

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 373**

51 Int. Cl.:

G01N 27/74	(2006.01)	G01N 15/14	(2014.01)
B01D 35/06	(2006.01)	G01N 15/10	(2014.01)
B01L 3/00	(2006.01)		
B03C 1/005	(2006.01)		
B03C 1/23	(2006.01)		
B03C 1/28	(2006.01)		
B03C 1/30	(2006.01)		
G01N 15/00	(2014.01)		
B03C 1/01	(2006.01)		
B03C 1/033	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.01.2019** **E 21150887 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024** **EP 3822630**

54 Título: **Métodos y aparatos para separar entidades biológicas**

30 Prioridad:

03.03.2018 US 201815911115

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.11.2024

73 Titular/es:

**APPLIED CELLS INC. (100.0%)
3350 Scott Boulevard, Building 6
Santa Clara, California 95054, US**

72 Inventor/es:

ZHOU, YUCHEN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 988 373 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Métodos y aparatos para separar entidades biológicas

5 Antecedentes

La presente invención se refiere generalmente a métodos y aparatos para separar entidades biológicas, incluidas células, bacterias y moléculas de sangre humana, tejido corporal, fluido corporal y otras muestras biológicas relacionadas con humanos. Los métodos y aparatos descritos también pueden utilizarse para
 10 separar entidades biológicas de muestras de animales y plantas. Más particularmente, la presente invención se refiere a los métodos y aparatos para lograr la separación de entidades biológicas mediante el uso de uno o más de un dispositivo/chip de separación microfluídico ("UFL"), y uno o más de un dispositivo de separación magnética ("MAG"), individualmente o en combinación. Con fines descriptivos, se usará predominantemente en adelante "células" como una representación típica de entidades biológicas en general.
 15 Sin embargo, se entiende que los métodos y aparatos descritos en la presente invención pueden aplicarse fácilmente a otras entidades biológicas sin limitación.

La separación de entidades biológicas de una solución de base de fluido, por ejemplo, separar un tipo específico de glóbulos blancos de la sangre humana, típicamente implica una primera etapa de identificación de las entidades biológicas objetivo con especificidad, y seguido de una segunda etapa de extracción física de las entidades biológicas objetivo identificadas a partir de la solución de base de fluido. En la sangre humana, diferentes tipos de células biológicas pueden tener diversos tipos de antígenos de superficie o receptores de superficie, que también se denominan marcadores de superficie en la presente invención. Ciertos marcadores de superficie en un tipo determinado de células pueden ser exclusivos de dicho tipo de
 20 células y pueden usarse para identificar dicho tipo de células a partir de una muestra de sangre con especificidad.

La Figura 1A a la Figura 1C muestran ejemplos de identificación o marcado de células objetivo 1, mediante el uso de etiquetas superparamagnéticas 2 ("SPL") como en la Figura 1A, mediante el uso de etiquetas ópticas fluorescentes 3 ("OFL") como en la Figura 1B, y mediante el uso de ambas SPL 2 y OFL 3 juntas como en la
 30 Figura 1C.

En la Figura 1A, la célula 1 tiene marcadores de superficie 11. Las SPL 2 se conjugan con anticuerpos o ligandos de superficie, también denominadas "sonda" 21, que se unen específicamente a los marcadores de superficie 11 de la célula 1. Se pone una gran cantidad de SPL 2 que tiene sondas 21 en la solución donde reside la célula 1. Después de los procesos de incubación 9, una pluralidad de SPL 2 se une a la superficie de la célula 1 con sondas 21 unidas selectivamente a marcadores de superficie 11 con especificidad. Por tanto, las células 1 se identifican o marcan magnéticamente mediante las SPL 2, es decir, la célula 10
 35 marcada magnéticamente. Puede aplicarse un campo magnético con suficiente gradiente de campo a la célula 10 para producir una fuerza física sobre las SPL 2 unidas a la superficie de las células 10. Con suficiente resistencia, la fuerza física que actúa a través de las SPL 2 en la célula 10 puede usarse para separar y eliminar físicamente la célula 10 de su solución líquida.

En la Figura 1B, la célula 1 tiene marcadores de superficie 12. Las OFL 3 se conjugan con sondas 22, que se unen específicamente a los marcadores de superficie 12 de la célula 1. Se coloca una gran cantidad de OFL 3 que tienen sondas 23 en la solución donde reside la célula 1. Después de los procesos de incubación 9, una pluralidad de OFL 3 se une a la superficie de la célula 1 con sondas 22 unidas selectivamente a los marcadores de superficie 12 con especificidad. Por tanto, las células 1 se identifican o marcan ópticamente mediante las OFL 3, es decir, la célula 20 marcada ópticamente. Mediante el uso de un sistema de separación de células de base óptica, la célula 1 puede separarse de su solución líquida en base a la señal óptica que produce OFL 3 bajo una luz de excitación. Un tipo de dicho sistema de separación celular de base óptica es un citómetro de flujo, en donde dicha solución líquida se hace fluir a través de un conducto dentro de dicho citómetro de flujo como un flujo continuo. Al menos una fuente de luz de excitación produce un punto de luz sobre dicho flujo líquido a través de dicho conducto en una primera longitud de onda óptica. En presencia de la OFL 3 en el punto de luz, la OFL3 se excita por la primera longitud de onda e irradia luz
 45 óptica en una segunda longitud de onda. Cuando la célula 1 con las OFL 3 unidas pasa dicho punto de luz dentro de dicho flujo, las OFL 3 unidas a la célula 1 irradian una señal óptica en una segunda longitud de onda, mientras que la resistencia de dicha señal óptica así como también la duración mientras la célula 1 pasa el punto de luz pueden usarse para identificar la presencia de la célula 1 por el citómetro de flujo, que luego desvía la célula 1 hacia una segunda trayectoria de flujo líquido o elimina mecánicamente la célula 1 del flujo líquido, al separar así la célula 1 de la base de fluido. En la práctica, la OFL 3 unida a la célula 1 puede ser en varios tipos de tintes fluorescentes o puntos cuánticos, al producir luz óptica emitida en múltiples longitudes de onda. También puede usarse una pluralidad de fuentes de luz de excitación en el mismo sistema de citómetro de flujo para producir puntos de luz de excitación en diferentes ubicaciones del
 50 flujo líquido con diferentes longitudes de onda de luz de excitación. Puede usarse una combinación de varias longitudes de onda producidas por la OFL 3 en la misma célula 1 para aumentar la especificidad de la

separación de la célula 1, especialmente cuando se necesita una combinación de varios tipos de marcadores de superficie 12 para identificar específicamente una población de células 1 objetiva de subcategoría a partir de una categoría principal del mismo tipo de células, por ejemplo, células CD4-T de otros glóbulos blancos.

En la Figura 1C, la célula 1 tiene marcadores de superficie 11 y 12. Las SPL 2 conjugadas con las sondas 21 y las OFL 3 conjugadas con las sondas 22 se unen a la superficie de la célula 1 después de los procesos de incubación 9 para formar la célula marcada magnética y ópticamente 30. La célula 30 permite la separación de la célula 30 con una combinación de separación magnética y un sistema de separación de células de base óptica, donde la separación magnética a través de la SPL 2 puede proporcionar una separación rápida de primera etapa de la categoría de célula que incluye la célula 30, mientras que la separación óptica a través de la OFL 3 puede proporcionar una segunda etapa de separación de la célula 30 después de la separación magnética con más especificidad. Alternativamente, la célula 30 puede separarse mediante las OFL 3 en una primera etapa y mediante las SPL 2 en una segunda etapa. En cualquier caso, las SPL 2 y las OFL 3 juntas pueden ayudar a aumentar la velocidad, la eficiencia y la especificidad en la separación de la célula 1 en comparación con la Figura 1A y la Figura 1B.

La Figura 2A muestra un ejemplo de separación magnética convencional mediante la SPL 2. En un contenedor 5, la solución líquida 6 contiene células 10 de la Figura 1A o células 30 de la Figura 1C que se unen con una pluralidad de SPL 2 en la superficie celular. El imán 4, preferentemente un imán permanente, se coloca cerca de la pared del contenedor 5. El imán 4 tiene una magnetización representada por la flecha 41 que indica un polo norte ("N") y un polo sur ("S") en la superficie superior e inferior del imán 4. El campo magnético producido por la magnetización 41 en la solución 6 es mayor en la pared del contenedor 5 que se opone directamente a la superficie N del imán 4, y menor en ubicaciones dentro de la solución 6 más alejadas del imán 4, lo que crea así un gradiente de campo magnético que apunta hacia el imán 4 dentro de la solución 6. Las SPL 2 unidas a la célula 10/30 son superparamagnéticas, que efectivamente no son magnéticas en ausencia de campo magnético, pero ganarán momento magnético en presencia del campo magnético producido por el imán 4. Con el momento magnético de las SPL 2 y el gradiente del campo magnético del imán 4, las células 10/30 se atraerán por la fuerza producida por el campo magnético desde el imán 4 hacia el imán 4. Después de un tiempo suficiente 7, las células 10/30 pueden agotarse de la solución 6 y formar un conglomerado en la superficie interior de la pared del contenedor 5 opuesta al imán 4. En la práctica convencional, la solución 6 puede eliminarse del contenedor 5, mientras se mantiene la posición del imán 4 con relación al contenedor 5, de modo que las células 10/30 se retienen como conglomerado contra el contenedor 5 dentro de la superficie. Después, el imán 4 puede eliminarse del contenedor 5. En ausencia de campo magnético, el conglomerado de células 10/30, junto con cualquier SPL libre no unida en el conglomerado, se autodesmagnetizará durante un tiempo prolongado para dejar de ser magnético y las células 10/30 podrán eliminarse del contenedor 5 como células individuales 10/30.

El método convencional como se muestra en la Figura 2A tiene limitaciones en las aplicaciones reales. Para que la SPL 2 sea superparamagnética, el tamaño de las partículas superparamagnéticas fundamentales ("SPN") contenidas en la SPL 2, por ejemplo partículas de óxido de hierro, deberá estar en el intervalo de 10 nm (nanómetros) a 30 nm, donde un tamaño de partícula más pequeño hace que las partículas sean más efectivamente superparamagnéticas pero más difíciles de ganar momento magnético en presencia del campo magnético, mientras que un tamaño de partícula más grande hace que sea más difícil que las partículas se vuelvan no magnéticas cuando se elimina el campo magnético. La SPL 2 típicamente se compone de SPN dispersas en una matriz no magnética. Por ejemplo, ciertas SPL 2 son una esfera sólida formada por SPN mezcladas uniformemente dentro de una base polimérica, típicamente de un tamaño superior a 1 μm (μm). En otro caso, la SPL 2 es una perla sólida formada por SPN mezcladas dentro de una base de óxido o nitruro, por ejemplo, nanopartículas de óxido de hierro mezcladas en una base de óxido de silicio, que puede tener un tamaño de unos pocos cientos de nanómetros o decenas de nanómetros. Para que las células 10/30 de la Figura 2A sean adecuadas para procesos celulares adicionales, incluido el cultivo celular y el análisis celular, es conveniente que el tamaño de la SPL 2 sea más pequeño que la propia célula, que es generalmente de unas pocas urnas. Por lo tanto, se desea la SPL 2 con tamaño sub- μm ($< 1\mu\text{m}$). Se prefiere un tamaño de la SPL 2 inferior a 500 nm. El tamaño de la SPL 2 inferior a 200 nm es el más preferido. Sin embargo, cuando el tamaño promedio de la SPL 2 es menor, la variación del tamaño de la SPL 2 se vuelve estadísticamente mayor. La Figura 2B muestra esquemas de ejemplo del momento magnético de la SPL 2 única en presencia de un campo magnético aplicado. La curva sólida 22 indica que la SPL 2 tiene un tamaño nominal de población, o tamaño promedio, donde el momento magnético de la SPL 2 aumenta con un campo magnético mayor. Con el aumento de la resistencia de campo magnético de 0 a H_s , el momento magnético de la SPL de tamaño nominal aumenta con resistencia de campo en una tendencia lineal al principio, hasta alcanzar una región de saturación donde el momento magnético se estabiliza en M_s , que se determina por el momento de saturación del material de SPN dentro de la SPL 2. Para la SPL 2 con un tamaño más pequeño que el tamaño nominal, la curva 23 indica que, con la misma resistencia de campo magnético, la SPL 2 de tamaño más pequeño gana un momento menor y, por lo tanto, experimenta una fuerza magnética menor, y requiere un campo superior para alcanzar el momento magnético de saturación M_s . Para una SPL 2 de mayor tamaño que el tamaño nominal, la curva 24 indica que la SPL 2 de mayor tamaño es más fácil de saturar a M_s con un campo inferior y gana un momento mayor con la misma resistencia de campo magnético.

Ahora, al remitirse a la Figura 2A, para la SPL 2 con un tamaño sub-um que es adecuado para la separación celular y los procesos celulares, el método convencional de la Figura 2A tiene la limitación de no ser capaz de producir una alta resistencia de campo magnético y un fuerte gradiente de campo magnético en la solución 6 en ubicaciones más alejadas de la pared del contenedor 5 opuesta a la superficie del imán 4 N. Por lo tanto, la SPL 2 de tamaño más pequeño de la curva 23 de la Figura 2B en el extremo más alejado del contenedor 5 del imán 4 puede ser difícil de magnetizar mediante el campo del imán 4 y experimenta una fuerza menor para mover la célula 10/30 hacia el imán 4. Para alcanzar el agotamiento completo de las células 10/30 en la solución 6 dentro del contenedor 5, puede requerir una cantidad significativa de tiempo. Mientras tanto, el volumen del contenedor 5 se limita también debido a que la resistencia de campo magnético del imán 4 puede no ser suficiente para magnetizar la SPL 2 más pequeña de la curva 23 de la Figura 2B en tamaños de contenedores 5 grandes. Además de que el proceso general es lento, otro inconveniente del método convencional de la Figura 2A es que la operación como se describió en la Figura 2A implica típicamente la exposición al aire del conglomerado de células 10/30 durante las etapas de eliminación de la solución y posterior eliminación de las células 10/30 del contenedor 5. Dicha exposición al aire plantea un desafío para lograr la separación estéril de las células 10/30 con fines clínicos, así como también el riesgo de daño o muerte de las células 10/30 que afecta negativamente a otros procesos celulares de las células 10/30.

La Figura 3A muestra otro ejemplo de separación magnética de células 10/30 con la SPL 2 en la técnica anterior. En la Figura 3A, la solución 6 que contiene las células 10/30 se pasa a través de una columna 31 que está rellena con esferas ferromagnéticas o ferromagnéticas 36. Al aplicar un campo magnético a través de la columna con los imanes 32 y 33, donde las líneas discontinuas 34 indican la dirección del campo magnético aplicado, las esferas 36 pueden magnetizarse por el campo y producir un campo magnético localizado en los espacios entre las esferas vecinas 36. Dicho campo local y gradiente de campo entre los espacios de las esferas 36 pueden ser fuertes, debido a las pequeñas dimensiones de los espacios, para magnetizar efectivamente la SPL 2 de todos los tamaños cuando la SPL 2 en la solución 6 pasa a través de los espacios entre las esferas 35 durante un flujo descendente de solución 6 como lo indica la flecha 35, donde la SPL 2 puede atraerse a la superficie de varias esferas 36 y separarse de la solución 6. La técnica anterior de la Figura 3A puede evitar efectivamente el problema de exposición al aire de la Figura 2A, y puede poseer una mayor velocidad de separación de células 10/30 que la Figura 2A durante el flujo 35. Sin embargo, una cuestión intrínseca del método de la Figura 3A es que, dado que las esferas 36 son ferromagnéticas y tienen un tamaño mucho mayor que las células 10/30, los dominios magnéticos en las esferas 36 existirán incluso después de eliminar los imanes 32 y 33 de la columna 31. Dichos dominios magnéticos, y las paredes de dominio entre los dominios, inevitablemente producirán un campo magnético local alrededor de la superficie de las esferas 36, lo que mantendrá las SPL 2 en las células 10/30 magnetizadas y atraerá fuertemente las células 10/30 cuando los imanes 32 y 33 se eliminan. Por lo tanto, las células 10/30 son inherentemente más difíciles de eliminar de la columna 31 en la Figura 3A que en la Figura 2A. La pérdida de células 10/30 debido a que no se eliminaron completamente de la columna 31 después de la separación es inherentemente alta. En ciertos métodos de la técnica anterior, puede usarse un flujo tampón presurizado de alta velocidad para forzar el lavado de las células 10/30 de las esferas en la columna 36. Sin embargo, dicho flujo forzado inevitablemente provocará daño mecánico a las células y aún dejará un porcentaje significativo de células 10/30 en la columna 31 debido al fuerte campo de pared de dominio de las esferas 36. Además de la pérdida de células 10/30, otro problema intrínseco del método de la Figura 3A es la introducción de esferas 36 como materiales extraños en el flujo de la solución 6, lo cual no es conveniente para el proceso estéril necesario para aplicaciones clínicas.

