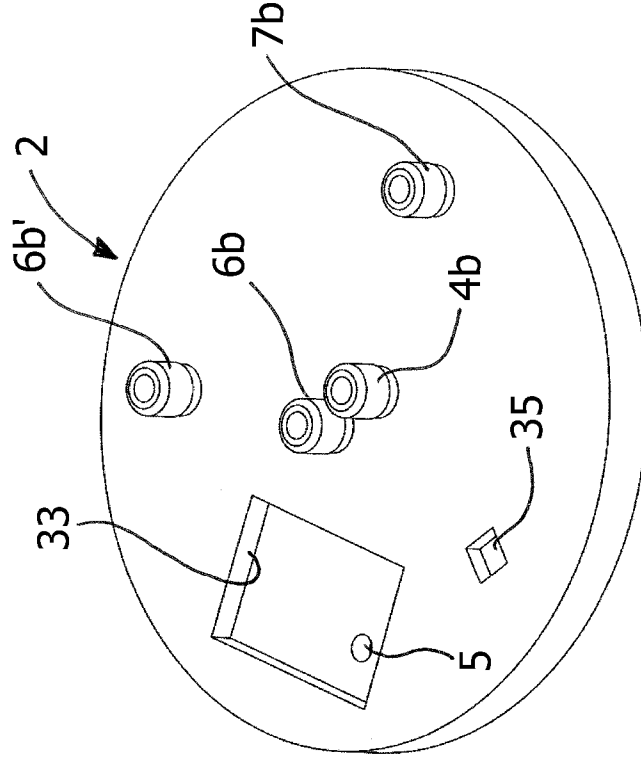


Fig. 45

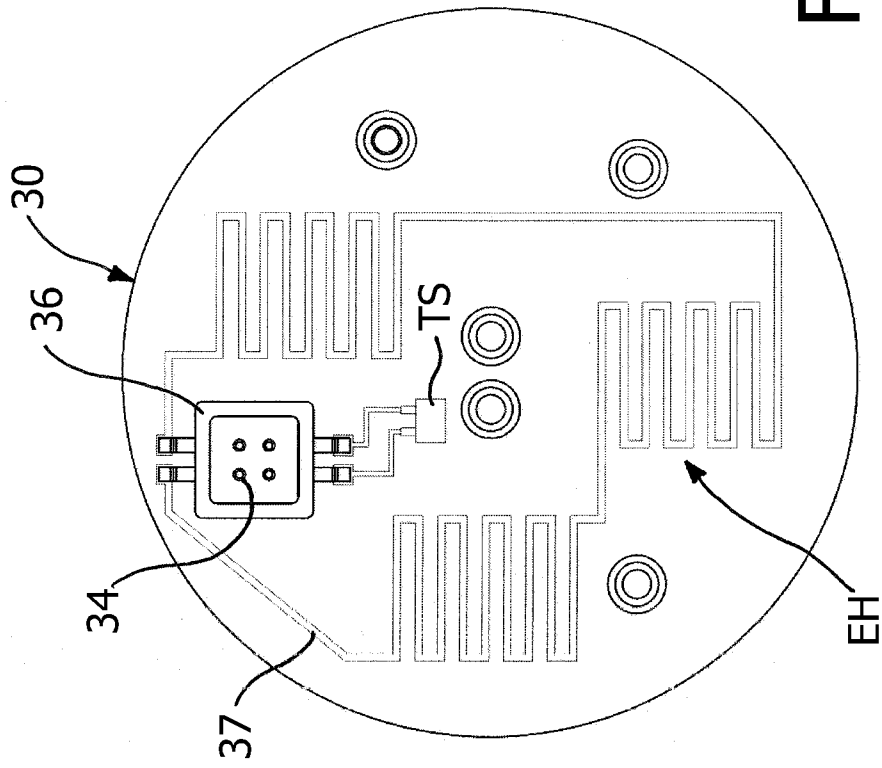


Fig. 46

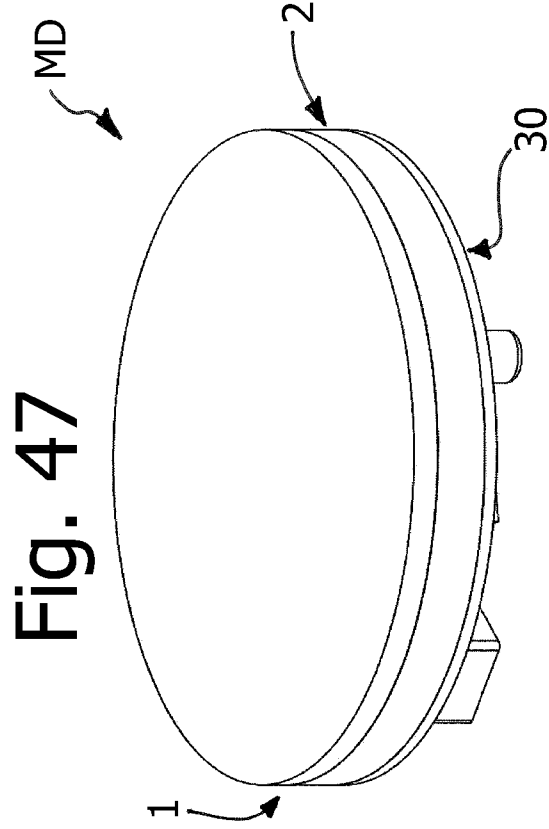


Fig. 47

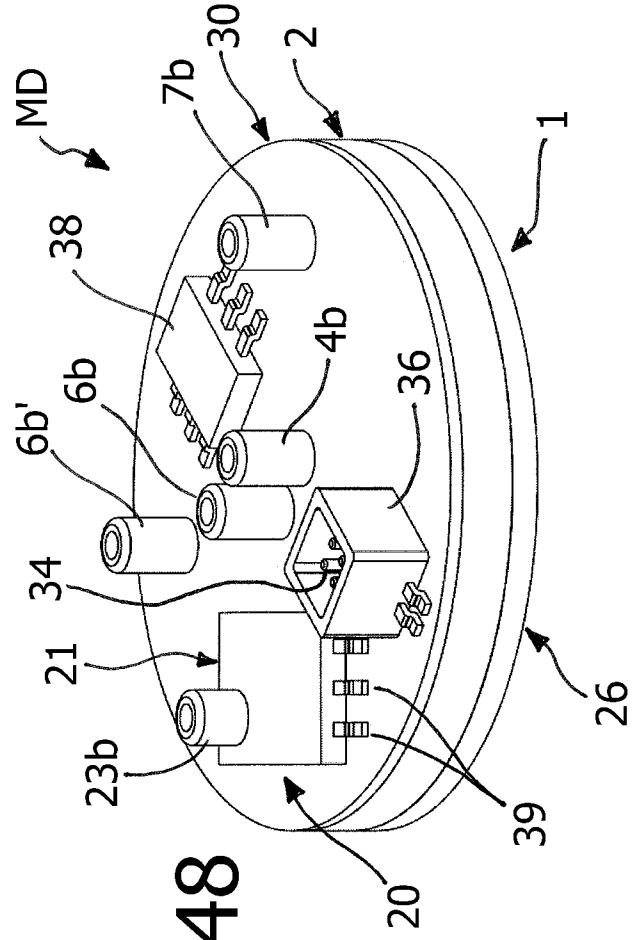


Fig. 48

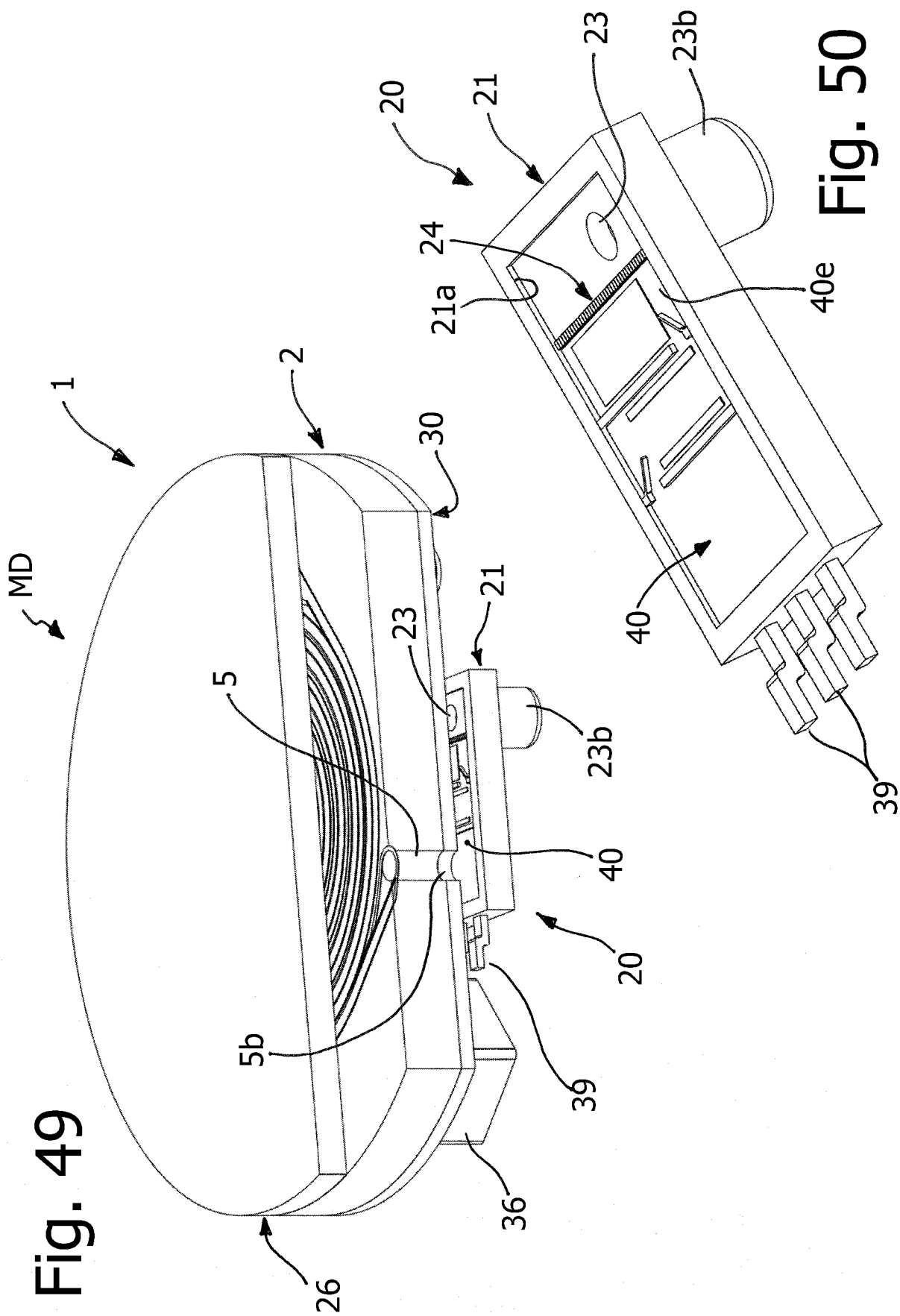


Fig. 51

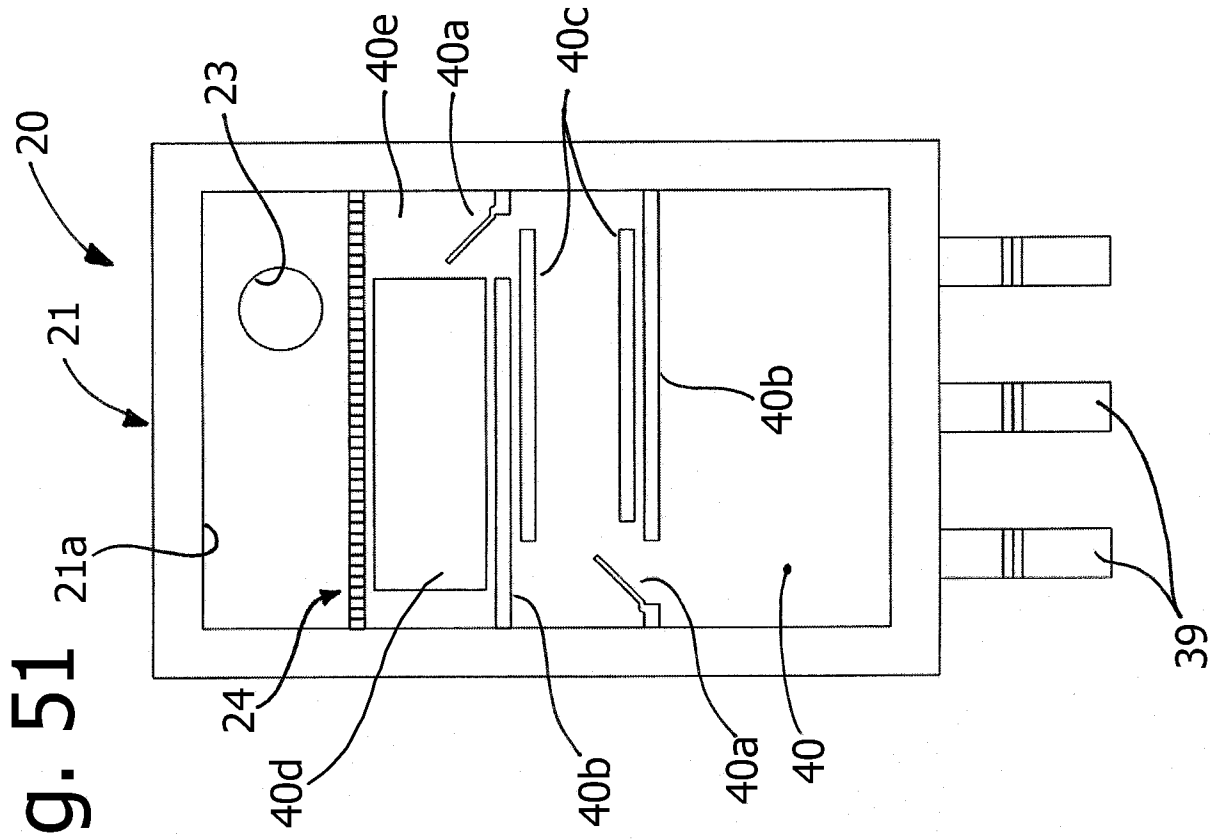


Fig. 52

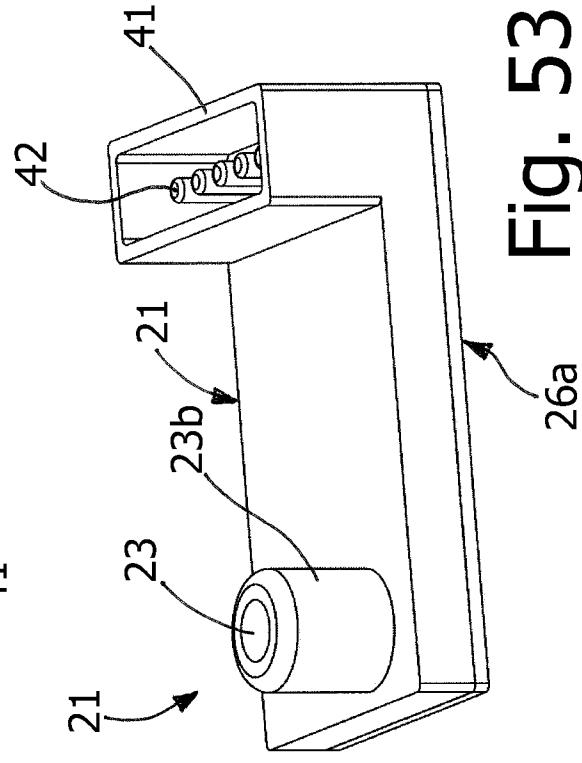
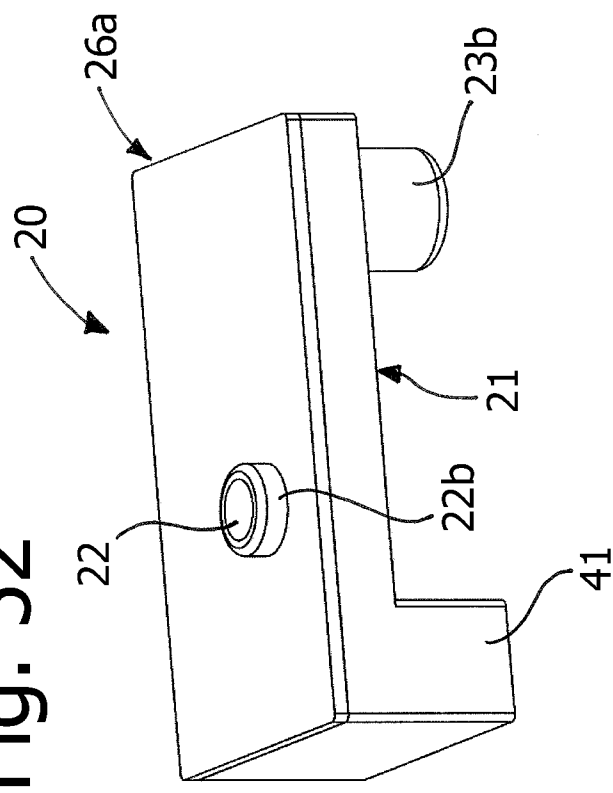


Fig. 55

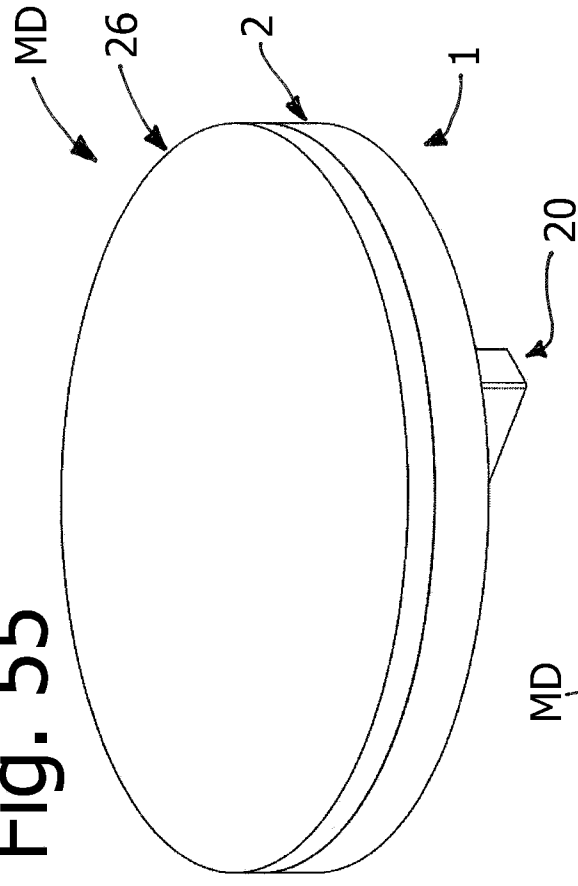


Fig. 54

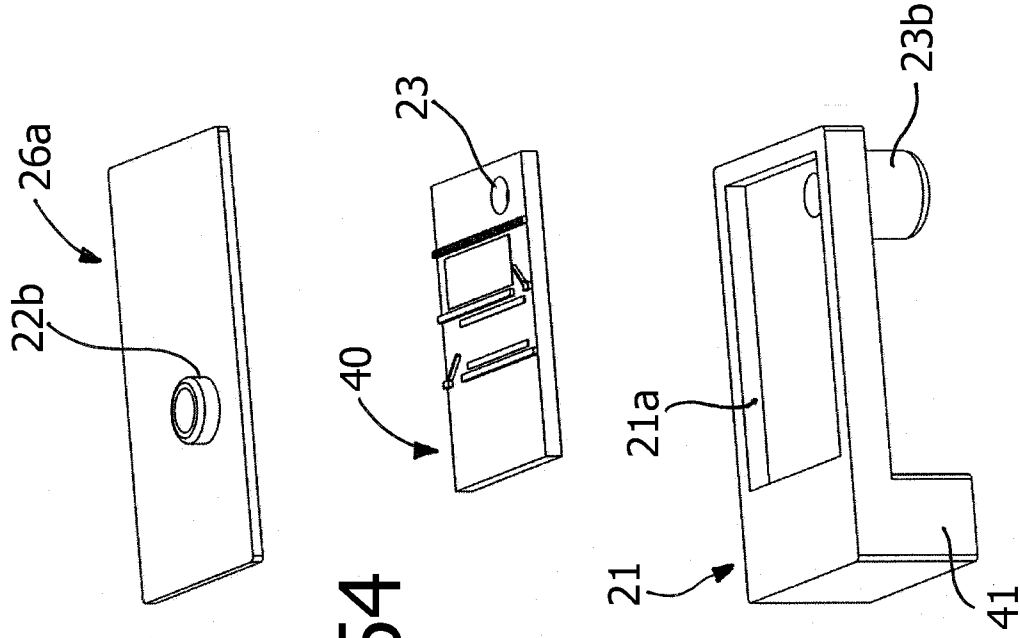


Fig. 56

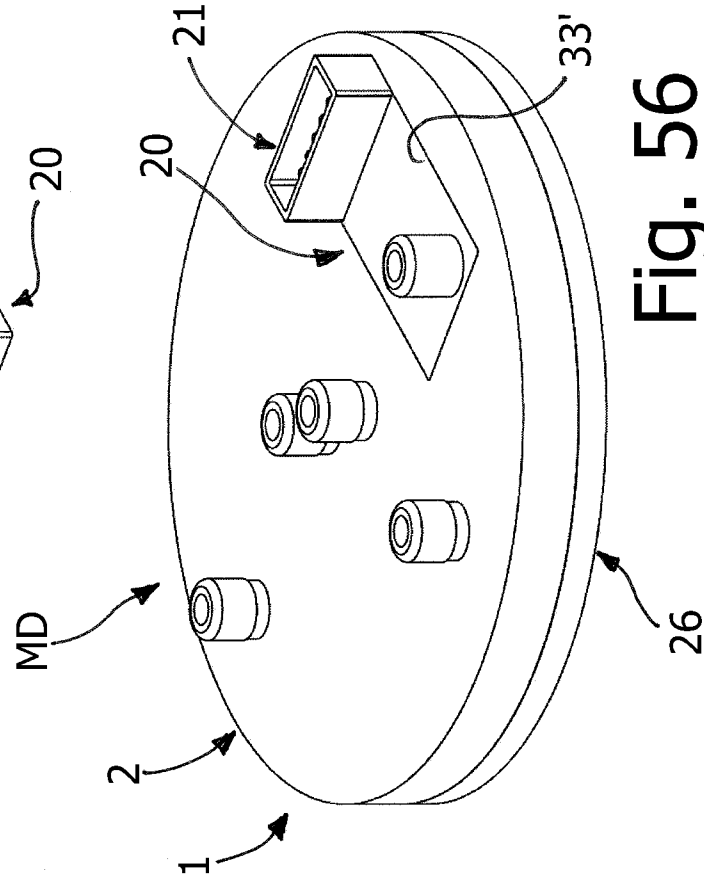


Fig. 57

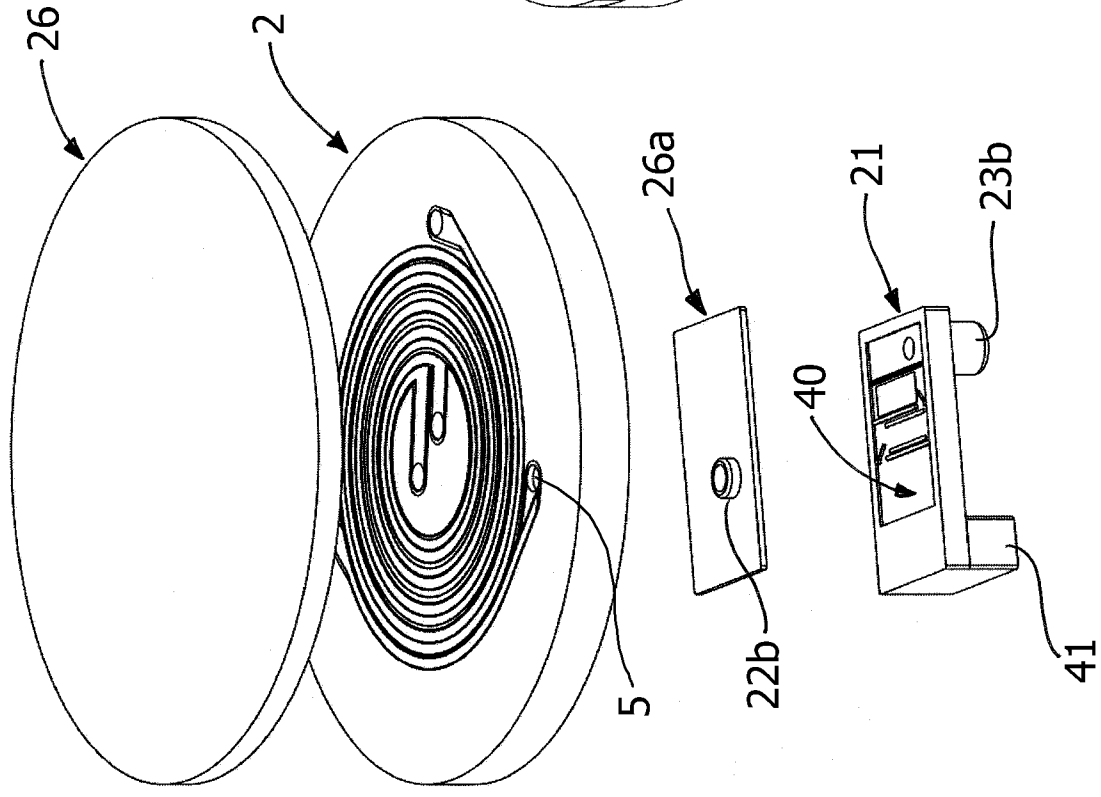


Fig. 58

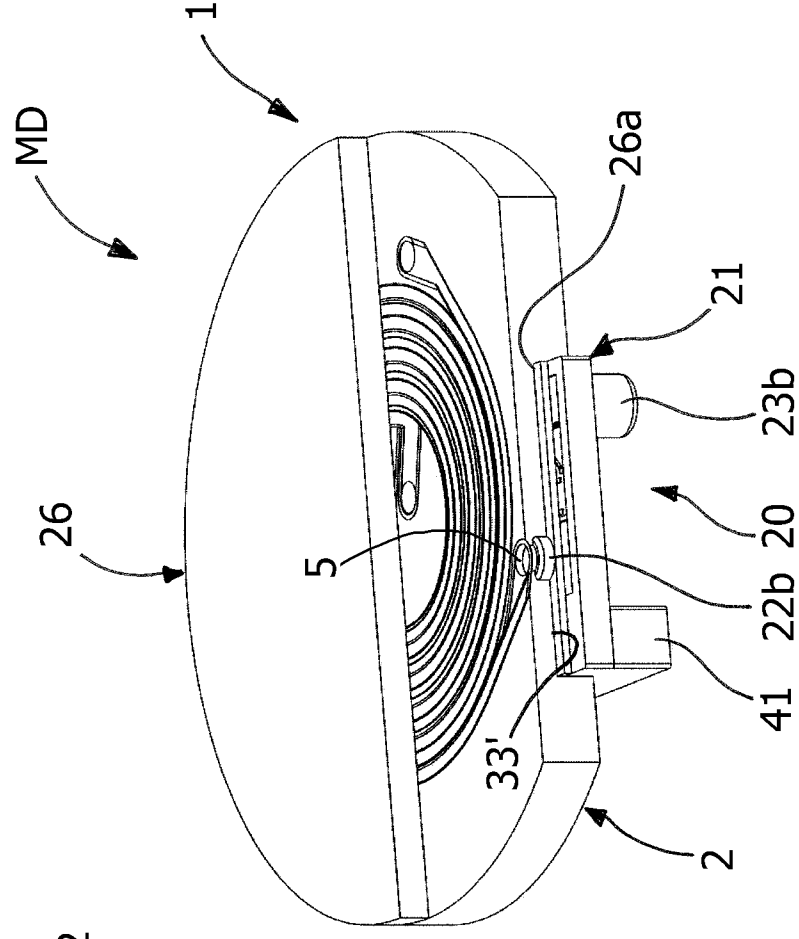


Fig. 59

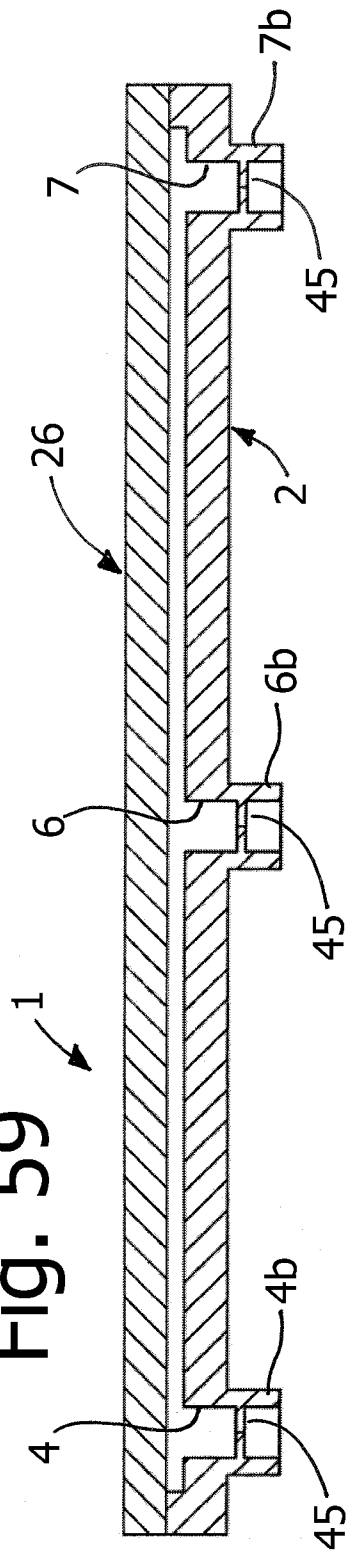