La Figura 3B muestra entonces otro método anterior similar al de la Figura 3A, excepto que se introduce una malla 37 hecha de ferromagnético o alambres ferromagnéticos en la columna 31 en lugar de esferas o bloques 36. Cuando los imanes 32 y 33 aplican el campo magnético 34, los alambres de la malla 37 se magnetizan y los alambres adyacentes de la malla 37 producen un campo magnético local alrededor de los alambres. Los espacios entre los alambres de la malla permiten que el fluido 6 fluya en la dirección 35 dentro de la columna. Cuando las células 10/30 están cerca de los alambres de la malla 37, las células 10/30 pueden atraerse hacia la superficie de alambre debido al campo magnético local y al gradiente de campo producido por los alambres de la malla 37. En comparación con la Figura 3A de la técnica anterior, la Figura 3B puede ajustar el tamaño de los alambres y el tamaño del espacio libre de la malla 37 para lograr un equilibrio entre la velocidad de separación de las células 10/30 y la pérdida de células en la columna. Sin embargo, en la práctica, debido a que el espacio entre las esferas 36 es mucho menor que el tamaño del espacio libre en la malla 37, la velocidad de separación de las células 10/30 en la Figura 3B es más lenta que la Figura 3A, mientras que la Figura 3B todavía posee el mismo problema de pérdida de células de la Figura 3A, donde los dominios en los alambres de la malla 37 mantienen el momento magnético de SPL 2 después de que se eliminan los imanes 32 y 33 y las células 10/30 se atraen a los alambres por el dominio y la pared de dominio. La pérdida de células 10/30 debido a los dominios magnéticos en los alambres de la malla 37 también existe en la Figura 3B. Adicionalmente, la Figura 3B es igual a la Figura 3A en cuanto a la introducción de la malla 37 como materiales extraños en el flujo de la solución 6, lo cual no es conveniente para un proceso estéril.

La Figura 3C muestra otra técnica anterior, donde los imanes 32 y 33 se unen cada uno con una guía de flujo

magnético blando 38 con un vértice. Las guías de flujo 38 producen un campo magnético localizado entre los vértices de las guías 38 con alta resistencia de campo y alto gradiente cerca de los vértices. La Figura 3C muestra la vista en sección transversal del conducto 39, que es intrínsecamente un tubo circular, mientras que la solución 6 que contiene células 10/30 fluye a lo largo de la longitud del tubo 39 en la dirección perpendicular a la vista en sección transversal. El tubo 39 se coloca en un lado del espacio de los vértices. Las líneas de campo magnético 34 exhiben una mayor densidad más cerca del espacio, lo que indica tanto una mayor resistencia de campo magnético como un mayor gradiente de campo magnético hacia el espacio. El campo magnético 34 produce una fuerza efectiva sobre las células 10/30 en la solución 6 y empuja las células 10/30 desde la solución 6 hacia la pared interior del tubo 39 que está más cerca de los vértices de las guías 38. La técnica anterior de la Figura 3C en comparación con la técnica anterior de la Figura 3A y la Figura 3B tiene las ventajas de: (1) no introducir materiales extraños en la trayectoria de flujo; (2) cuando los imanes 32 y 33 se eliminan del tubo junto con las guías 38, no hay ninguna esfera ferromagnética o ferromagnética 36 o malla 37 en el tubo, al evitar así la pérdida de células 10/30 relacionada con las estructuras de dominio.

Sin embargo, la técnica anterior de la Figura 3C también tiene deficiencias intrínsecas. La primera deficiencia es que la velocidad de flujo de la solución 6, o régimen de flujo, en el tubo 39 se limita por el diseño de la técnica anterior de la Figura 3C. La velocidad de separación de las células 10/30 de la técnica anterior como en la Figura 3C no es suficiente para muchas aplicaciones. El conducto de tubería circular 39, como se muestra en la Figura 3C experimenta un campo alto y un gradiente de campo alto en el extremo inferior del tubo 39, donde las células 10/30 más cercanas al extremo inferior del tubo 39 pueden experimentar una fuerza superior que las empuja a moverse hacia la superficie interna de la pared inferior del tubo 39 mucho más rápido. Sin embargo, para las células 10/30 más cercanas al extremo superior del tubo 39, debido al estrecho espacio en forma de cuña y a que la posición del tubo 39 está en un lado del espacio, el campo magnético y el gradiente son significativamente menores que el extremo inferior. Por lo tanto, las células 10/30 más cercanas al extremo superior del tubo 39 experimentan una fuerza mucho menor y se mueven al extremo inferior del tubo 39 a una velocidad mucho más lenta. Para una longitud limitada del tubo 39 en la dirección de vista perpendicular a la sección transversal, todas las células 10/30 dentro del fluido 6 que fluyen a través del tubo 39 deben separarse de la solución 6 para formar un conglomerado en la superficie interior del tubo cerca de los vértices antes de que la solución 6 salga del tubo 39. Debido a la velocidad más lenta de las células 10/30 que se mueven desde la parte superior del tubo 39, el régimen de flujo de la solución 6 debe ser lento de manera que pueda dar tiempo suficiente para que todas las células 10/30 cerca de la parte superior del tubo 39 se atraigan hacia el conglomerado. Si la solución 6 fluye a través del tubo 39 a mayor velocidad, provocará una separación incompleta de las células 10/30 de la solución. Tal limitación en el régimen de flujo debido al diseño circular del tubo 39, donde el extremo superior del tubo está más alejado de los vértices de campo alto y de gradiente alto, no se puede remediar con un tubo 39 de menor tamaño. Un tubo circular 39 con un tamaño de sección transversal más pequeño acercará el extremo superior del tubo 39 al espacio de la cuña. Sin embargo, debido al tamaño más pequeño de la sección transversal, el volumen de la solución 6 que fluye a través del tubo 39 en un período de tiempo unitario, es decir, el régimen de flujo de la solución 6, se reducirá cuando se mantenga la velocidad de flujo de la solución 6. Para mantener el mismo régimen de flujo que en un tubo 39 más grande, se debe aumentar la velocidad de flujo de la solución 6, lo que entonces da menos tiempo para que las células 10/30 en el extremo superior del tubo 39 de menor tamaño se muevan al sitio del conglomerado, y compensa el efecto del tubo de tamaño pequeño 39.

Una segunda deficiencia de la técnica anterior de la Figura 3C es la incapacidad de disociar la célula individual 10/30 del conglomerado de células 10/30 y la SPL 2 libre no unida, ya que el conglomerado no se autodesmagnetizará con facilidad después de que los imanes 32 y 33, junto con las guías 38, se eliminan del tubo 39 en aplicaciones reales. La desmagnetización de la SPL 2 depende de que las SPN dentro de la SPL 2 sean efectivamente nanopartículas. Sin embargo, a medida que el conglomerado forma un cuerpo más grande y efectivo de material superparamagnético, las SPN dentro de la SPL 2 experimentan un campo magnetoestático proveniente de una gran cantidad de SPN muy compactadas de la SPL 2 vecina en el conglomerado, lo que reduce la naturaleza superparamagnética de las SPN. En un caso, la SPL 2 de las células 10/30 dentro del conglomerado requiere mucho tiempo para autodesmagnetizarse, lo que no es práctico para muchas aplicaciones. En otro caso, el conglomerado no se autodesmagnetizará debido a que la SPN es más ferromagnética en forma de conglomerado, lo cual no es conveniente. El lavado a alta presión como se utiliza en la Figura 3A no es efectivo en la Figura 3C, ya que la mayor parte del área interior del tubo circular 39 está ocupada por espacio vacío, mientras que el conglomerado se compacta en el extremo inferior del tubo 39, dicho lavado fluirá principalmente a través de la sección superior del tubo 39 sin producir suficiente fuerza de fricción sobre el conglomerado de células 10/30 para eliminar las células 10/30 de la pared inferior del tubo 39. Como la técnica anterior no proporciona un método efectivo para disociar el conglomerado y eliminar las células 10/30 del tubo 39, tal deficiencia de la técnica anterior de la Figura 3C está limitando su aplicación.

Las técnicas anteriores están limitadas ya sea en provocar la pérdida de células e introducir materiales extraños en la trayectoria de flujo, o están limitadas en el régimen de flujo de la solución 6 y la capacidad de extraer células separadas del conglomerado con un método de disociación efectivo.

Es conveniente tener un método y un aparato que pueda lograr una separación magnética de alto régimen de flujo de células 10/30 sin introducir material extraño en la trayectoria de flujo de la solución biológica, y ser capaz de disociar las células 10/30 del conglomerado en prácticamente poco tiempo sin dañar las células.

- 5 El documento US 2007/182517 A1 describe una estructura magnética híbrida hecha de una combinación de imanes permanentes y materiales de polos ferromagnéticos que se ensamblan en una serie predeterminada.

Sumario de la invención

- 10 Se proporciona un dispositivo para separar entidades biológicas de acuerdo con la reivindicación 1.

Se proporciona un método para separar entidades biológicas de acuerdo con la reivindicación 12.

- 15 Esta invención describe métodos novedosos y dispositivos de separación magnética novedosos ("MAG") que son capaces de: (1) separar las entidades biológicas unidas con SPL de la solución biológica con un alto régimen de flujo, sin exposición de las entidades biológicas al aire y sin introducir material extraño en la trayectoria de flujo de la solución biológica que transporta las entidades biológicas; (2) disociar las entidades biológicas del conglomerado separado magnéticamente.

- 20 Breve descripción de las figuras.

La Figura 1A ilustra las etiquetas superparamagnéticas (SPL) que se unen a una célula.

La Figura 1B ilustra las etiquetas ópticas fluorescentes (OFL) que se unen a una célula.

- 25 La Figura 1C ilustra la unión de SPL y OFL a una célula.

La Figura 2A ilustra la unión de células con SPL separadas por un imán.

- 30 La Figura 2B es un gráfico de la magnetización de SPL frente a la resistencia de campo magnético para diferentes tamaños de SPL.

La Figura 3A es una vista en sección transversal de un separador de células magnético de la técnica anterior.

- 35 La Figura 3B es una vista en sección transversal de un separador de células magnético de la técnica anterior.

La Figura 3C es una vista en sección transversal de un separador de células magnético de la técnica anterior.

Las Figuras 4 a 11, 16, 17, 20 a 27 y 32 representan dispositivos que no están de acuerdo con la invención.

- 40 La Figura 4 es una vista en sección transversal de un primer dispositivo de separación magnética ("MAG") con un canal rígido en forma de "C".

- 45 La Figura 5 es una vista en sección transversal del primer MAG que tiene un canal rígido en forma de "C" en posición de separación.

La Figura 6 es una vista en sección transversal del primer MAG que tiene un canal rígido en forma de "C" en posición de separación con las células separadas.

- 50 La Figura 7 es una vista lateral de la Figura 6.

La Figura 8A es una vista en sección transversal de un segundo MAG.

La Figura 8B es una vista en sección transversal de un tercer MAG.

- 55 La Figura 9 es una vista en sección transversal del primer MAG con un canal flexible.

La Figura 10 ilustra el primer MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas.

- 60 La Figura 11 ilustra el primer MAG que tiene un canal flexible en posición elevada después de la separación de las células.

- 65 La Figura 12 ilustra una vista en sección transversal de la cuarta modalidad de MAG que tiene un canal rígido en forma de "D" en posición de separación.

- La Figura 13 ilustra una vista en sección transversal de la cuarta modalidad de MAG con un canal flexible.
- La Figura 14 ilustra una vista en sección transversal de la cuarta modalidad de MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas.
- 5 La Figura 15A ilustra una vista en sección transversal de la quinta modalidad de MAG.
- La Figura 15B ilustra una vista en sección transversal de la sexta modalidad de MAG.
- 10 La Figura 15C ilustra una vista en sección transversal de la séptima modalidad de MAG.
- La Figura 16 ilustra una vista en sección transversal de un par de terceros MAG con un par de canales flexibles en un único soporte de canal.
- 15 La Figura 17 ilustra una vista en sección transversal de un par de terceros MAG con un par de canales flexibles en un soporte de canal único en posición de separación.
- La Figura 18 ilustra una vista en sección transversal de cuatro de los quintos MAG con cuatro canales flexibles en un único soporte de canal.
- 20 La Figura 19 ilustra una vista en sección transversal de cuatro de los quintos MAG con cuatro canales flexibles en un soporte de canal único en posición de separación.
- La Figura 20A ilustra una vista en sección transversal del octavo MAG con un canal rígido en forma de "D" girado en posición de separación.
- 25 La Figura 20B ilustra una vista en sección transversal del octavo MAG con un canal flexible.
- La Figura 20C ilustra una vista en sección transversal del octavo MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas.
- 30 La Figura 21A ilustra una vista en sección transversal del noveno MAG que tiene un canal rígido en forma de "V" en posición de separación.
- 35 La Figura 21B ilustra una vista en sección transversal del noveno MAG con un canal flexible.
- La Figura 21C ilustra una vista en sección transversal del noveno MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas.
- 40 La Figura 22A ilustra la tercera modalidad del MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas y un imán de desmagnetización ("DMAG") colocado sobre y lejos de MAG.
- La Figura 22B ilustra el canal flexible de la Figura 22A que sale de MAG y se mueve a una posición donde el soporte de canal flexible está muy cerca o hace contacto con el imán DMAG.
- 45 La Figura 22C ilustra las células en el canal flexible de la Figura 22B disociadas del conglomerado por el imán DMAG.
- La Figura 22D ilustra el canal flexible de la Figura 22C que se mueve a una posición de campo magnético bajo entre el imán MAG y DMAG.
- 50 La Figura 23A ilustra la vibración mecánica que aplica un motor a un soporte de canal flexible después de que las células se separan magnéticamente dentro del canal flexible.
- 55 La Figura 23B ilustra la vibración ultrasónica que aplica un transductor piezoeléctrico ("PZT") a un soporte de canal flexible después de que las células se separan magnéticamente dentro del canal flexible.
- La Figura 23C ilustra la vibración mecánica que aplica un motor a un canal flexible después de que las células se separan magnéticamente dentro del canal flexible.
- 60 La Figura 23D ilustra la vibración ultrasónica que aplica un PZT a un canal flexible después de que las células se separan magnéticamente dentro del canal flexible.
- La Figura 23E es una vista lateral del canal flexible de la Figura 22D.
- 65 La Figura 24A ilustra el tercer MAG que tiene un soporte de canal flexible muy cerca de, o en contacto con,

un imán DMAG después de que las células se separan magnéticamente por MAG, donde el imán DMAG se coloca en el costado y lejos de MAG.

La Figura 24B ilustra el canal flexible de la Figura 24A que gira hacia una posición de campo magnético bajo entre el imán MAG y DMAG.

5

La Figura 25A ilustra un soporte de canal flexible en la posición de desmagnetización, donde el imán DMAG es un imán permanente.

10

La Figura 25B ilustra un soporte de canal flexible en la posición de desmagnetización, donde el imán DMAG es un imán permanente unido a un polo magnético blando.

La Figura 25C ilustra un soporte de canal flexible en la posición de desmagnetización, donde el imán DMAG es un imán permanente unido con un par de polos magnéticos blandos.

15

La Figura 25D ilustra un soporte de canal flexible en la posición de desmagnetización, donde el imán DMAG es un electroimán.

La Figura 25E ilustra un soporte de canal flexible en la posición de desmagnetización, donde un motor aplica vibración mecánica al imán DMAG.

20

La Figura 25F ilustra un soporte de canal flexible en la posición de desmagnetización, donde un PZT aplica vibración ultrasónica al imán DMAG.

La Figura 26A ilustra el tercer MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas. el extremo superior del canal flexible.

25

La Figura 26D ilustra el canal flexible de la Figura 26C que se mueve a la posición de desmagnetización.

30

La Figura 27A ilustra el tercer MAG que tiene un canal flexible en posición de separación con células separadas.

La Figura 27B ilustra el canal flexible y su soporte de la Figura 27A que salen de MAG.

35

La Figura 27C ilustra la vibración mecánica que aplica un motor al soporte de canal.

La Figura 27D ilustra la vibración ultrasónica que aplica un PZT al soporte de canal.

La Figura 28A ilustra una vista lateral de un canal flexible donde hay un canal flexible estirado mecánicamente.

40

La Figura 28B ilustra células que se disocian del conglomerado después de eliminar la fuerza externa de la Figura 28A.

La Figura 29A ilustra una vista lateral de un canal flexible donde el canal flexible se comprime mecánicamente.

45

La Figura 29B ilustra células que se disocian del conglomerado después de eliminar la fuerza externa de la Figura 29A.

50

La Figura 30A ilustra una vista lateral de un canal flexible donde el canal flexible se tuerce mecánicamente.

La Figura 30B ilustra células que se disocian del conglomerado después de eliminar la fuerza externa de la Figura 30A.

55

La Figura 31 es un diagrama esquemático que ilustra métodos para usar MAG para separar magnéticamente entidades biológicas de una solución de fluido.

La Figura 32 ilustra un método para alinear una cuña MAG de canal flexible de un dispositivo MAG.

60

La Figura 33A ilustra un canal flexible unido al puerto de salida de una bomba peristáltica, donde un limitador de flujo se une al canal flexible para reducir la pulsación del régimen de flujo.

La Figura 33B ilustra una vista de arriba hacia abajo de la estructura interna de un limitador de flujo de primer tipo.

65

La Figura 33C ilustra una vista lateral de un limitador de flujo de segundo tipo.

La Figura 34A ilustra el limitador de flujo de la Figura 33A que se desacopla del canal flexible.

5 La Figura 34B es una ilustración esquemática del régimen de flujo de fluido con pulsación grande.

La Figura 35A ilustra el limitador de flujo de la Figura 33A que se acopla al canal flexible.

10 La Figura 35B es una ilustración esquemática del régimen de flujo de fluido con pulsación reducida.

La Figura 36A ilustra el limitador de flujo de la Figura 33A que provoca que se acumule presión en el extremo de entrada de fluido del limitador de flujo.

15 La Figura 36B ilustra el limitador de flujo de la Figura 36A que se desacopla y provoca un pulso de fluido de alta velocidad que empuja las células disociadas de la Figura 36A fuera del canal.

La Figura 37 es una ilustración esquemática del régimen de flujo de fluido creado por el proceso de transición de la Figura 36A a la Figura 36B donde se desacopla el limitador de flujo.

20 La Figura 38A es una vista de arriba hacia abajo de un chip microfluídico ("UFL").

La Figura 38B es una vista en sección transversal de una porción del UFL de la Figura 38A que incluye la entrada de fluido de la entidad, la entrada de fluido tampón y parte del UFL.

25 La Figura 38C es un diagrama esquemático que ilustra un único nodo de presión fluidica creado entre dos paredes laterales del UFL de la Figura 38A mediante vibración ultrasónica generada por un PZT.

La Figura 38D es un diagrama esquemático que ilustra la onda acústica de fluido de la Figura 38C que provoca que entidades de mayor tamaño se muevan alrededor del centro del UFL.

30 La Figura 39 es un diagrama esquemático que ilustra métodos para usar UFL para separar entidades biológicas de diferentes tamaños.

35 La Figura 40A es una vista en sección transversal de una porción del primer UFL que incluye una capa magnética blanda formada uniformemente.

La Figura 40B es un diagrama esquemático que ilustra la onda acústica de fluido y la separación de entidades en UFL de la Figura 40A en presencia de un campo magnético.

40 La Figura 40C es un diagrama esquemático que ilustra una capa de protección depositada de manera conformable alrededor de la superficie UFL antes de colocar la tapa.

La Figura 41A es una vista de arriba hacia abajo de un segundo UFL que incluye un canal ancho y un canal estrecho en disposición secuencial.

45 La Figura 41B es una vista en sección transversal del segundo UFL a través del canal ancho.

La Figura 41C es una vista en sección transversal del segundo UFL a través de un canal estrecho.

50 La Figura 42A es una vista de arriba hacia abajo de un tercer UFL que incluye un canal ancho y un canal estrecho, y canales laterales desde la sección de transición de canal ancho a canal estrecho.

La Figura 42B es una vista en sección transversal del tercer UFL a través del canal ancho.

55 La Figura 42C es una vista en sección transversal del tercer UFL a través del canal estrecho y los canales laterales.

60 La Figura 43 es una vista de arriba hacia abajo de un cuarto UFL que tiene una reducción de ancho del canal de tres etapas a lo largo de la dirección de flujo del canal, y canales laterales desde las secciones de transición.

La Figura 44A ilustra un método de procesamiento de muestras de primer tipo que incluye UFL y MAG, con un conector de flujo de primer tipo que conecta la salida de entidad grande de UFL y la entrada MAG.

65 La Figura 44B ilustra un método de procesamiento de muestras de primer tipo con un conector de flujo de segundo tipo que conecta la salida de entidad grande UFL y la entrada MAG.

La Figura 44C ilustra un método de procesamiento de muestras de primer tipo con un conector de flujo de tercer tipo que conecta la salida de entidad grande UFL y la entrada MAG.

5 La Figura 45A ilustra un método de procesamiento de muestras de segundo tipo que incluye UFL y MAG, con un conector de flujo de primer tipo que conecta la salida de entidad pequeña UFL y la entrada MAG.

La Figura 45B ilustra un método de procesamiento de muestras de segundo tipo con un conector de flujo de segundo tipo que conecta la salida de entidad pequeña UFL y la entrada MAG.

10 La Figura 45C ilustra un método de procesamiento de muestras de segundo tipo con un conector de flujo de tercer tipo que conecta la salida de entidad pequeña UFL y la entrada MAG.

La Figura 46A ilustra un método de procesamiento de muestras de tercer tipo que incluye MAG y dUFL, con un conector de flujo de primer tipo que conecta la salida MAG y la entrada de fluido de la entidad UFL.

15 La Figura 46B ilustra un método de procesamiento de muestras de tercer tipo con un conector de flujo de segundo tipo que conecta la salida MAG y la entrada de fluido de la entidad UFL.

20 La Figura 46C ilustra un método de procesamiento de muestras de tercer tipo con un conector de flujo de tercer tipo que conecta la salida MAG y la entrada de fluido de la entidad UFL.

La Figura 47 ilustra un método de procesamiento de muestras de cuarto tipo que incluye múltiples UFL, un conector de flujo de cuarto tipo, y múltiples MAG.

25 La Figura 48 ilustra el método de procesamiento de muestras de quinto tipo que incluye múltiples UFL, un conector de flujo de quinto tipo, y múltiples MAG.

La Figura 49 ilustra el método de procesamiento de muestras de quinto tipo que incluye múltiples UFL, un conector de flujo de sexto tipo, y múltiples MAG.

30 La Figura 50 ilustra el método de procesamiento de muestras de séptimo tipo que incluye múltiples MAG, un conector de flujo de cuarto tipo, y múltiples UFL.

35 La Figura 51 ilustra el método de procesamiento de muestras de octavo tipo que incluye múltiples MAG, un conector de flujo de quinto tipo, y múltiples UFL.

La Figura 52 ilustra el método de procesamiento de muestras de noveno tipo que incluye múltiples MAG, un conector de flujo de sexto tipo, y múltiples UFL.

40 La Figura 53 ilustra un método de procesamiento de muestras de décimo tipo que incluye uno o más UFL y MAG, un conector de flujo de quinto o sexto tipo, y diferentes tipos de dispositivos de procesamiento de células.

45 La Figura 54A ilustra un método de procesamiento de muestras de undécimo tipo que incluye un proceso MAG de múltiples etapas.

La Figura 54B ilustra un método de procesamiento de muestras de duodécimo tipo que incluye un proceso MAG de ciclos múltiples.

50 La Figura 54C ilustra el método de procesamiento de muestras de decimotercer tipo que incluye un proceso UFL de múltiples etapas.

La Figura 55A ilustra el primer ejemplo de líneas fluidicas cerradas y desechables para el método de procesamiento de muestras de tercer tipo.

55 La Figura 55B ilustra líneas fluidicas de la Figura 55 A conectadas o unidas a varios dispositivos fluidicos para realizar el método de procesamiento de muestras de tercer tipo.

60 La Figura 56A ilustra un segundo ejemplo de líneas fluidicas cerradas y desechables para un método de procesamiento de muestras de tercer tipo.

La Figura 56B ilustra líneas fluidicas de la Figura 56A conectadas o unidas a varios dispositivos fluidicos para realizar un método de procesamiento de muestras de tercer tipo.

65 La Figura 57A ilustra un ejemplo de líneas fluidicas cerradas y desechables para el método de procesamiento

de muestras de primer tipo.

La Figura 57B ilustra líneas fluidicas de la Figura 57A conectadas o unidas a varios dispositivos fluidicos para realizar el método de procesamiento de muestras de primer tipo.

La Figura 58A ilustra un ejemplo de líneas fluidicas cerradas y desechables para el método de procesamiento de muestras de segundo tipo.

La Figura 58B ilustra líneas fluidicas de la Figura 58A conectadas o unidas a varios dispositivos fluidicos para realizar un método de procesamiento de muestras de segundo tipo.

La Figura 59A ilustra un ejemplo de líneas fluidicas cerradas y desechables para el procesamiento de muestras a través de un único MAG.

La Figura 59B ilustra líneas fluidicas de la Figura 59A conectadas o unidas a varios dispositivos fluidicos para realizar el procesamiento de muestras a través de un único MAG.

La Figura 60A ilustra un ejemplo de líneas fluidicas cerradas y desechables para el procesamiento de muestras a través de un único UFL.

La Figura 60B ilustra líneas fluidicas de la Figura 60A conectadas o unidas a varios dispositivos fluidicos para realizar el procesamiento de muestras a través de un único UFL.

La Figura 61A ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 56B mediante el uso de cámaras presurizadas en bolsas de muestra de entrada para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 61B ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 56B mediante el uso de cámaras de vacío en bolsas de muestra de salida para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 62A ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 57B mediante el uso de cámaras presurizadas en bolsas de muestra de entrada para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 62B ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 57B mediante el uso de cámaras de vacío en bolsas de muestra de salida para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 63A ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 58B mediante el uso de cámaras presurizadas en bolsas de muestra de entrada para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 63B ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 58B mediante el uso de cámaras de vacío en bolsas de muestra de salida para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 64A ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 59B mediante el uso de cámaras presurizadas en bolsas de muestra de entrada para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 64B ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 59B mediante el uso de cámaras de vacío en bolsas de muestra de salida para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 65 A ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 60B mediante el uso de cámaras presurizadas en bolsas de muestra de entrada para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 65B ilustra la sustitución de las bombas peristálticas de la Figura 60B mediante el uso de cámaras de vacío en bolsas de muestra de salida para impulsar el fluido a través de líneas fluidicas.

La Figura 66 ilustra un primer flujo de proceso para separar entidades biológicas de sangre periférica mediante el uso de UFL y MAG.

La Figura 67 ilustra un segundo flujo de proceso para separar entidades biológicas de sangre periférica mediante el uso de MAG.

La Figura 68 ilustra un tercer flujo de proceso para separar entidades biológicas de sangre periférica mediante el uso de MAG.

La Figura 69 ilustra un cuarto flujo de proceso para separar entidades biológicas de sangre periférica mediante el uso de MAG.

La Figura 70 ilustra un quinto flujo de proceso para separar entidades biológicas de una muestra de tejido

mediante el uso de UFL y MAG.

La Figura 71 ilustra un sexto flujo de proceso para separar entidades biológicas de una muestra de tejido mediante el uso de MAG.

5

La Figura 72 ilustra un séptimo flujo de proceso para separar entidades biológicas de una muestra de hisopo de superficie mediante el uso de UFL y MAG.

La Figura 73 ilustra un octavo flujo de proceso para separar entidades biológicas de una muestra de hisopo de superficie mediante el uso de MAG.

10

La Figura 74 ilustra un noveno flujo de proceso para separar entidades biológicas de una muestra sólida mediante el uso de UFL y MAG.

La Figura 75 ilustra un décimo flujo de proceso para separar entidades biológicas de una muestra sólida mediante el uso de MAG.

15

La Figura 76A ilustra la adición de etiquetas tanto magnéticas como fluorescentes en muestras de fluido para la unión específica a células o entidades objetivo.

20

La Figura 76B ilustra la incubación de etiquetas tanto magnéticas como fluorescentes al mismo tiempo para formar unión específica a células o entidades objetivo. La Figura 77A ilustra el proceso de retirar etiquetas magnéticas libres no unidas del fluido de muestra mediante UFL antes de la separación magnética por MAG.

La Figura 77B ilustra el proceso de retirar etiquetas magnéticas libres no unidas del fluido de muestra mediante UFL después de la separación magnética por MAG.

25

La Figura 78A ilustra el proceso de retirar etiquetas magnéticas libres no unidas y etiquetas fluorescentes libres del fluido de muestra mediante UFL antes de la separación magnética por MAG.

30

La Figura 78B ilustra el proceso de retirar etiquetas magnéticas libres no unidas y etiquetas fluorescentes libres del fluido de muestra mediante UFL después de la separación magnética por MAG.

La Figura 79 ilustra el proceso continuo de muestra MAG negativa a través de UFL y varios dispositivos y procedimientos de procesamiento celular.

35

La Figura 80 ilustra el proceso continuo de muestra MAG negativa a través de UFL y varios dispositivos de procesamiento de partículas o moléculas.

La Figura 81 ilustra el análisis de entidades de una muestra MAG negativa después de la separación de MAG en varios dispositivos de análisis.

40

La Figura 82 ilustra el proceso continuo de una muestra MAG positiva a través de UFL y varios dispositivos y procedimientos de procesamiento celular.

45

La Figura 83 ilustra el proceso continuo de una muestra MAG positiva a través de UFL y varios dispositivos de procesamiento de partículas o moléculas.

La Figura 84 ilustra el análisis de entidades de una muestra MAG positiva después de la separación de MAG en varios dispositivos de análisis.

50

La Figura 85A ilustra la adición de etiquetas fluorescentes para unirse específicamente a entidades objetivo dentro de una muestra MAG negativa inmediatamente después de la recolección de la muestra MAG negativa.

55

La Figura 85B ilustra la adición de etiquetas fluorescentes para unirse específicamente a entidades objetivo dentro de una muestra MAG positiva inmediatamente después de la recolección de la muestra MAG positiva.

La Figura 86A ilustra el primer ejemplo de tratamiento del cáncer.

60

La Figura 86B ilustra un segundo ejemplo de tratamiento del cáncer.