Fig. 60

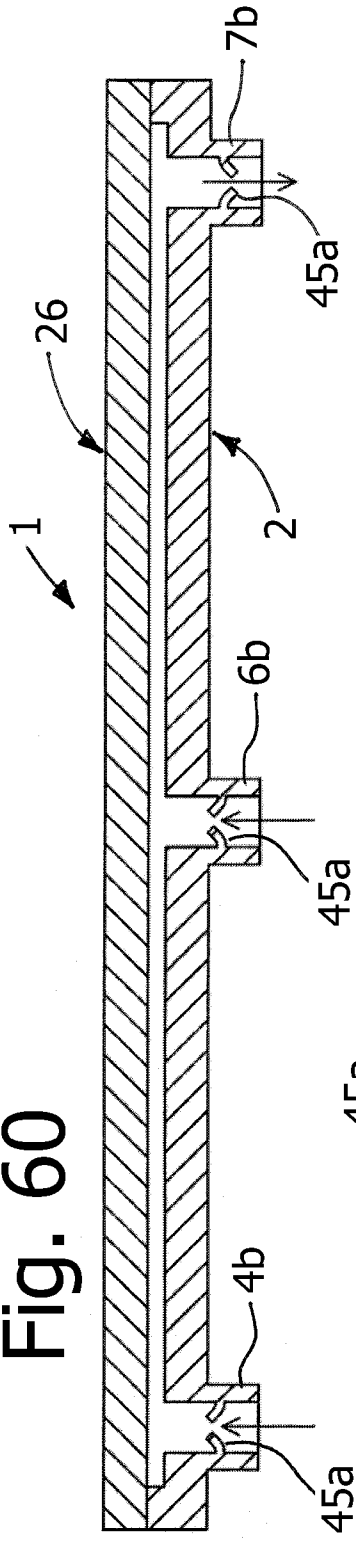


Fig. 61

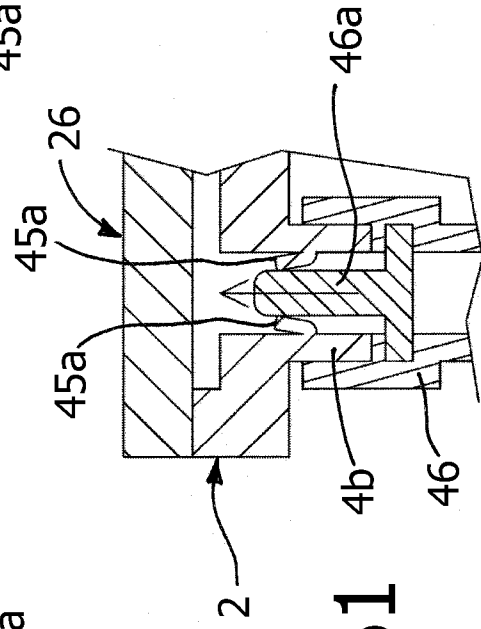


Fig. 62

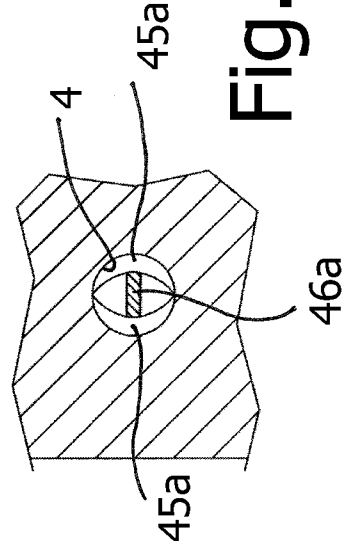


Fig. 63

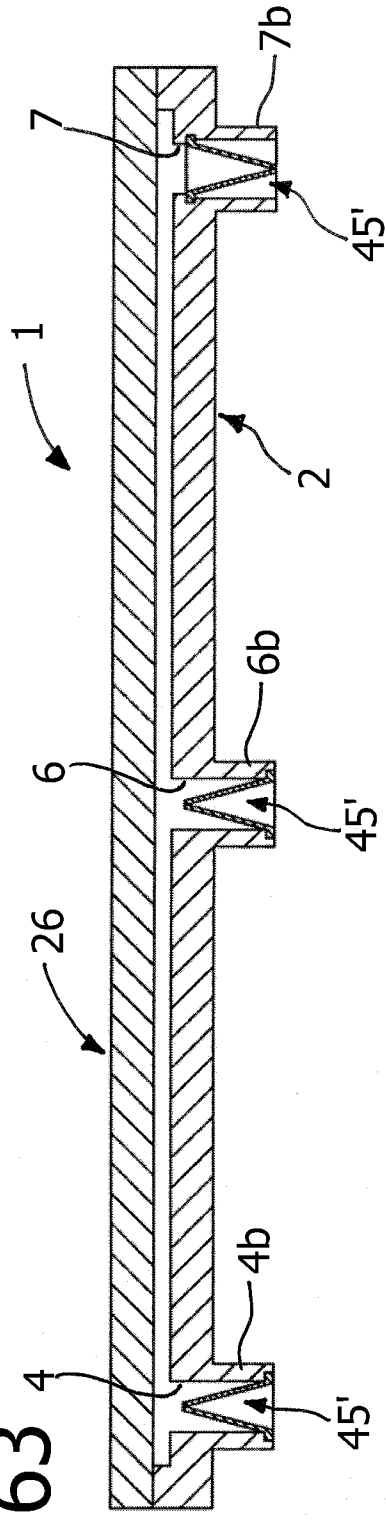


Fig. 64

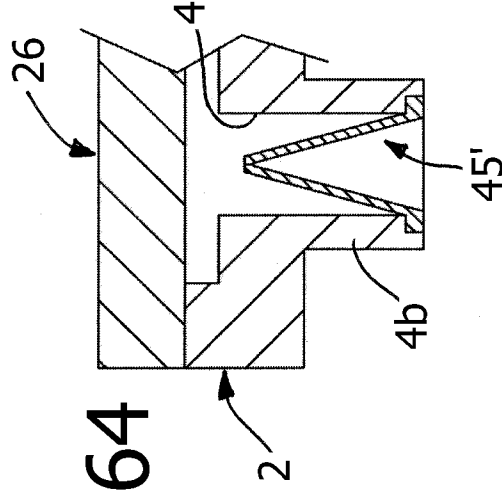


Fig. 65

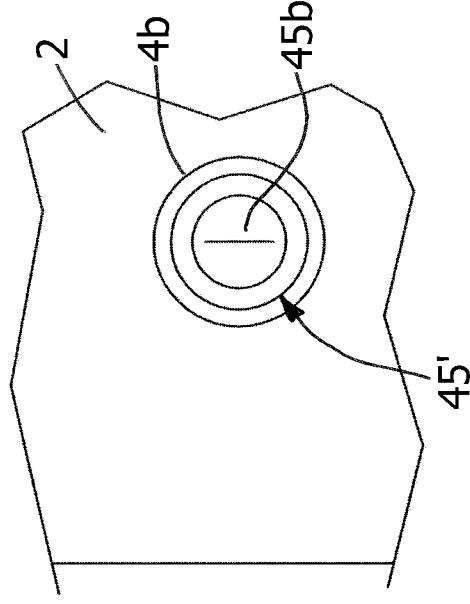