La Figura 86C ilustra el tercer ejemplo de tratamiento del cáncer.

La Figura 87 ilustra el primer método de detección de tumores.

65

La Figura 88 ilustra el segundo método de detección de tumores.

La Figura 89 ilustra el tercer método de detección de tumores.

5 La Figura 90 ilustra un primer flujo de proceso para obtener plasma libre de células.

La Figura 91 ilustra un segundo flujo de proceso para obtener plasma libre de células.

La Figura 92 ilustra un tercer flujo de proceso para obtener plasma libre de células.

10

La Figura 93 ilustra el método de uso de un detector de tumores con fines antienviejecimiento.

Para fines de claridad y brevedad, los elementos y componentes similares llevarán las mismas designaciones y numeraciones en todas las Figuras, que no necesariamente están dibujadas a escala.

15

Descripción detallada de la invención

Si bien la presente invención puede llevarse a la práctica en muchas formas, diseños o configuraciones diferentes para el propósito de proporcionar un entendimiento de los principios de la invención, se hará referencia ahora a las modalidades ilustradas en los dibujos y se usará un lenguaje específico para describir la misma. No obstante, se entenderá que de esta manera no se pretende ninguna limitación o restricción del alcance de la invención. Cualquier alteración e implementación adicional de los principios de la invención como se describió en la presente descripción se contemplan como normalmente se le ocurriría a un experto en la técnica a la que se refiere la invención.

20

25

Las entidades biológicas a las que nos referiremos en lo sucesivo incluyen: células, bacterias, virus, moléculas, partículas que incluyen ARN y ADN, conglomerado de células, conglomerado de bacterias, conglomerado de moléculas, y conglomerado de partículas. Las entidades grandes y las entidades pequeñas se refieren a entidades biológicas dentro del mismo fluido que tienen un tamaño físico relativamente mayor y un tamaño físico menor. En una modalidad, las entidades grandes incluyen cualquiera de: células, bacterias, conglomerado de células, conglomerado de bacterias, conglomerado de partículas, entidades unidas con etiquetas magnéticas, y entidades unidas con una etiqueta óptica. En otra modalidad, las entidades pequeñas incluyen cualquiera de: moléculas, partículas, virus, restos celulares, etiquetas magnéticas libres no unidas y etiquetas ópticas libres no unidas. En otra modalidad, las entidades grandes tienen un tamaño físico mayor que 1 micrómetro (um), y las entidades pequeñas tienen un tamaño físico menor que 1 um. En aún otra modalidad, las entidades grandes tienen un tamaño físico mayor que 2 um y las entidades pequeñas tienen un tamaño físico menor que 500 nanómetros (nm). En aún otra modalidad, las entidades grandes tienen un tamaño físico mayor que 5 um, y las entidades pequeñas tienen un tamaño físico menor que 2 um. Las muestras biológicas incluyen: sangre, fluido corporal, tejido extraído de cualquier parte del cuerpo, médula ósea, cabello, uñas, huesos, dientes, líquidos y sólidos de secreciones corporales, o hisopos de superficie de cualquier parte del cuerpo. El líquido de entidad, o muestra de fluido, o muestra de líquido, o solución de muestra, incluye: muestra biológica en su forma líquida original, entidades biológicas que se disuelven o dispersan en un líquido tampón, o muestra biológica después de la disociación de su forma no líquida de muestra biológica original y dispersada en un fluido tampón. Las entidades biológicas y las muestras biológicas pueden obtenerse de humanos o animales. Las entidades biológicas también pueden obtenerse de plantas y del medio ambiente, incluidos el aire, el agua y el suelo. El fluido de entidad, o la muestra de fluido, o la muestra pueden contener varios tipos de etiquetas magnéticas u ópticas, o uno o más reactivos químicos que pueden agregarse durante varias etapas dentro de las modalidades de esta invención. El régimen de flujo de muestra es la cantidad de volumen de una muestra de fluido que fluye a través de una sección transversal de un canal, o una parte de fluido, o una trayectoria de fluido, en una unidad de tiempo, donde el volumen puede estar en unidades de litro (l), mililitro (ml), microlitro (ul), nanolitro (nl), y la unidad de tiempo puede estar en unidades de minuto (min), segundo (s), milisegundo (ms), microsegundo (us), nanosegundo (ns). La velocidad de flujo de muestra es la distancia de una molécula libre o una entidad libre que viaja dentro de una muestra de líquido en un canal, o una parte fluidica, o una trayectoria fluidica, en una unidad de tiempo, donde la distancia puede estar en unidades de metro (m), centímetro (cm), milímetro (mm), micrómetro (um). La eficiencia de separación es el porcentaje de entidades objetivo dentro de una muestra de líquido que se separan con éxito de la muestra de líquido mediante un método diseñado para separar las entidades objetivo. El fluido tampón es una base de fluido donde se pueden disolver o dispersar entidades biológicas sin introducir entidades biológicas adicionales.

40

45

50

55

60

Las Figuras 4 a 11, 16, 17, 20 a 27 y 32 representan dispositivos que no están de acuerdo con la invención. La Figura 12 ilustra una vista en sección transversal de la cuarta modalidad del dispositivo de separación magnética ("MAG") 124. MAG 124 tiene tres polos magnéticos blandos 111, 112 y 113. El polo central 111 se une a la superficie N del imán permanente 109 en un extremo de recolección de flujo 1112, y el flujo 1048 desde la superficie N del imán 109 se conduce por el cuerpo magnético blando del polo 111 y luego se emite desde un extremo de punta 1111, que tiene un tamaño de área mucho más pequeña que el extremo de

65

recolección de flujo 1112 del polo 111, y funciona para producir un campo alto local alrededor del extremo de punta 1111 al concentrar el flujo magnético conducido desde el imán 109. Los polos laterales 112 y 113 tienen cada uno un extremo de recolección de flujo 1122 y 1132 respectivamente, que se unen a la misma superficie superior de un protector inferior magnético blando 114. Luego se une el protector inferior 114 a la superficie S del imán permanente 109.

Por lo tanto, el flujo magnético 1049 desde la superficie S del imán 109 se conduce en el cuerpo del protector inferior 114 y se divide entre los polos 112 y 113 y además se conduce hasta los extremos de puntas 1121 y 1131 de los polos 112 y 113 respectivamente. El extremo de punta 1111 se forma cerca de los extremos de punta 1121 y 1131. En una modalidad, el extremo de punta 1111 puede retraerse desde un plano imaginario donde los extremos de puntas 1121 y 1131 residen hacia el imán 109 en una distancia de desplazamiento de entre 0 mm y 1 mm. En otra modalidad, el extremo de punta 1111 puede retraerse desde un plano imaginario donde los extremos de puntas 1121 y 1131 residen hacia el imán 109 en una distancia de desplazamiento de entre 1 mm y 5 mm. En aún otra modalidad, el extremo de punta 1111 puede retraerse desde un plano imaginario donde los extremos de puntas 1121 y 1131 residen hacia el imán 109 en una distancia de desplazamiento de entre 5 mm y 10 mm. Se prefiere que el extremo de punta 1111 se separe igualmente de los extremos de punta 1121 y 1131. La sección superior del polo 112 se inclina hacia el lado derecho, mientras que la sección superior del polo 113 se inclina hacia la izquierda. Dicha inclinación tiene como objetivo aumentar el espacio entre los cuerpos principales de los polos 112 y 113 y el cuerpo principal del polo 111 para reducir la fuga de flujo de manera que se maximice la concentración de flujo alrededor de los extremos de puntas 1111, 1121 y 1131. Cuando se emite flujo desde los extremos de puntas 1111, 1121 y 1131, dado que el flujo 1048 conducido por el polo central 111 se opone al flujo 1049 conducido por los polos laterales 112 y 113, el flujo forma un cierre entre los extremos de puntas 1111 a 1112, y los extremos de puntas 1111 al 1131. Por lo tanto, el flujo magnético generado por las superficies N y S del imán 109 se conduce dentro de los cuerpos de los polos 111, 112, 113 y el protector 114 con una fuga mínima hacia el exterior de la estructura MAG 124. La densidad de flujo es más alta alrededor del extremo de punta 1111, y los extremos de punta 1121 y 1131 también producen una alta densidad de flujo, lo que indica un alto campo magnético y gradiente de campo alrededor de los extremos de punta 1111, 1121 y 1131. En comparación con MAG 121, 122 y 123, MAG 124 tiene la ventaja de un cierre de flujo más eficiente dentro de los cuerpos magnéticos blandos MAG 124 con menos fugas y, por lo tanto, mayor densidad de flujo alrededor del extremo de punta 1111 para producir un mayor campo magnético y gradiente de campo en el canal 301.

Los polos 111, 112 y 113, el imán 109 y el canal 301 se extienden en la dirección perpendicular a la vista en sección transversal de la Figura 12, la que en adelante se referirá como "dirección longitudinal". El canal 301 es un canal rígido, y tiene una forma fija similar a una "D" girada. Se muestra que el canal 301 está en posición de separación magnética en la Figura 12, donde los extremos de puntas 1111, 1121 y 1131 pueden estar todos en contacto con la superficie inferior curva 3011 de la forma "D" del canal 301, que proporciona el campo magnético más alto posible y gradiente de campo que MAG 124 puede producir en el espacio del canal donde la muestra de fluido fluye en el canal 301. En otra modalidad, el extremo de punta 1111 puede estar en contacto con la superficie 3011 y los extremos de puntas 1121 y 1131 no están en contacto con la superficie 3011. La superficie superior 3012 del canal 301, en una modalidad, puede estar en el plano imaginario donde residen los extremos de puntas 1121 y 1131, y en otra modalidad, la superficie superior 3012 puede estar por encima del plano imaginario entre 0 mm y 1 mm, y en otra modalidad más la superficie superior 3012 puede estar por encima del plano imaginario entre 1 mm y 5 mm. En una modalidad, el grosor de la pared del canal 301 en la superficie 3012 es más grueso que el grosor de la pared en la superficie 3011. El canal 301 puede unirse a un soporte de canal no magnético 110 en la superficie superior 3012. El soporte de canal 110 puede alinear el canal 201 con el espacio MAG de MAG 124, mover el canal 301 a la posición de separación en contacto con el extremo de punta 1111 del polo 111 de MAG 124, o levantar el canal 301 lejos del MAG 124 después de la separación magnética.

La Figura 13 muestra una vista en sección transversal de la cuarta modalidad MAG 124 que se usa para la separación magnética en combinación con el canal flexible 201. Antes de la separación magnética, el soporte de canal 110 se une al canal 201. El soporte de canal 110 alinea el canal 201 con el espacio MAG de MAG 124 que está compuesto por los extremos de punta 1111, 1121 y 1131 como en la Figura 12, y mueve el canal 201 hacia el espacio MAG de MAG 124 en la dirección 1014.

La Figura 14 ilustra el canal flexible 201 en posición de separación en la cuarta modalidad MAG 124 con las células 10/30 que se separan y forman un conglomerado alrededor de las paredes laterales e inferiores del canal 201 cerca de los extremos de punta 1111, 1121 y 1131. En la Figura 14, el canal flexible 201 se deforma para ajustarse a los límites del espacio MAG, que son principalmente los extremos de puntas 1111, 1121 y 1131. La forma del canal 201 puede ser diferente del canal 301 en la posición de separación debido a que el canal flexible 201 se adapta a los límites del espacio MAG bajo la presión del soporte 110. La forma del canal 201 en la Figura 14 puede proporcionar un mayor régimen de flujo de la muestra de líquido con una mayor eficiencia de separación que el canal 301. La distancia 1071 entre la superficie inferior 1150 del soporte 110 y el extremo de punta 1111 puede ajustarse para optimizar el régimen de flujo en el canal 201. En una modalidad, la distancia 1071 es más que 0 mm y menor o igual a 1 mm. En otra modalidad, la

distancia 1071 es más que 1 mm y menor o igual a 3 mm. En aún otra modalidad, la distancia 1071 es más de 3 mm y menor o igual a 5 mm. En aún otra modalidad, la distancia 1071 es más de 5 mm y menor o igual a 10 mm. En aún otra modalidad, la distancia 1071 es más de 2 veces y menor o igual a 3 veces del grosor de la pared del canal flexible 201. En aún otra modalidad, la distancia 1071 es más de 3 veces y menor o igual a 5 veces el grosor de la pared del canal flexible 201. En aún otra modalidad, la distancia 1071 es más de 5 veces y menor o igual a 10 veces el grosor de la pared del canal flexible 201.

La Figura 15A ilustra una vista en sección transversal de la quinta modalidad MAG 125. MAG 125 es igual que MAG 124, excepto que el imán 109 y el protector inferior 114 de MAG 124 de la Figura 12 se eliminan en MAG 125. Los imanes permanentes 115 y 116 con magnetizaciones opuestas 1151 y 1161 se colocan entre los polos 111 y 112, y entre los polos 111 y 113, respectivamente, como se muestra en la Figura 15A. Las magnetizaciones 1151 y 1161 son horizontales y permiten que el polo central 111 conduzca el flujo de superficie N desde ambos imanes 115 y 116, mientras que los polos laterales 112 y 113 conducen cada uno el flujo de superficie S desde el imán 115 y 116 respectivamente. En comparación con MAG 124, MAG 125 puede producir un campo más alto alrededor de los extremos de puntas 1111, 1121 y 1131 debido a que se usan dos imanes 115 y 116. MAG 125 también puede ser más fácil de ensamblar que MAG 124.

La Figura 15B ilustra una vista en sección transversal de la sexta modalidad MAG 126. MAG 126 es igual que MAG 124, excepto que los polos laterales 112 y 113 se unen cada uno a la superficie S de los imanes permanentes 1092 y 1094 respectivamente, con las magnetizaciones 1093 y 1095 opuestas a la magnetización 1091 del imán 109. El protector inferior 114 se une tanto a la superficie N del imán 1092 y 1094 como a la superficie S del imán 109, al formar así un cierre de flujo interno en el protector 114 entre los imanes 109, 1092 y 1094. En comparación con MAG 124, MAG 126 puede producir un campo más alto alrededor de los extremos de puntas 1111, 1121 y 1131 debido a que en MAG 126 se usan tres imanes 109, 1092 y 1092.

La Figura 15C ilustra una vista en sección transversal de la séptima modalidad MAG 127. MAG 127 es igual que MAG 126 de la Figura 15B, excepto que se elimina el protector inferior 114.

A partir de la Figura 22, Figura 23 y Figura 27, se describirán varios métodos para desmagnetizar o disociar células separadas magnéticamente 10/30 del conglomerado en el canal MAG. Para simplificar la descripción, se usa el canal flexible 201. Sin embargo, los canales en la Figura 22A a la Figura 27D pueden marcarse como "201/101", lo que indica que el canal flexible 201 tal como se usa para la descripción puede reemplazarse con el canal rígido 101 sin afectar la función y los resultados del método descrito. También para simplificar la descripción, MAG 123, que no forma parte de la invención, se usa en la Figura 22A a la Figura 27D, mientras que cualquier otro MAG 124-127, de acuerdo con la invención, junto con el canal correspondiente como se describió en las figuras anteriores puede usarse bajo los mismos conceptos sin limitación.

La Figura 22A es sustancialmente similar a la Figura 10, donde el canal 201 está en la posición de separación y las células 10/30 se han separado por el campo magnético de MAG. En la Figura 22A, se usa MAG 123 en lugar de MAG 121 de la Figura 10. El soporte de canal 1081 puede ser diferente del soporte de canal 107 de la Figura 10 al tener una muesca en la superficie superior que permite que la estructura magnética de desmagnetización o disociación de las células 10/30 ("DMAG"), que es el imán permanente 120 en la Figura 22A, pueda acercarse más al canal 201/101 para proporcionar campo suficiente para desmagnetizar o disociar las células 10/30 del conglomerado en el canal 201/101. Se prefiere dicha muesca, pero puede no requerirse. El imán DMAG 120 se coloca lejos del MAG 123 de la Figura 22A sin afectar la separación magnética de las células 10/30 por MAG 123. La magnetización del imán DMAG 120 se etiqueta en dirección vertical 1201, pero también puede ser en dirección horizontal sin causar diferencia funcional. La posición del canal 201/101 con relación a MAG 123 y DMAG 120 en la Figura 22A es la "Posición 1".

La Figura 22B es similar a la Figura 11, donde el soporte de canal 1081 mueve el canal 201/101 lejos de MAG 123 y entra en contacto o está muy cerca del imán DMAG 120 en la superficie superior del soporte 1081, donde el imán 120 puede encajar en la muesca del soporte 1081 para proporcionar el campo magnético más alto en el conglomerado de células 10/20 en el canal 201/101. Las células 10/30 forman un conglomerado después de la separación magnética mediante MAG y no se liberan del conglomerado automáticamente debido a que SPL 2 en las células 10/30 no se autodesmagnetizan cuando forman parte de un conglomerado. Al retirar las células 10/30 gradualmente con un gradiente de campo magnético del imán 120, por ejemplo las células 10/30 con mayor momento magnético SPL 2 que responden más rápido al campo magnético más débil de DMAG 120, el conglomerado puede alcanzar un volumen crítico que las células restantes 10/30 en el conglomerado no ven suficiente campo magnetostático de otras células 10/30 y se autodesmagnetizarán en células individuales 10/20 debido a la naturaleza superparamagnética recuperada de SPL 2. Por lo tanto, para disociar las células 10/30 del conglomerado, al retirar cierta cantidad de células 10/30 o dividir el conglomerado de una pieza grande continua en múltiples piezas más pequeñas ayudará a las células 10/30 a lograr la autodesmagnetización. La posición del canal 201/101 con relación a MAG 123 y DMAG 120 en la Figura 22B es la "Posición 2". El canal 201 en comparación con el canal 101

puede tener una ventaja durante la disociación de las células 10/30 mediante el imán DMAG 120, ya que el canal 201 proporciona un espacio de canal más grande que permite una mayor separación entre las células 10/30 libres y del conglomerado, o entre piezas de conglomerado fragmentadas, lo cual ayuda a reducir el acoplamiento magnetoestático y mejora la velocidad de autodesmagnetización de SPL 2 en las células 10/30. Para el canal flexible 201, antes de la Posición 2 o en la Posición 2, se prefiere llenar el canal 201 con fluido tampón adicional para devolver el canal 201 a su forma circular para un mayor espacio del canal.

La Figura 22C ilustra las células 10/30 en el canal 201/101 de la Figura 22B que se disocian del conglomerado por el imán DMAG 120 en la Posición 2.

La Figura 22D ilustra que el soporte de canal 1081 mueve el canal 201/101 desde la Figura 22C Posición DMAG 2 a una posición, "Posición 3", entre MAG 123 y el imán DMAG 120. En la Posición 3, el campo combinado en las células 10/30 dentro del canal 201/101 puede ser el más pequeño, lo cual puede ayudar a que SPL 2 se autodesmagnetice. El canal 201/101 puede mantenerse en la Posición 3 durante un tiempo prolongado para permitir que SPL 2 y las células 10/30 se autodesmagneticen por completo y se conglo meren para disociarse.

Para una ruptura efectiva del conglomerado, pueden agregarse agitaciones mecánicas al conglomerado mediante la fuerza magnética ejercida por los imanes MAG y DMAG. Por ejemplo, el soporte de canal 1081 puede alternar el canal 201/101 entre las Posiciones 1 y 2, o las Posiciones 2 y 3, o las Posiciones 1, 2 y 3, de manera que la fuerza magnética alterna de MAG y DMAG pueda mover todo o parte del conglomerado en el espacio de canal, lo que ayuda a dividir el conglomerado en piezas más pequeñas o provocar que suficientes células 10/30 se liberen del conglomerado y el conglomerado puede autodisociarse. Después de que el conglomerado se haya disociado lo suficiente, las células libres 10/30 pueden eliminarse del canal 201/101 en la Posición 3 o la Posición 2.

La Figura 23A ilustra la vibración mecánica que puede aplicar el motor 130 al soporte de canal 1081 cuando el canal 201/101 está en la Posición 2 o la Posición 3 de la Figura 22B y la Figura 22C. Dicha vibración puede transferirse desde el soporte 1081 a través de la pared del canal 201/101 y al fluido dentro del canal 201/101 para provocar un flujo de turbulencia localizado en varias ubicaciones dentro del canal 201/101, lo cual puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado en pequeñas piezas para ayudar a la disociación del conglomerado.

La Figura 23B ilustra la vibración ultrasónica que puede aplicar un transductor piezoeléctrico ("PZT") 131 al soporte de canal 1081. De manera similar a la Figura 23A, la vibración ultrasónica puede transferirse al fluido dentro del canal 201/101 para provocar turbulencia de alta frecuencia localizada dentro del canal 201/101, lo cual puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado en pequeñas piezas para ayudar a la disociación del conglomerado.

La Figura 23C ilustra la vibración mecánica de la Figura 23A que puede aplicar directamente el motor 130 a la pared del canal 201/101.

La Figura 23D ilustra la vibración ultrasónica de la Figura 23B que puede aplicar directamente el PZT 131 a la pared del canal 201/101.

La Figura 23E es una vista lateral del canal 201/101 a lo largo de la dirección 61 como en la Figura 22D.

La flecha 1030 representa un flujo de fluido pulsado de dirección alterna que puede aplicarse a la muestra de líquido del canal para producir una fluctuación del flujo en el líquido dentro del canal 201/101, lo cual también puede producir un flujo de turbulencia local con fluido en el canal 201/101 para ayudar a romper mecánicamente el conglomerado en pequeñas piezas para ayudar a la autodisociación del conglomerado. El flujo pulsado alterno de la Figura 23E puede combinarse con los métodos de vibración de la Figura 23A a la Figura 23D para aplicarlos al canal 201/101 en la Posición 2 o la Posición 3 de la Figura 22B a la Figura 22D.

Cuando el conglomerado en el canal 201/101 es de gran tamaño, pueden usarse múltiples rondas de disociación de células 10/30 con los métodos de la Figura 22B a la Figura 23E, y lavado de células 10/30 fuera del canal 201/101. Durante cada lavado, una cierta parte de las células 10/30 puede eliminarse del canal, lo que hace que la disociación de las células 10/30 restantes que aún están en el conglomerado en el canal 201/101 sea más fácil en la siguiente ronda.

En la Figura 27A, el canal 201/101 está en la posición de separación y las células 10/30 se separan por el campo magnético de MAG 123. La posición del canal 201/101 con relación al MAG 123 es la "Posición 21". El canal 201/101 se une al soporte 1082 en la Figura 27A.

La Figura 27B ilustra que el canal 201/101 de la Figura 27A se eleva desde el MAG 123 hasta la Posición 22 del campo inferior mediante el soporte 1082.

La Figura 27C ilustra que en la Posición 22, la disociación de las células 10/30 en el canal 201/101 puede lograrse sólo mediante vibración mecánica ejercida por el motor 130. La Figura 27C muestra que el motor 130 aplica vibración mecánica al soporte 1082, donde dicha vibración puede transferirse desde el soporte 1082 a través de la pared del canal 201/101 y al fluido dentro del canal 201/101 para provocar un flujo de turbulencia localizado en varias ubicaciones dentro del canal 201/101, lo cual puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado en piezas pequeñas para ayudar a la autodisociación de las células del conglomerado 10/30. El motor 130 también puede ejercer vibración directamente sobre el canal 201/101 como se muestra en la Figura 23C en lugar de a través del soporte 1082. Puede aplicarse un flujo de fluido pulsado de dirección alterna como se describió en la Figura 23E a la muestra de líquido del canal para producir una vibración del flujo en el líquido dentro del canal 201/101 al mismo tiempo que se aplica la vibración del motor 130.

La Figura 27D ilustra que en la Posición 22, la disociación de las células 10/30 en el canal 201/101 puede lograrse principalmente mediante la vibración ultrasónica ejercida por el PZT 131. La Figura 27D muestra que el PZT 131 aplica vibración ultrasónica al soporte 1082, donde la vibración ultrasónica puede transferirse al fluido dentro del canal 201/101 para provocar turbulencia de alta frecuencia localizada dentro del canal 201/101, lo cual puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado en piezas pequeñas para ayudar a la autodisociación de las células del conglomerado 10/30. El PZT 131 también puede ejercer vibración ultrasónica directamente en el canal 201/101 como se muestra en la Figura 23D. Puede aplicarse un flujo de fluido pulsado de dirección alterna como se describió en la Figura 23E a la muestra de líquido del canal para producir una vibración del flujo en el líquido dentro del canal 201/101 al mismo tiempo que se aplica la vibración ultrasónica de PZT 131.

Las Figuras 28A a 30B describen modalidades de métodos para ayudar a la disociación de conglomerados de células 10/30 mediante agitaciones mecánicas, las cuales pueden aplicarse al canal 201/101 como en la Figura 27B en la Posición 22 y aplicarse al canal 201/101 como en la Figura 22B a 22D, Figura 23A a Figura 23D, Figura 27B a Figura 27D.

La Figura 28A muestra una vista lateral del canal 201/101 y el soporte 1082 a lo largo de la dirección 61 de la Figura 27B, donde las células 10/30 se separan magnéticamente por el campo MAG y forman un conglomerado en el lado inferior de la pared del canal 201/101. Pueden usarse soportes de canal 1073 para unir el canal 201/101 al soporte de canal 1082. Los soportes de canal 1073 pueden fijar el canal 201/101 en secciones unidas a los soportes 1073 como anclajes contra la deformación, compresión o alargamiento del canal 201/101 durante el proceso de agitación mecánica. Los soportes de canal 1073 también pueden realizar una función de válvula que cierra el flujo de fluido dentro o fuera de la sección del canal flexible 201 entre dos soportes de canal 1073 antes del proceso de agitación mecánica de la Figura 28A, de manera que el fluido encerrado en el canal 201 pueda producir más eficientemente turbulencia localizada dentro del canal 201. La Figura 28A ilustra que una fuerza aplicada externamente 300 puede estirar o deformar el canal 201/101 en una dirección alejada del soporte 1082, por ejemplo, perpendicular a la dirección longitudinal del canal 201/101. Tal deformación o estiramiento del canal 201/101 acumula energía elástica en el material de la pared del canal 201/101.

La Figura 28B ilustra que se libera la fuerza 300 de la Figura 28A, y la energía elástica acumulada en la pared del canal 201/101 actúa para hacer retroceder el canal 201/101 hacia su posición original sin deformación y sin estiramiento. En dependencia de la propiedad del material de la pared del canal 201/101, dicho retorno elástico puede proporcionar un flujo de turbulencia transitorio en varios lugares dentro del canal 201/101, lo que puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado de células 10/30 en piezas más pequeñas para ayudar a la autodisociación del conglomerado de las células 10/30. Después de liberar la fuerza 300 y el canal 201/101 retrocede, puede aplicarse el flujo alternativo 1030 de manera similar a como en la Figura 23E para ayudar al proceso de disociación del conglomerado de células 10/30, donde la función de la válvula de 1073 puede desactivarse para permitir el flujo de fluido dentro del canal 201/101.

El proceso de deformación/estiramiento y liberación del canal 201/101 de la Figura 28A y la Figura 28B puede repetirse tantas veces como sea necesario hasta que el conglomerado de células 10/30 se disocie suficientemente, el cual entonces puede eliminarse del canal 201/101 mediante fluido tampón.

La Figura 29A ilustra un método alternativo de agitación mecánica de la Figura 28A. Cada aspecto es el mismo que en la Figura 28A, excepto que puede aplicarse una fuerza de compresión 302 para comprimir el canal 201 en dirección perpendicular a la dirección de longitud del canal 201, por ejemplo, al comprimir el canal 201 contra el soporte del canal 1082 como se muestra en la Figura 29A. Como el líquido dentro del canal 201 tiene una compresibilidad limitada, la fuerza 302 puede hacer que la pared del canal 201/101 se expanda en dirección perpendicular a la vista de la Figura 29A, es decir, en dirección perpendicular tanto a la dirección de la longitud del canal como a la dirección de la fuerza 302. Tal expansión de la pared del canal 201/101 acumulará nuevamente energía elástica en el material de la pared del canal 201.

La Figura 29B es igual a la Figura 28B en todos los aspectos, excepto que la Figura 29B es después de que se libera la fuerza de compresión 302 de la Figura 29A, y la energía elástica acumulada en la pared del canal 201 actúa para devolver al canal 201 su forma original no comprimida. Tal retorno elástico puede proporcionar un fuerte flujo de turbulencia transitoria en varias ubicaciones dentro del canal 201, lo que puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado de células 10/30 en piezas más pequeñas para ayudar a la autodisociación del conglomerado de células 10/30. Después de liberar la fuerza 302 y que la forma del canal 201 regrese, puede aplicarse el flujo alternativo 1030 de manera similar que en la Figura 23E para ayudar al proceso de disociación del conglomerado de células 10/30, donde la función de válvula de 1073 puede desactivarse.

El proceso de compresión y liberación del canal 201 de la Figura 29A y la Figura 29B puede repetirse tantas veces como sea necesario hasta que el conglomerado de células 10/30 se disocie suficientemente, el cual después puede eliminarse del canal 201.

La Figura 30A ilustra otro método alternativo de agitación mecánica. Cada aspecto es igual que en la Figura 28A, excepto que puede aplicarse una fuerza de torsión rotacional 303 o 304 al canal 201 para girar el canal 201 a lo largo de la dirección longitudinal del canal, como se muestra en la Figura 30A. En una modalidad, solo se aplica una de las fuerzas de rotación 303 o 304 a un extremo del canal 201. En otra modalidad, tanto la fuerza de rotación 303 como la fuerza 304 se aplican a extremos diferentes del canal 201 en direcciones de rotación opuestas para provocar que el canal 201 se gire a lo largo de la dirección longitudinal del canal. Tal deformación por torsión del canal 201 acumulará nuevamente energía elástica en el material de la pared del canal 201.

La Figura 30B es igual a la Figura 28B en todos los aspectos, excepto que la Figura 30B es después de que se liberan la fuerza rotacional 303 y la fuerza 304 de la Figura 30A, y la energía elástica acumulada en la pared del canal 201 actúa para que el canal 201 retorne hacia su forma original no torcida. Tal retorno elástico puede proporcionar un fuerte flujo de turbulencia transitoria en varias ubicaciones dentro del canal 201, lo que puede ayudar a romper mecánicamente el conglomerado de células 10/30 en piezas más pequeñas para ayudar a la autodisociación del conglomerado de células 10/30. Después de la liberación de las fuerzas 303 y 304, y de que la forma del canal 201 regrese, puede aplicarse el flujo alterno 1030 de manera similar que en la Figura 23E para ayudar al proceso de disociación del conglomerado de células 10/30, donde la función de válvula de 1073 puede desactivarse.

El proceso de torsión y liberación del canal 201 de la Figura 30A y la Figura 30B puede repetirse tantas veces como sea necesario hasta que el conglomerado de células 10/30 se disocie suficientemente, el cual después puede eliminarse del canal 201 mediante fluido tampón.

Las fuerzas mecánicas 300, 302, 303 y 304 pueden aplicarse mediante estructuras mecánicas que están motorizadas y son capaces de aplicar dichas fuerzas repetidamente al canal 201, los ejemplos pueden incluir una aleta para proporcionar fuerza 300, un compresor para proporcionar fuerza 302, y torcedores para proporcionar fuerzas 303 y 304.