Fig. 66

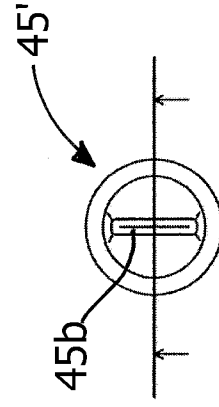


Fig. 67

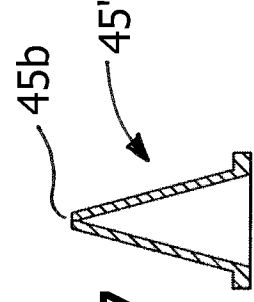


Fig. 68

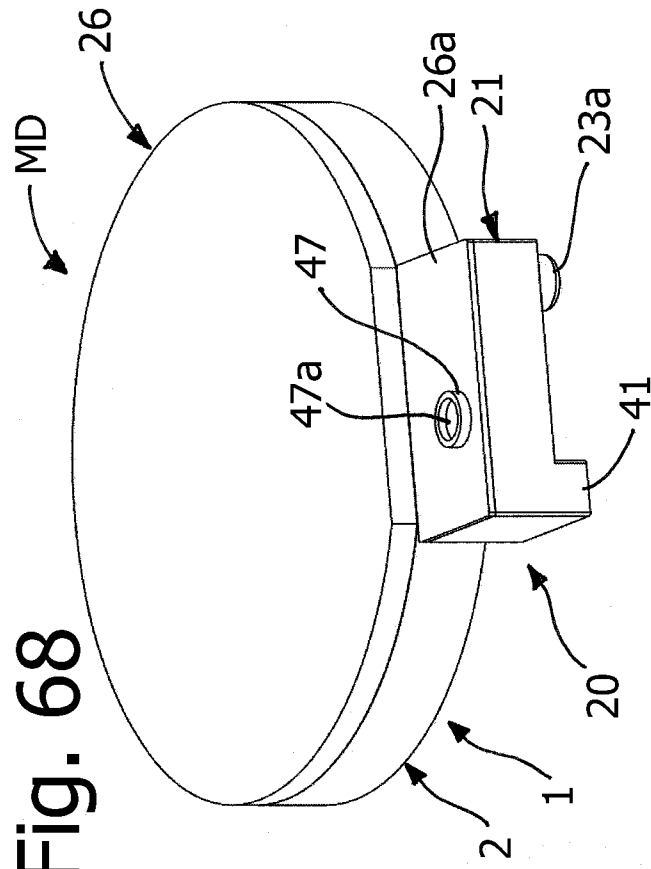


Fig. 70

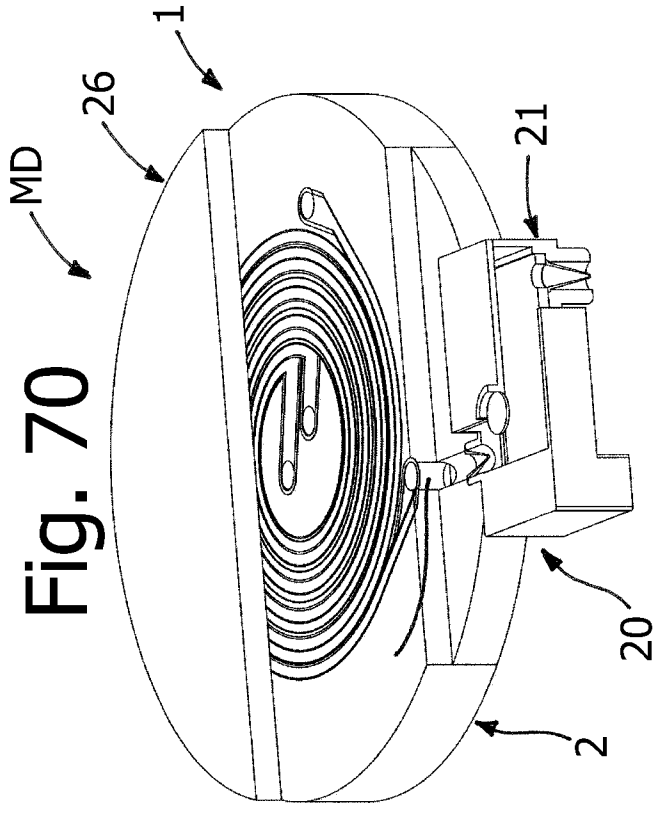


Fig. 69

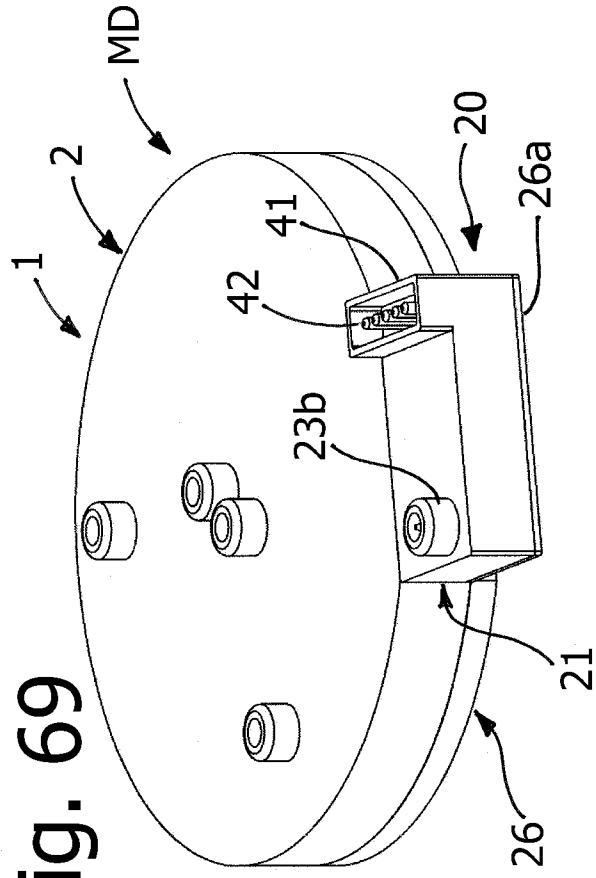
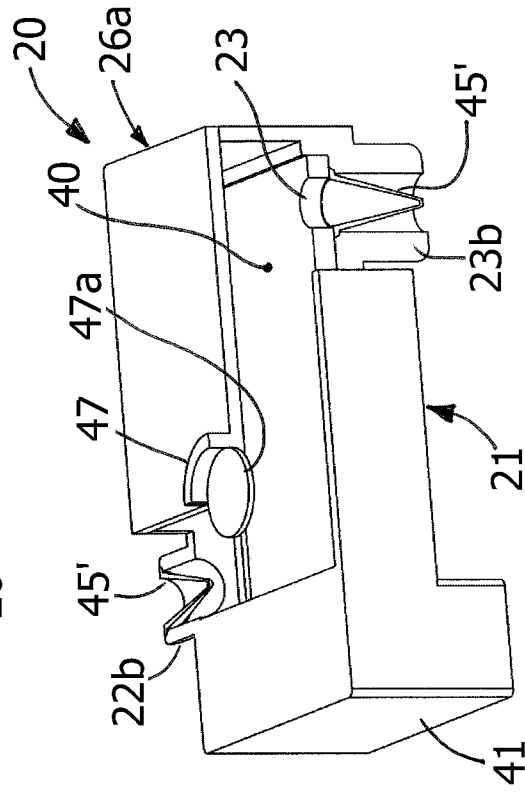