La Figura 31 es un diagrama esquemático que ilustra un método para usar MAG para separar entidades biológicas conjugadas con etiquetas magnéticas, por ejemplo, células 10/30, de una solución de fluido. El canal MAG de la Figura 31 puede ser cualquiera de los canales 101, 201, 301, 320 o 330 descritos en cualquiera de las figuras de esta especificación, y el MAG de la Figura 31 puede ser cualquiera de los MAG 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 o 129 descritos con el canal correspondiente en cualquiera de dichas figuras. El método de la Figura 31 puede incluir las siguientes etapas en secuencia. En la etapa 400, el canal MAG se coloca con su pared exterior en contacto con la superficie de la cuña MAG o los extremos de la punta del polo, es decir, la posición de separación de la Posición 1 o la Posición 21 como en la Figura 12, Figura 14, Figura 22A, Figura 27A. En la etapa 401, la muestra de fluido fluye a través del canal MAG en posición de separación. Luego, en la etapa 402, entidades positivas con etiquetas magnéticas SPL 2 unidas, por ejemplo, células 10/30, y etiquetas magnéticas libres SPL 2 dentro de la muestra de fluido se atraen por el campo magnético de MAG y se aglomeran en la pared del canal MAG contra la cuña MAG o los extremos de la punta del polo MAG. Mientras tanto, en la etapa 4020, las entidades negativas sin etiquetas magnéticas SPL 2 unidas pasan a través del canal MAG sin atraerse. Las entidades negativas pueden entonces procesarse directamente en procedimientos posteriores como se muestra en la trayectoria 427, donde los procedimientos posteriores pueden incluir el análisis de entidades 407, o las entidades negativas pueden pasarse para continuar con el proceso 408. Después de la etapa 402, en la etapa 403, la muestra puede agotarse en la entrada del canal MAG y puede completarse la separación magnética de entidades positivas. En la etapa 404, que es una etapa opcional, el fluido tampón puede fluir a través del canal MAG con el canal MAG todavía en la posición de separación para eliminar cualquier entidad negativa sin etiquetas magnéticas SPL 2 pero que puede haber residido con el conglomerado de entidades positivas debido a uniones no específicas. Luego, en la etapa 405, el canal MAG puede alejarse de MAG a la posición de disociación que incluye la Posición 2 y la Posición 22 en la Figura 22B, Figura 27B, y la disociación magnética 451, como se muestra en la Figura 22A a la Figura 22D, o disociación mecánica 452

- como se muestra en la Figura 27C a la Figura 30B, o puede aplicarse la disociación magnética junto con la mecánica 453 a las entidades positivas en el canal MAG. En la etapa 406, el fluido tampón puede fluir a través del canal MAG para eliminar entidades positivas disociadas. Si las entidades positivas no se disocian completamente, 465 muestra que puede aplicarse el proceso de disociación repetido 405 a las entidades
- 5 positivas restantes en el canal MAG después de la etapa de eliminación previa, hasta que las entidades positivas se disocien suficientemente y se eliminen del canal MAG. En el caso de que la muestra de fluido tenga un gran volumen, la muestra de fluido puede separarse en múltiples subvolúmenes, donde después del proceso de un subvolumen desde la etapa 400 a la etapa 406, puede introducirse un siguiente subvolumen en el canal MAG comenzando desde la etapa 400 para continuar el proceso como se muestra en 461 hasta
- 10 completar la muestra de fluido del gran volumen. Después de que las entidades positivas se recopilen después de la etapa 406, pueden procesarse en procedimientos posteriores como se muestra en la trayectoria 428, donde los procedimientos posteriores pueden incluir el análisis de entidades 407 o el proceso continuado 408.
- 15 Si bien la presente invención se ha mostrado y descrito con referencia a ciertas modalidades, debe entenderse que el alcance de la invención debe determinarse por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes legales, en lugar de por los ejemplos dados.

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo (124, 125, 126, 127) para separar entidades biológicas que comprende:
 5 un polo central magnético blando (111) que tiene un extremo inferior (1112) y un extremo de punta cónica (1111);
 primer y segundo polos laterales magnéticos blandos (112, 113) dispuestos en lados opuestos del polo central magnético blando (111) y que tienen respectivamente un primer y segundo extremos inferiores (1122, 1132), el primer y segundo polos laterales magnéticos blandos (112, 113) que tienen respectivamente un primer y segundo extremos superiores (1121, 1131) que se doblan hacia el polo central magnético blando (111) y se colocan sobre el extremo de punta cónica (1111);
 10 un canal (201,301) para recibir un fluido de muestra que contiene las entidades biológicas para la separación, el canal (201,301) se dispone en un espacio formado entre el extremo de punta cónica (1111), el primer extremo superior (1121) y el segundo extremo superior (1131); y
 una o más fuentes magnéticas (109, 115, 116, 1092, 1094), en donde:
 15 una primera fuente magnética (109, 115, 116) de la una o más fuentes magnéticas (109, 115, 116, 1092, 1094) se conecta al extremo inferior (1112) del polo central magnético blando (111)
 el extremo inferior (1122) del primer polo lateral magnético blando (112) se conecta a una fuente magnética (109, 115, 116, 1092, 1094) de la una o más fuentes magnéticas (109, 115, 116, 1092, 1094);
 20 el extremo inferior (1132) del segundo polo lateral magnético blando (113) se conecta a una fuente magnética (109, 115, 116, 1092, 1094) de la una o más fuentes magnéticas (109, 115, 116, 1092, 1094); y
 de esta manera se genera un flujo magnético (1048, 1049) en el polo central magnético blando (111) y en el primer y segundo polos laterales magnéticos blandos (112, 113).
 25
2. El dispositivo (124, 125, 126, 127) de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el flujo magnético (1048) en el polo central magnético blando (111) está opuesto al flujo magnético (1049) en el primer polo lateral magnético blando (112) y el segundo polo lateral magnético blando (113).
- 30 3. El dispositivo (124, 126) de cualquier reivindicación anterior, en donde la primera fuente magnética (109) es un imán permanente central (109) con un primer polo unido al polo central magnético blando (111), y el dispositivo (124) comprende además un protector magnético blando (114) que conecta el primer y segundo extremos inferiores (1122, 1132) del primer y segundo polos laterales magnéticos blandos (112, 113) al imán permanente central (109).
 35
4. El dispositivo (126) de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la una o más fuentes magnéticas (109, 1092, 1094) comprenden además un primer imán permanente (1092) dispuesto entre el primer extremo inferior (1122) del primer polo lateral magnético blando (112) y el protector magnético blando (114); y un segundo imán permanente (1094) dispuesto entre el segundo extremo inferior (1132) del segundo polo lateral magnético blando (113) y el protector magnético blando (114), en donde una dirección de magnetización (1091) del imán permanente central (109) es opuesta a una dirección de magnetización (1093, 1095) del primer y segundo imanes permanentes (1092, 1094).
 40
5. El dispositivo (127) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la una o más fuentes magnéticas (109, 1092, 1094) comprenden un primer imán permanente (1092) dispuesto debajo del primer extremo inferior (1122) del primer polo lateral magnético blando (112), y un segundo imán permanente (1094) dispuesto debajo del segundo extremo inferior (1132) del segundo polo lateral magnético blando (113), y la primera fuente magnética (109) es un imán permanente central (109) dispuesto debajo del extremo inferior (1112) del polo central magnético blando (111), en donde una dirección de magnetización (1091) del imán permanente central (109) es opuesta a una dirección de magnetización (1093, 1095) del primer y segundo imanes permanentes (1092, 1094).
 45
 50
6. El dispositivo (125) de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde la una o más fuentes magnéticas (115, 116) comprenden un primer imán permanente (115) dispuesto entre el primer polo lateral magnético blando (112) y el polo central magnético blando (111) y un segundo imán permanente (116) dispuesto entre el segundo polo lateral magnético blando (113) y el polo central magnético blando (111), en donde el primer y segundo imanes permanentes (115, 116) tienen direcciones de magnetización opuestas (1151, 1161).
 55
7. El dispositivo (124, 125, 126, 127) de cualquier reivindicación anterior, en donde el canal (201, 301) está en contacto con el extremo de punta cónica (1111) y el primer y segundo extremos superiores (1121, 1131).
 60
8. El dispositivo (124, 125, 126, 127) de cualquier reivindicación anterior, en donde el canal (201) comprende un tubo flexible.
 65

9. El dispositivo (124, 125, 126, 127) de cualquier reivindicación anterior, que comprende además un soporte de canal no magnético (110) que se puede unir al canal (201, 301) opuesto al extremo de punta cónica (1111) del polo central magnético blando (111).
- 5 10. El dispositivo (124, 125, 126, 127) de acuerdo con la reivindicación 9, en donde una sección transversal del canal (201) es flexible y el canal (201) es comprimible entre el soporte de canal (110), el extremo de punta cónica (1111), y el primer y segundo extremos superiores (1121, 1131).
- 10 11. El dispositivo (124, 125, 126, 127) de cualquier reivindicación anterior, en donde el polo central magnético blando (111) y el primer y segundo polos laterales magnéticos blandos (112, 113) se extienden a lo largo de una dirección perpendicular a una sección transversal del canal (201,301).
- 15 12. Un método para separar entidades biológicas que comprende las etapas de:
hacer fluir una muestra de fluido que contiene entidades biológicas unidas con etiquetas magnéticas a través del canal (201,301) del dispositivo (124, 125, 126, 127) para separar entidades biológicas de acuerdo con cualquier reivindicación anterior para formar un conglomerado magnético en una pared interior del canal (201,301) correspondiente al extremo de punta cónica (1111), el primer extremo superior (1121) y el segundo extremo superior (1131);
20 separar el canal (201,301) del dispositivo (124, 125, 126, 127) para separar entidades biológicas; y aplicar un medio de excitación mecánica al canal (201, 301) para disociar el conglomerado magnético.
- 25 13. El método de la reivindicación 12, en donde los medios de excitación mecánica incluyen vibración mecánica producida por un motor (130).
- 30 14. El método de la reivindicación 12, en donde los medios de excitación mecánica incluyen vibración ultrasónica producida por un transductor piezoeléctrico (131).
- 35 15. El método de la reivindicación 12, en donde los medios de excitación mecánica incluyen estirar, torcer o comprimir el canal (201) mediante un dispositivo mecánico.
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

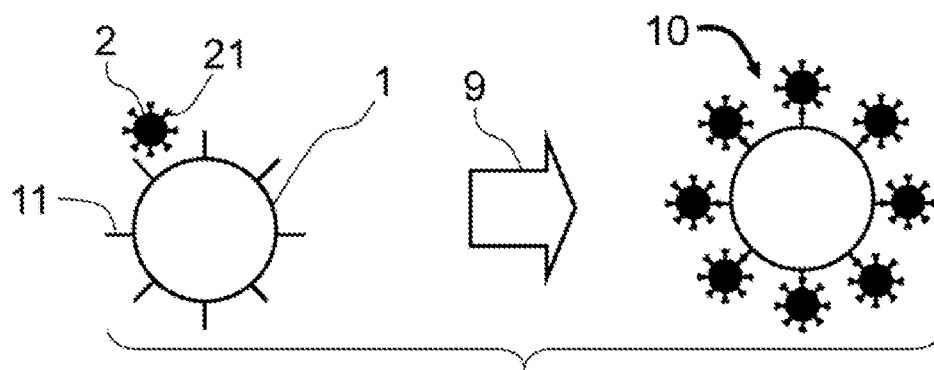


Figura 1A

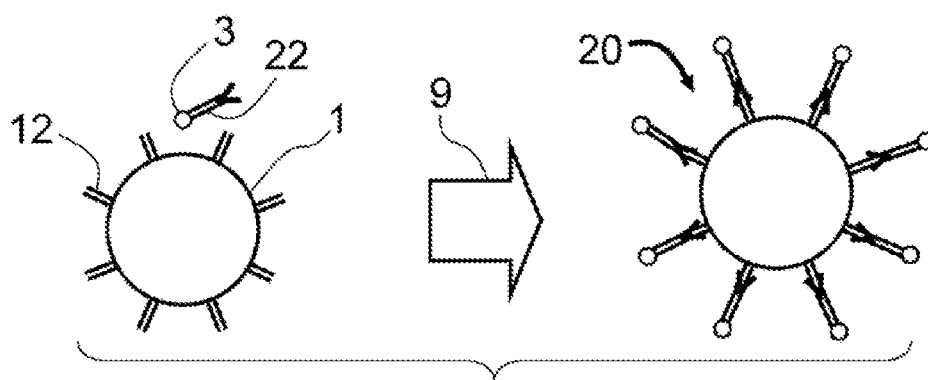


Figura 1B

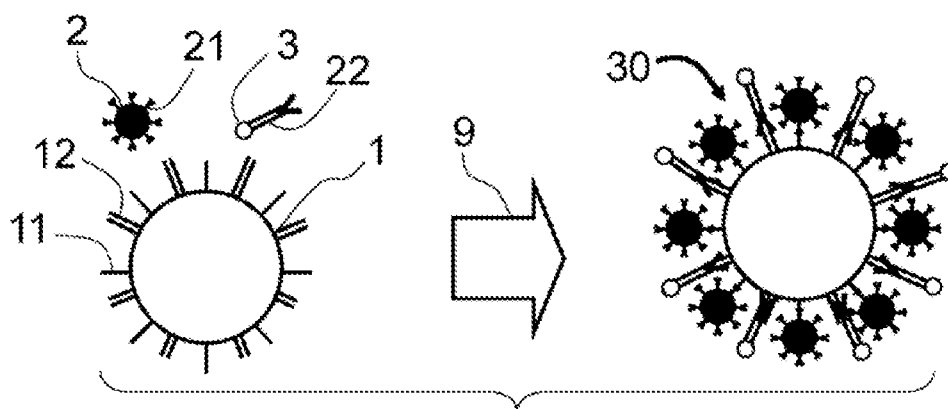


Figura 1C

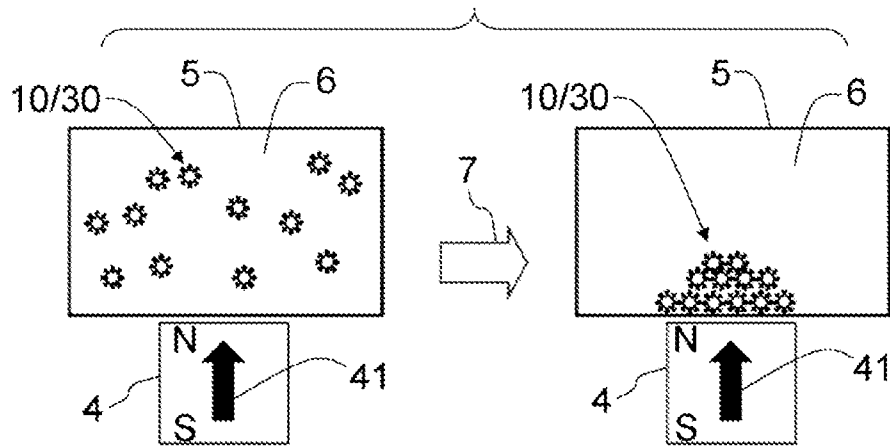


Figura 2A

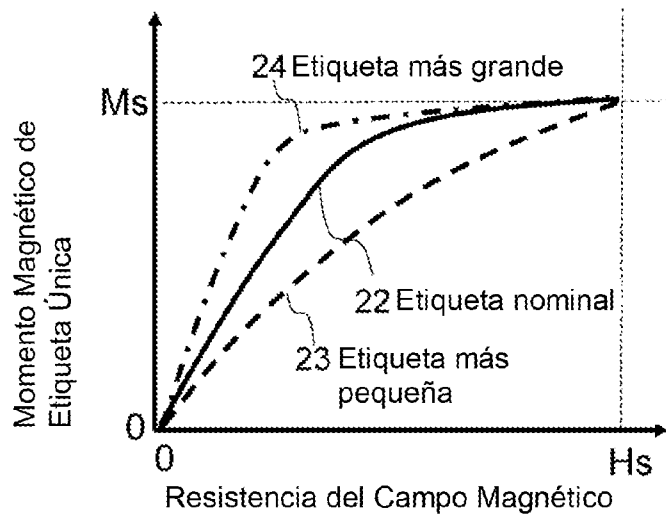


Figura 2B

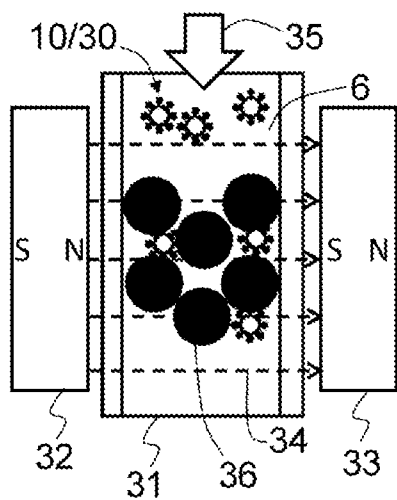


Figura 3A (Técnica Anterior)

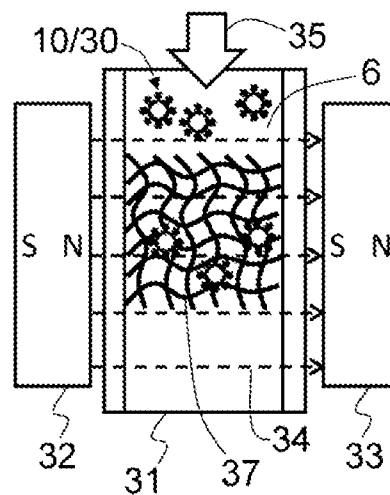


Figura 3B (Técnica Anterior)

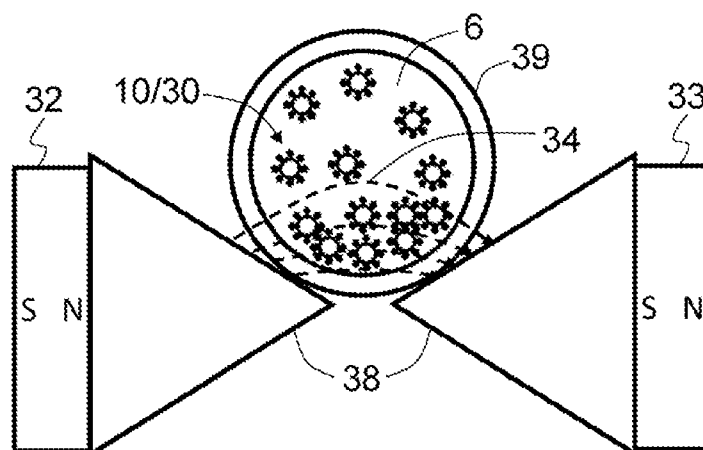


Figura 3C (Técnica Anterior)