Fig. 71



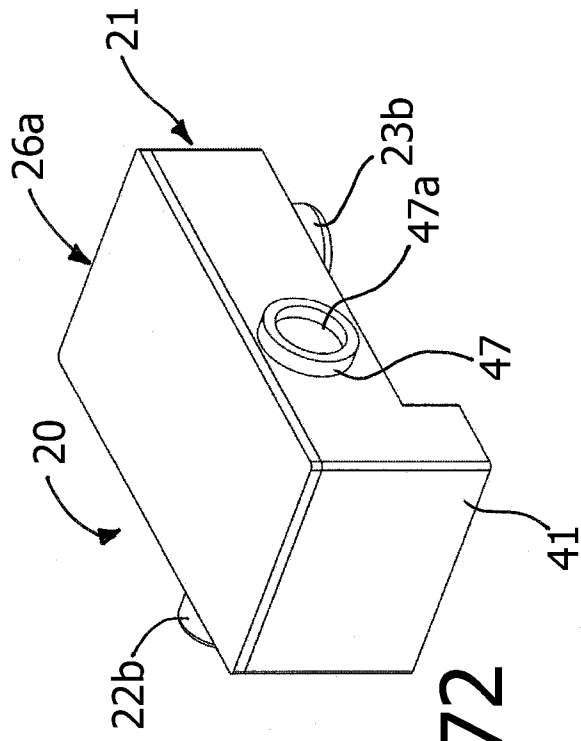


Fig. 72

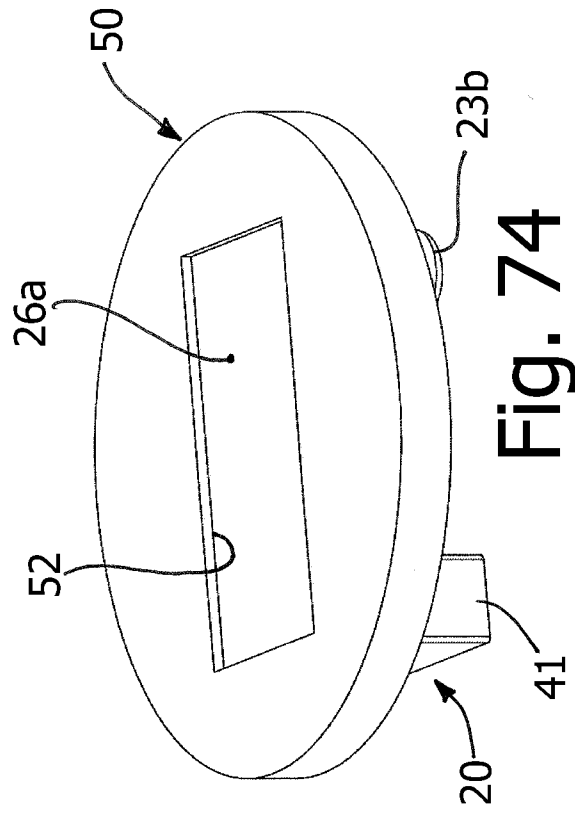


Fig. 74

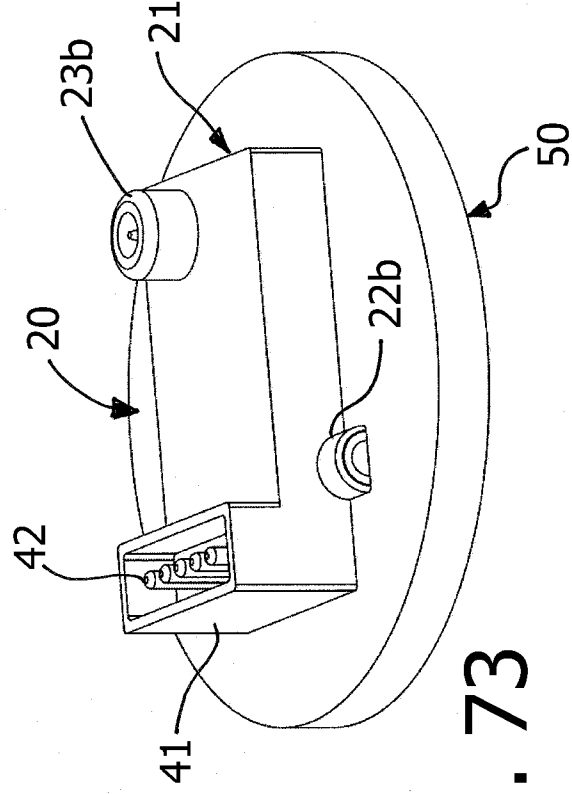


Fig. 73

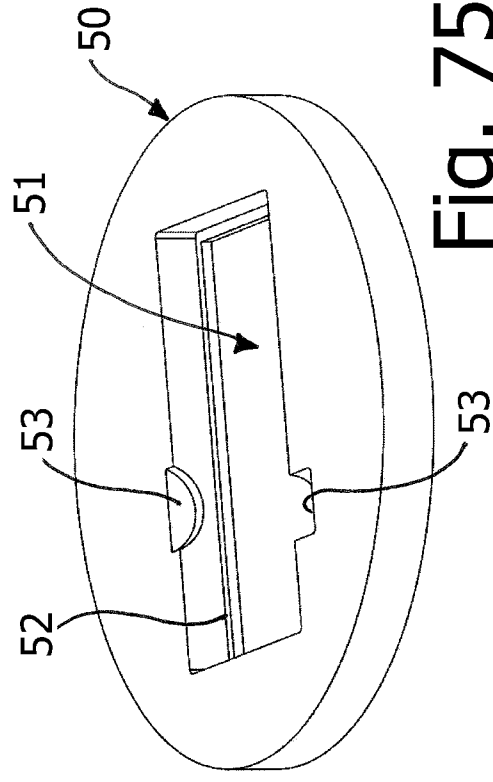


Fig. 75

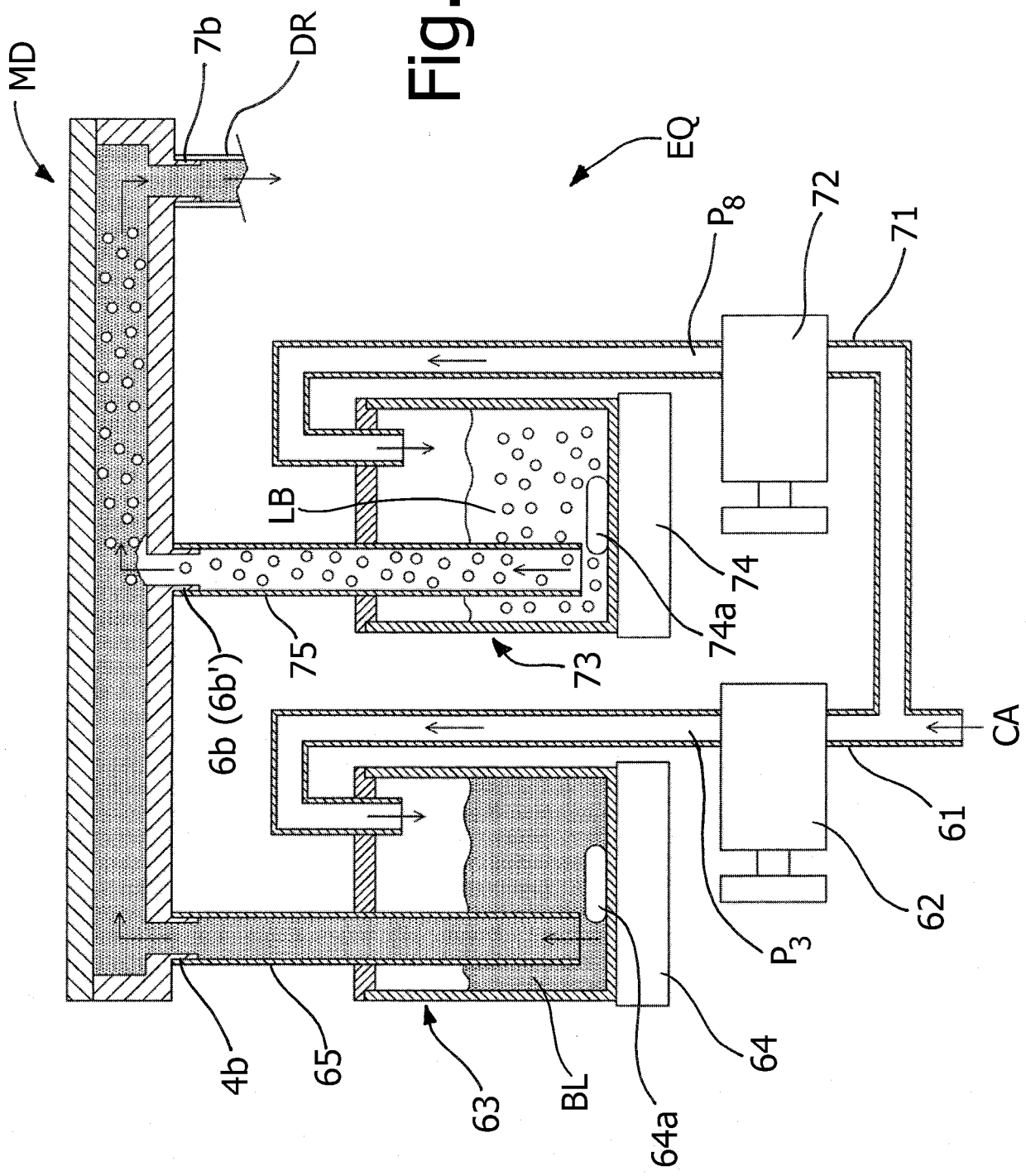


Fig. 76

Fig. 77

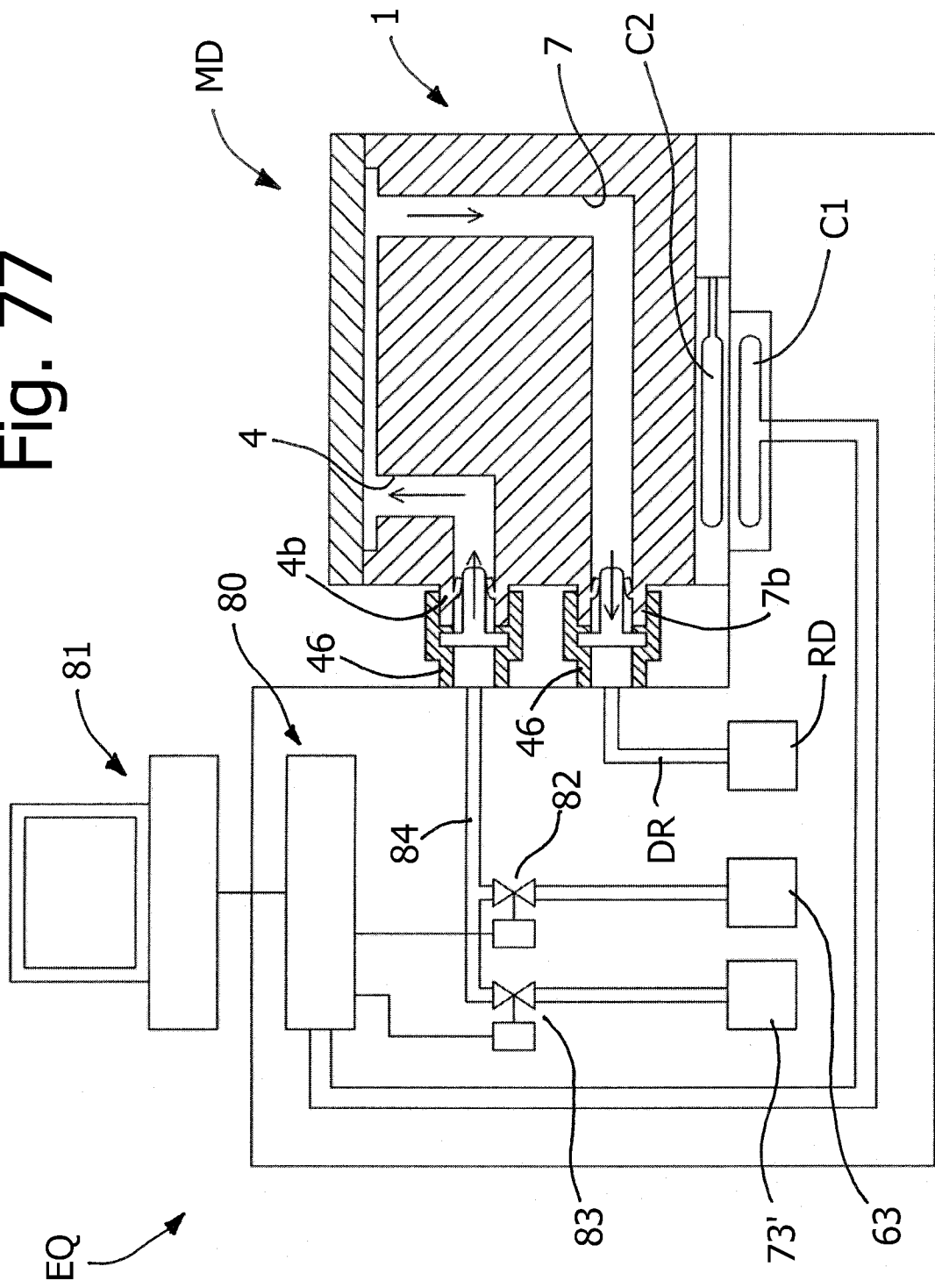


Fig. 79

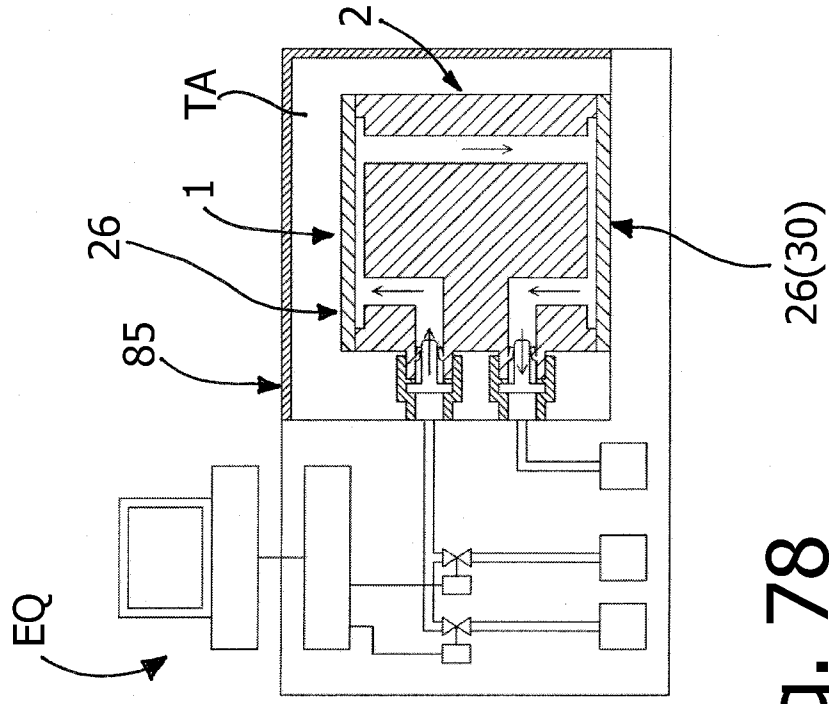
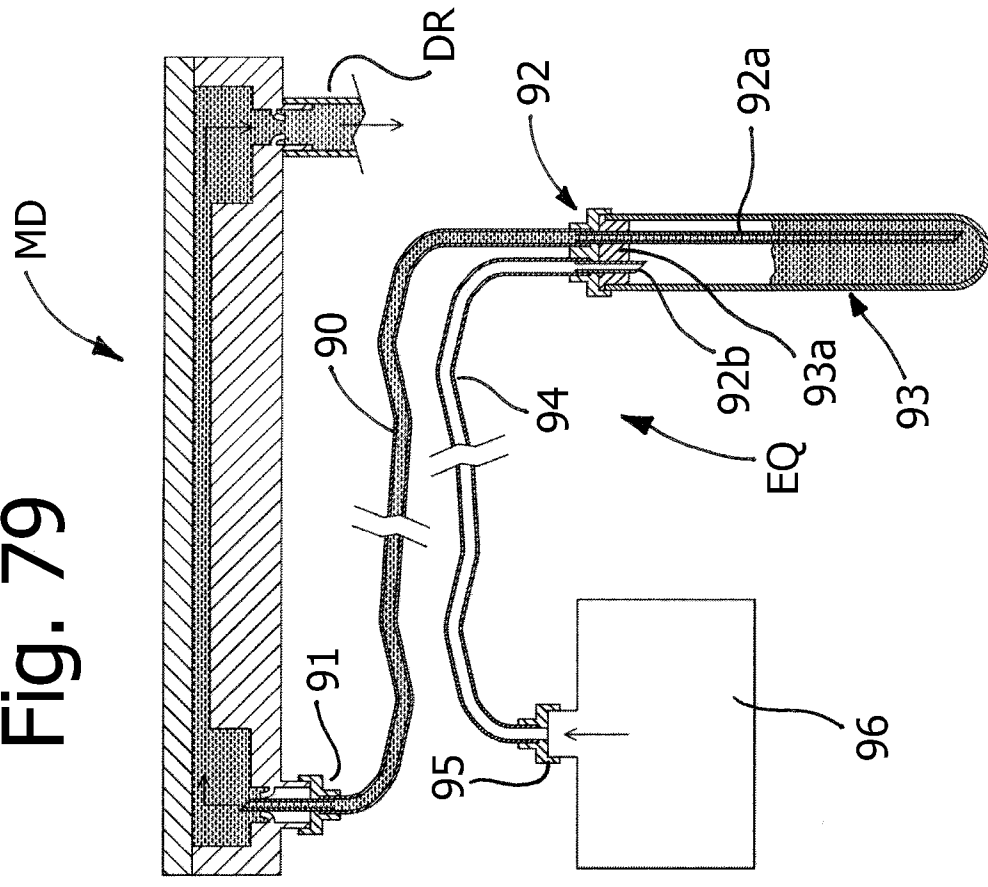


Fig. 78

Fig. 80

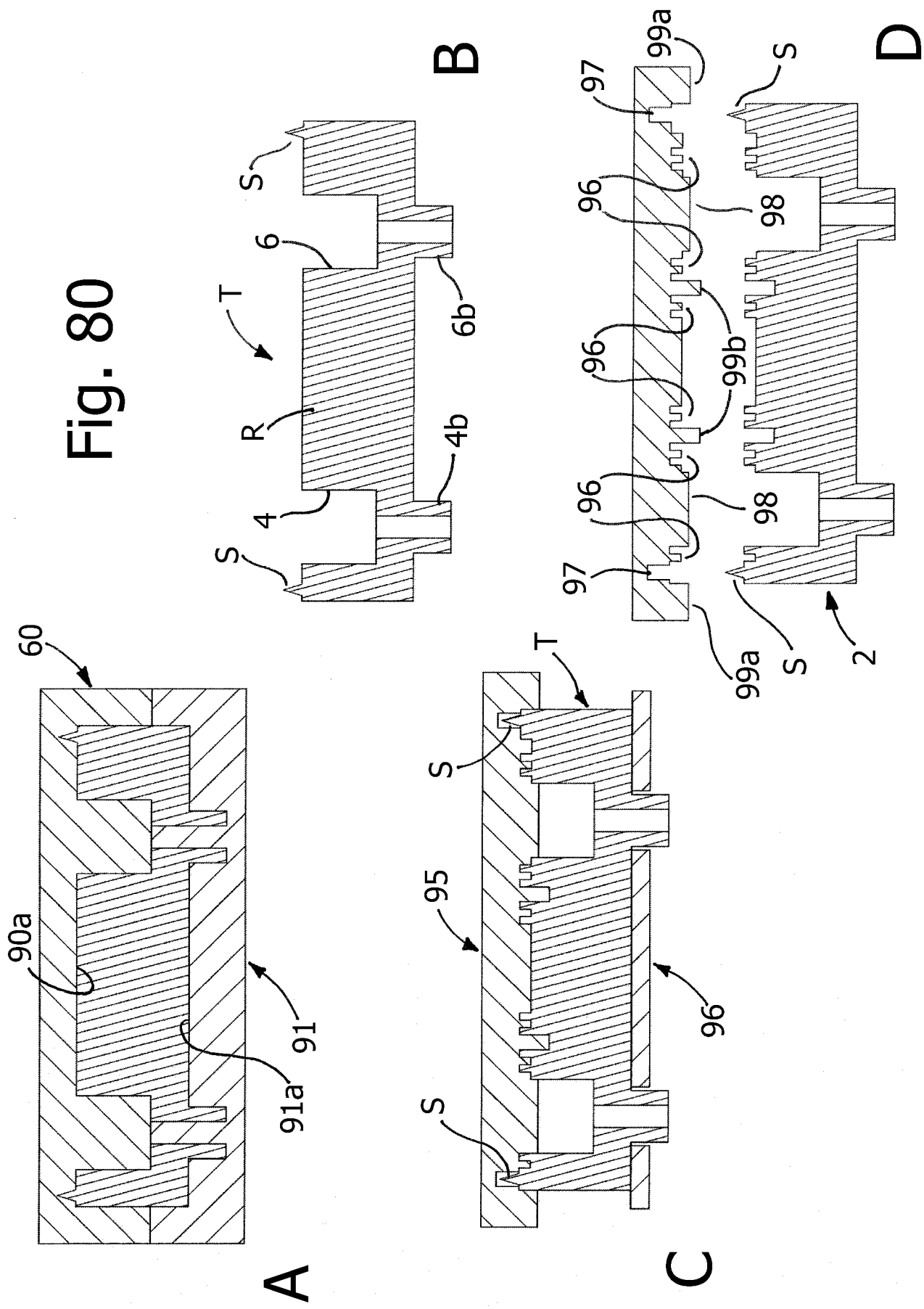


Fig. 81

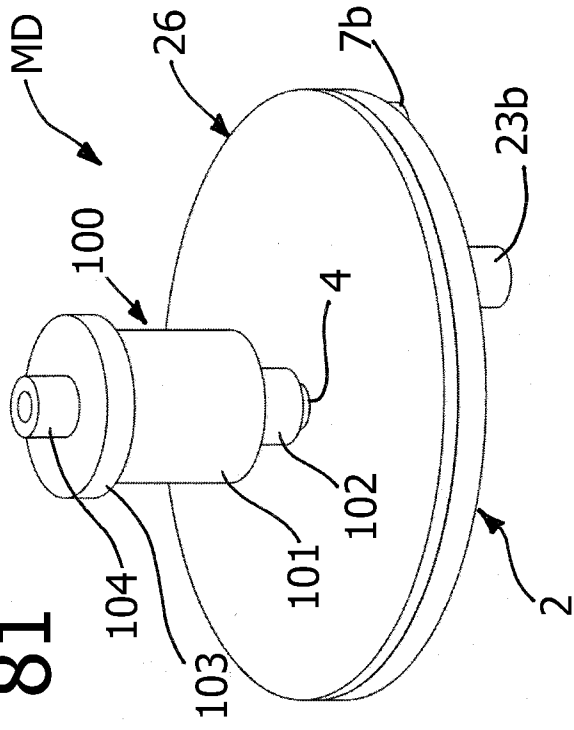


Fig. 83

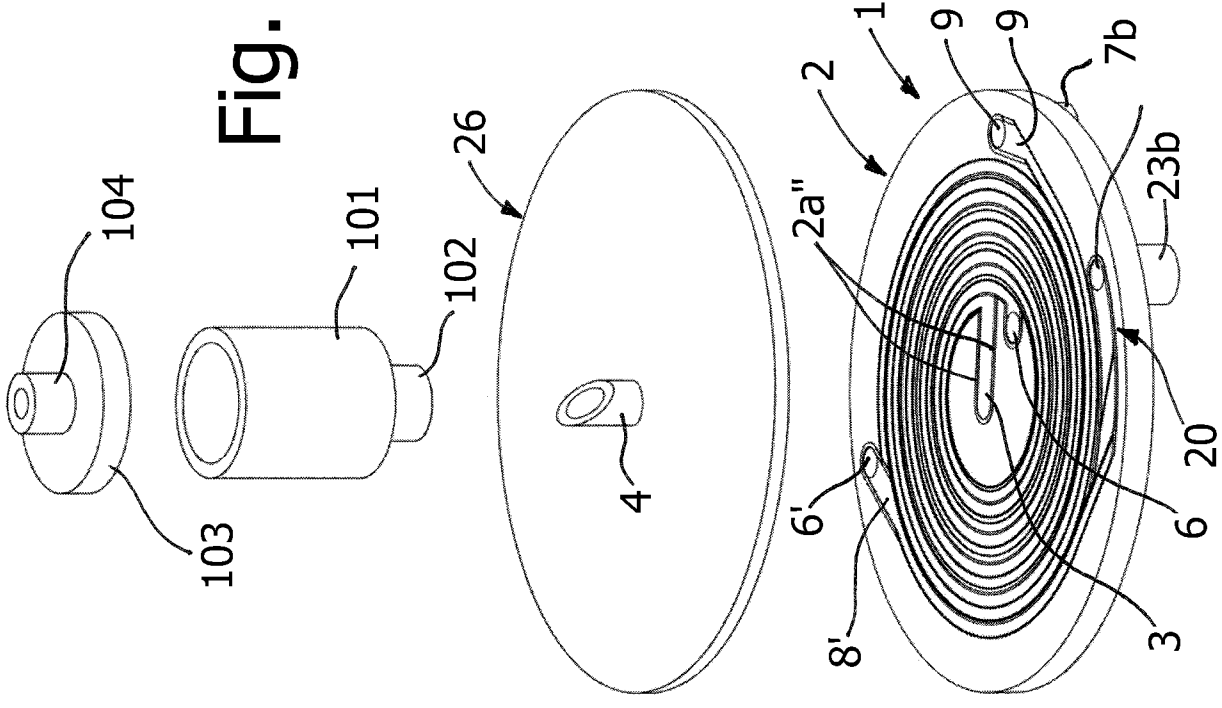
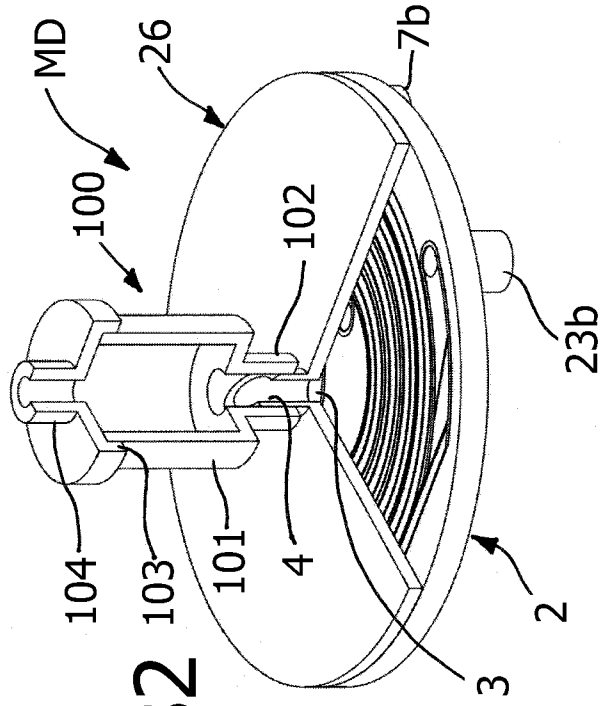


Fig. 82



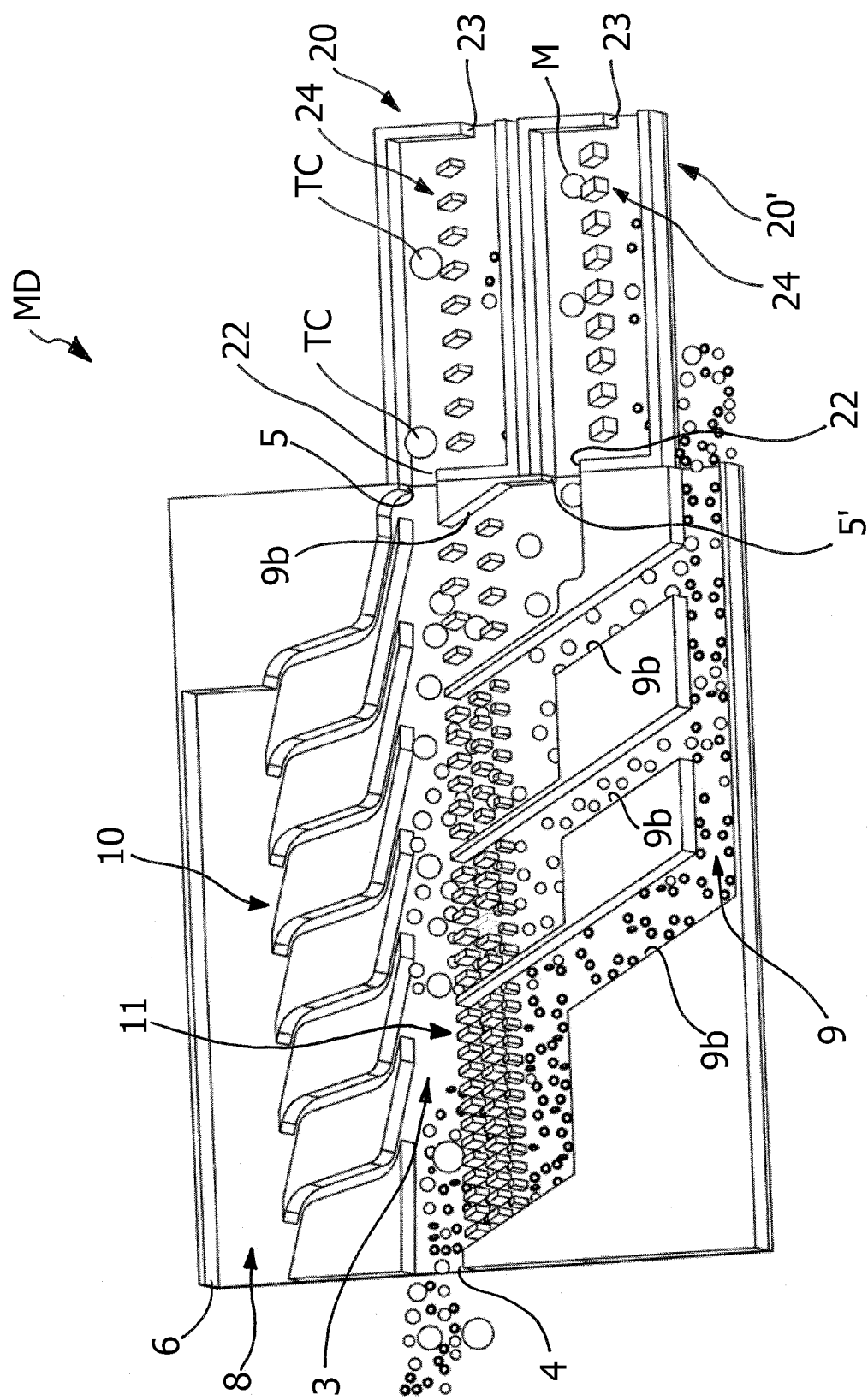


Fig. 84

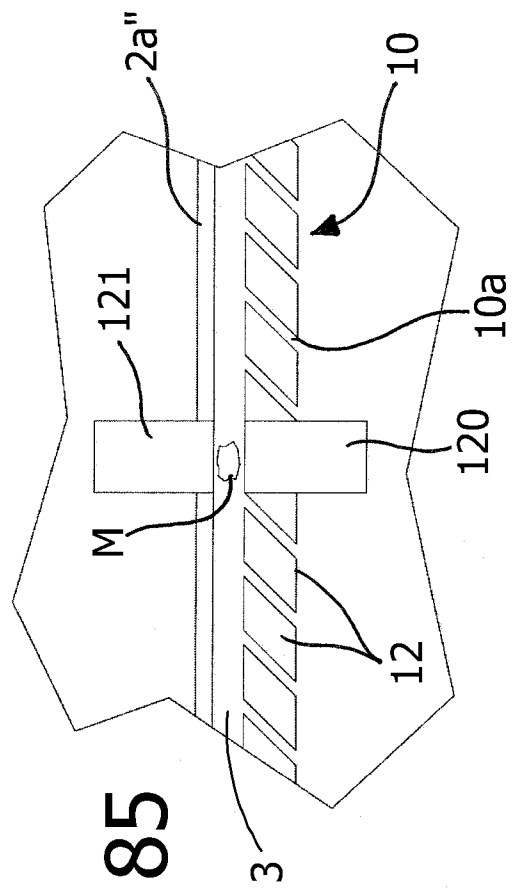


Fig. 85

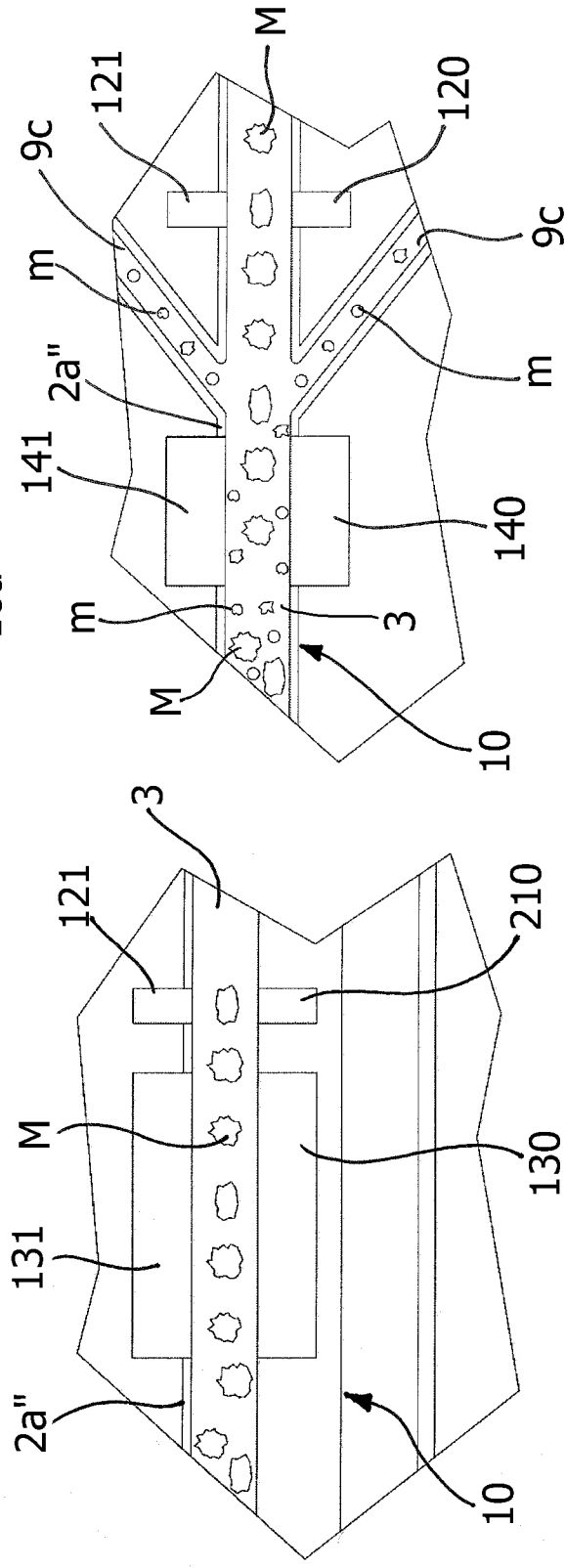


Fig. 86

Fig. 87