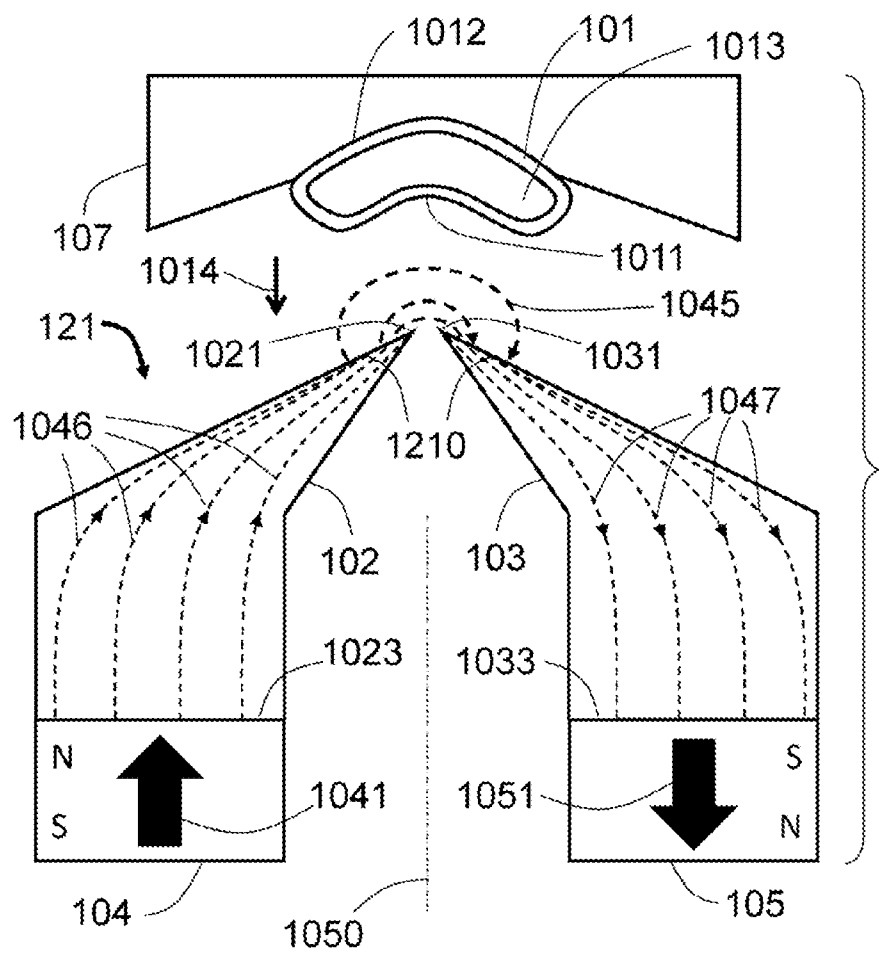


Figura 4

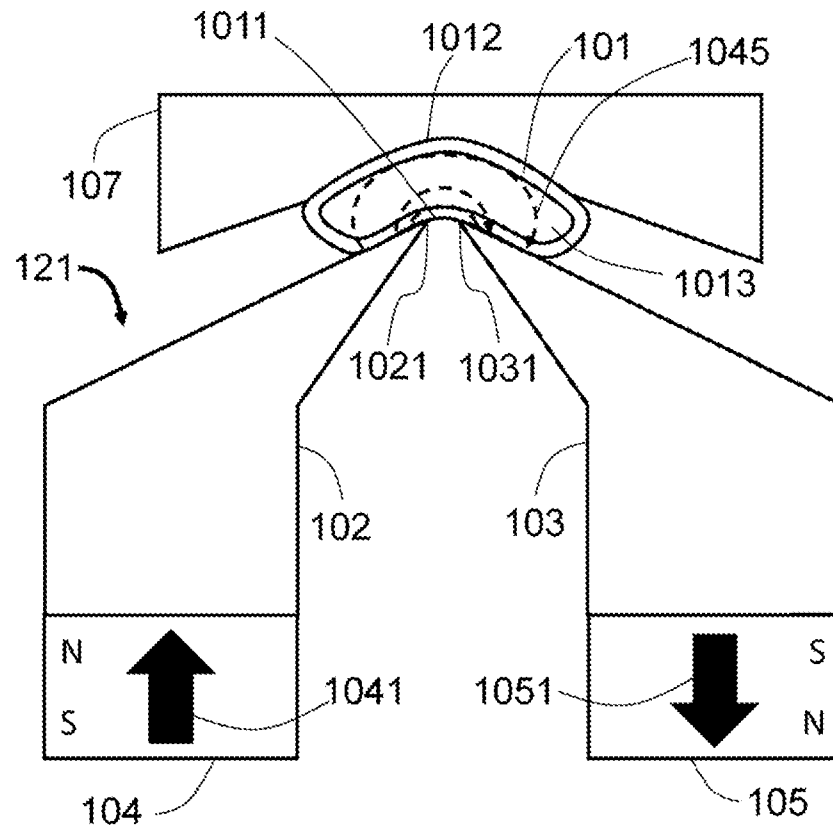


Figura 5

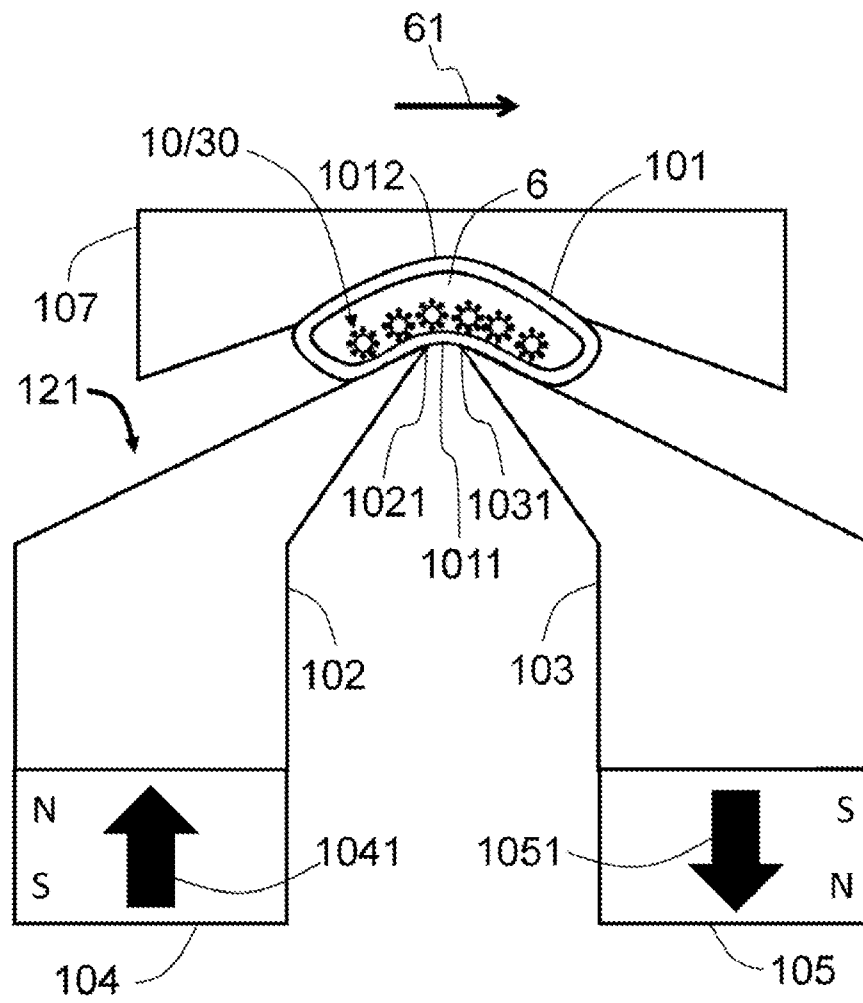


Figura 6

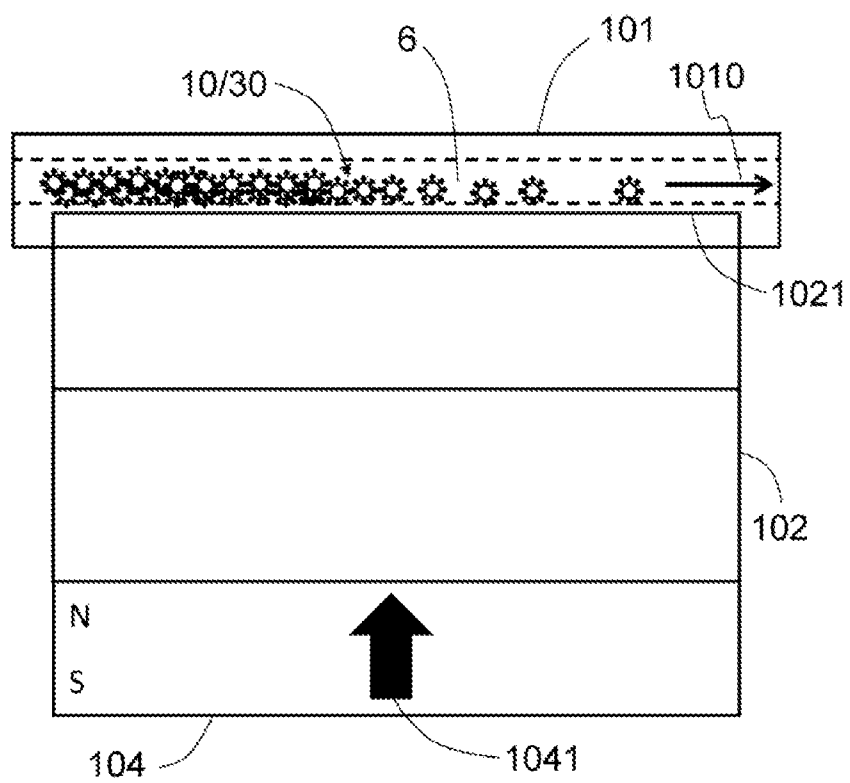


Figura 7

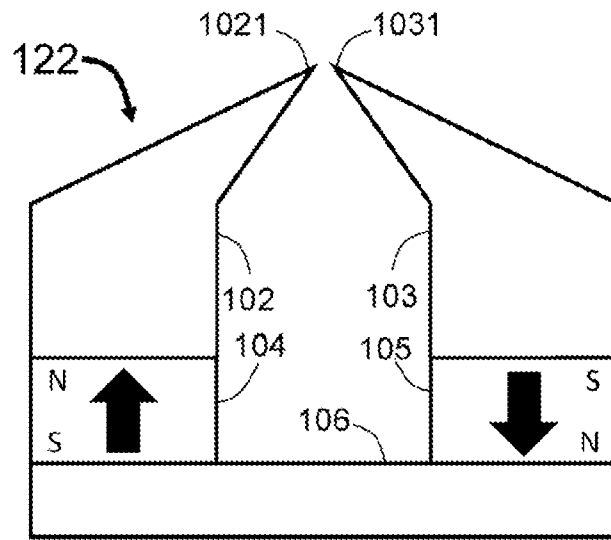


Figura 8A

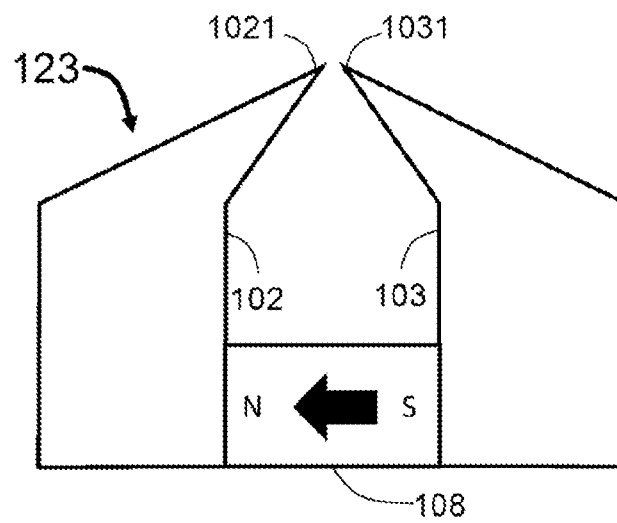


Figura 8B

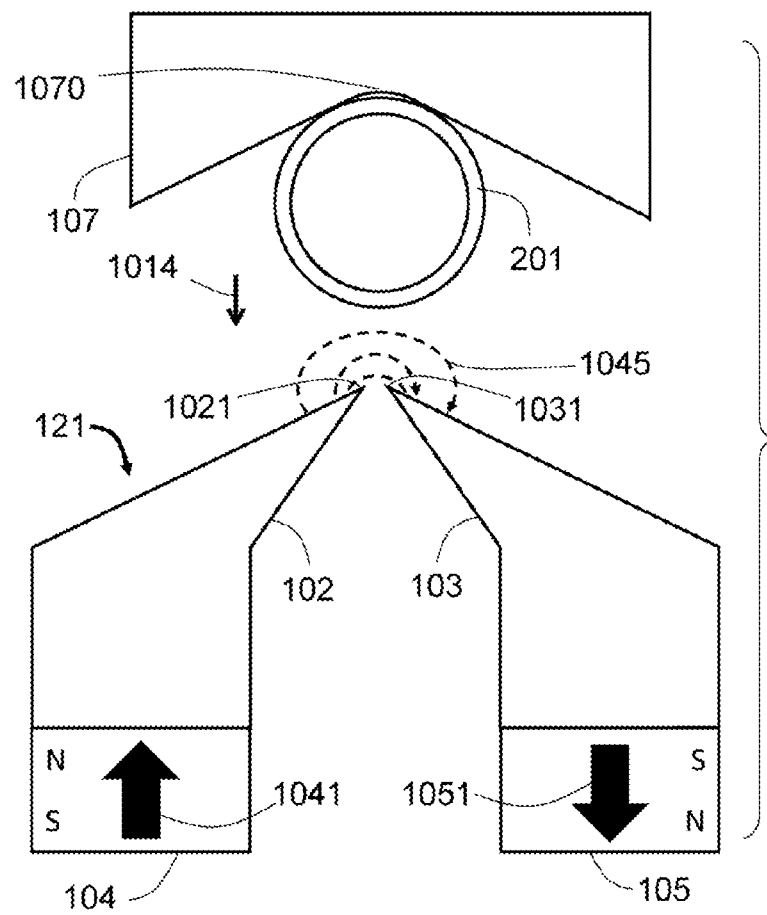


Figura 9

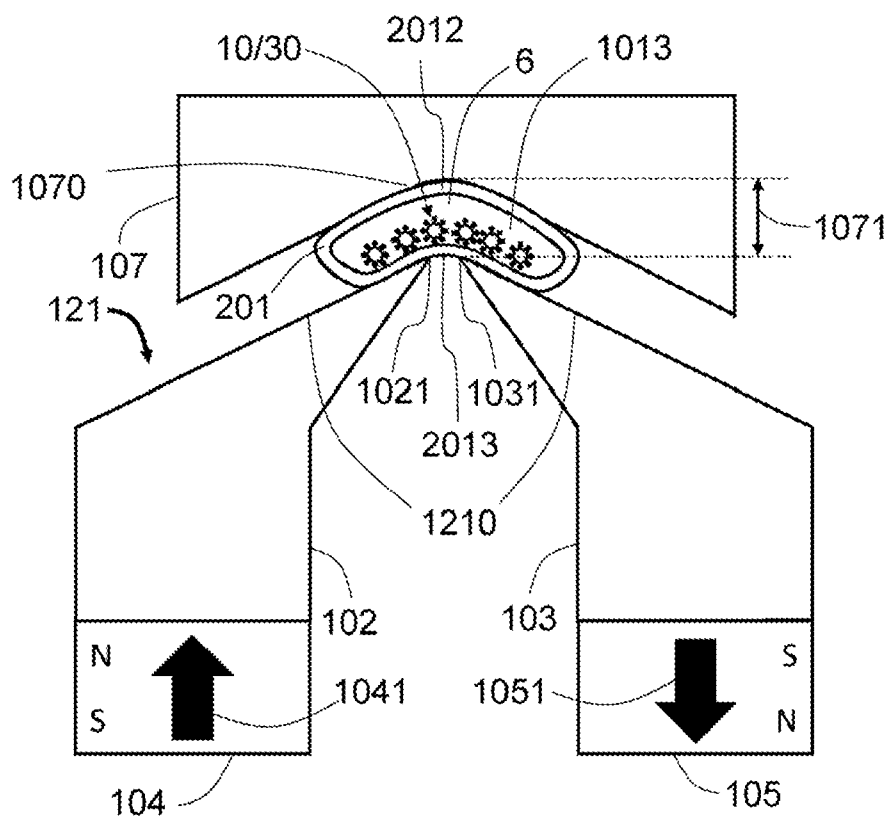


Figura 10

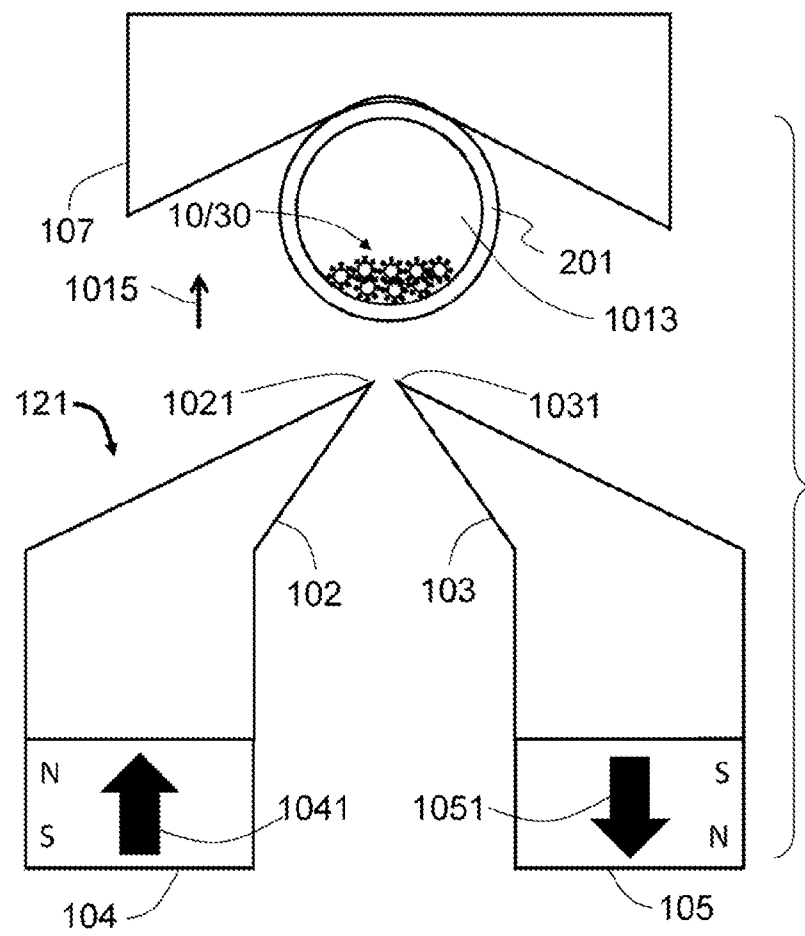


Figura 11

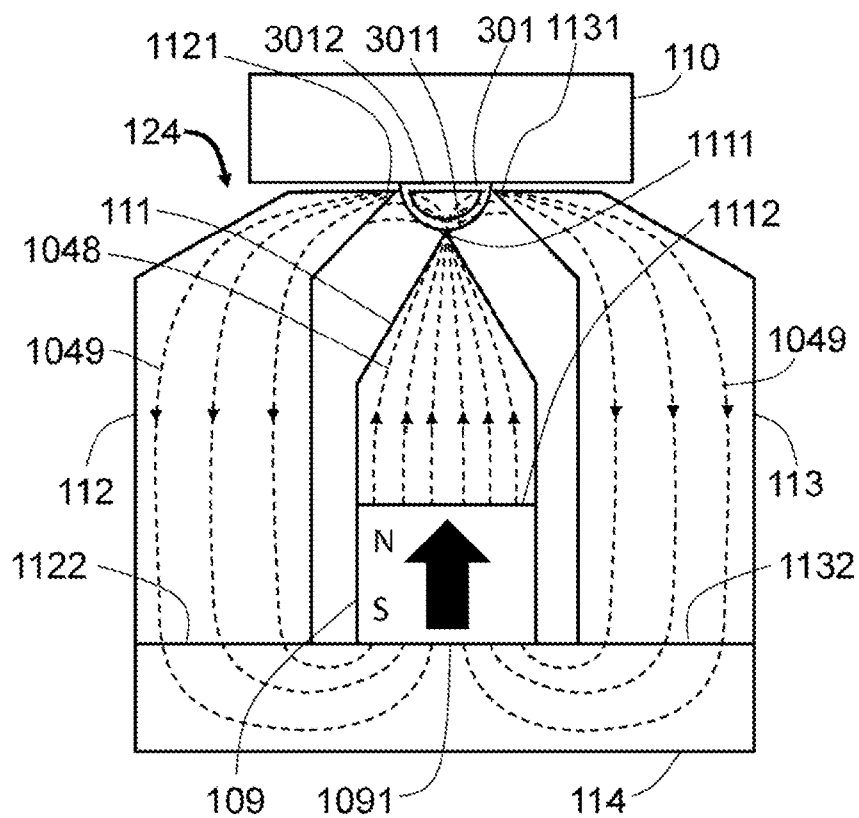


Figura 12

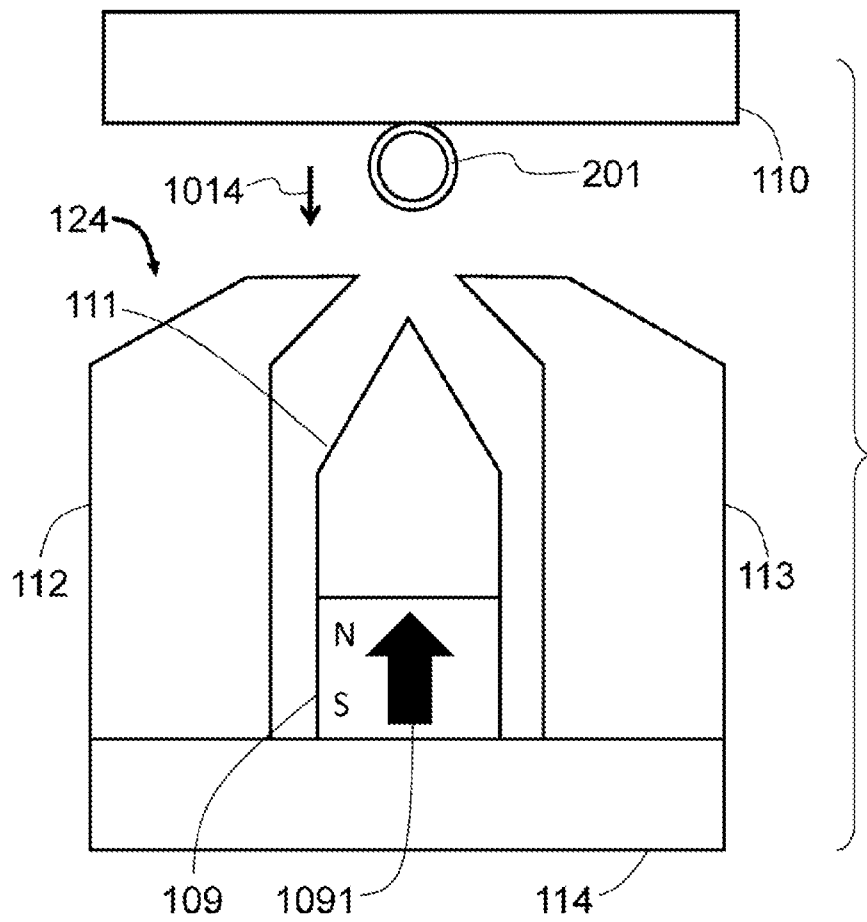


Figura 13

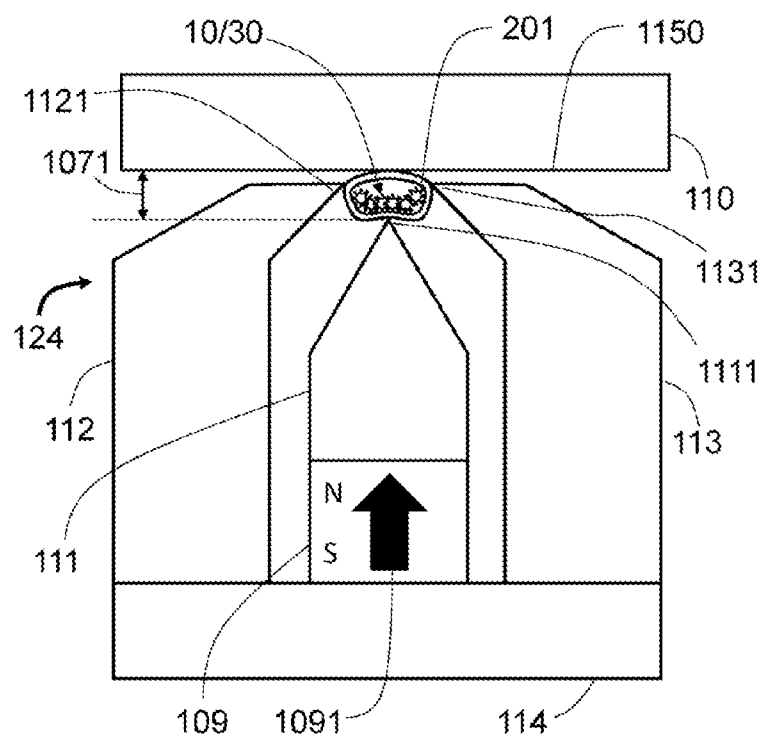


Figura 14

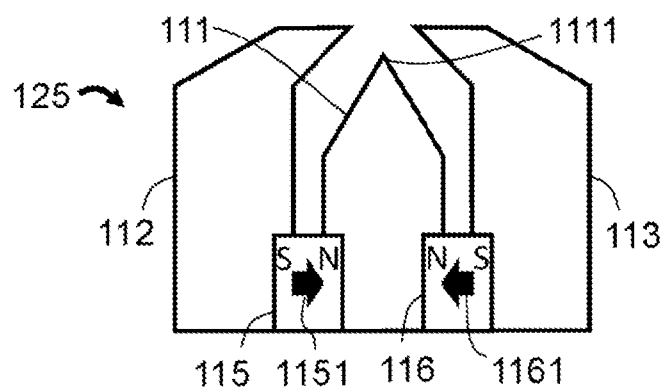


Figura 15A

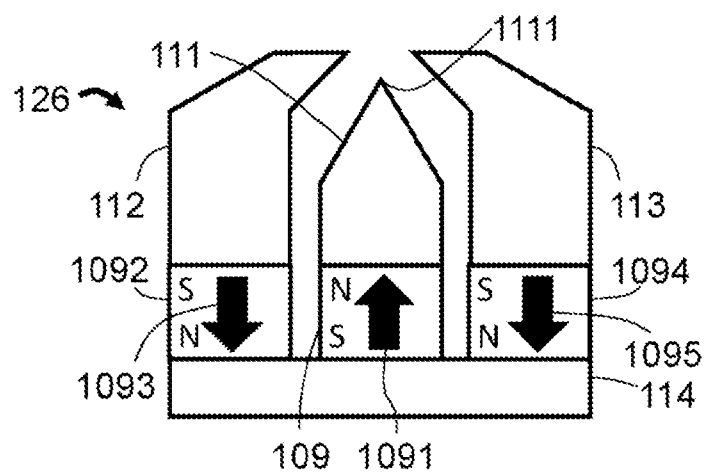


Figura 15B

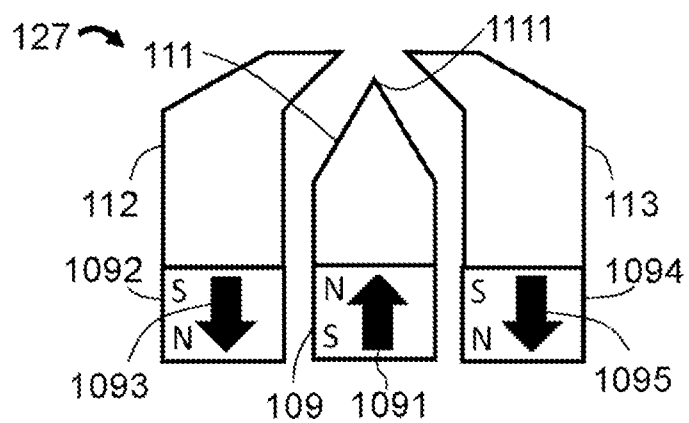


Figura 15C

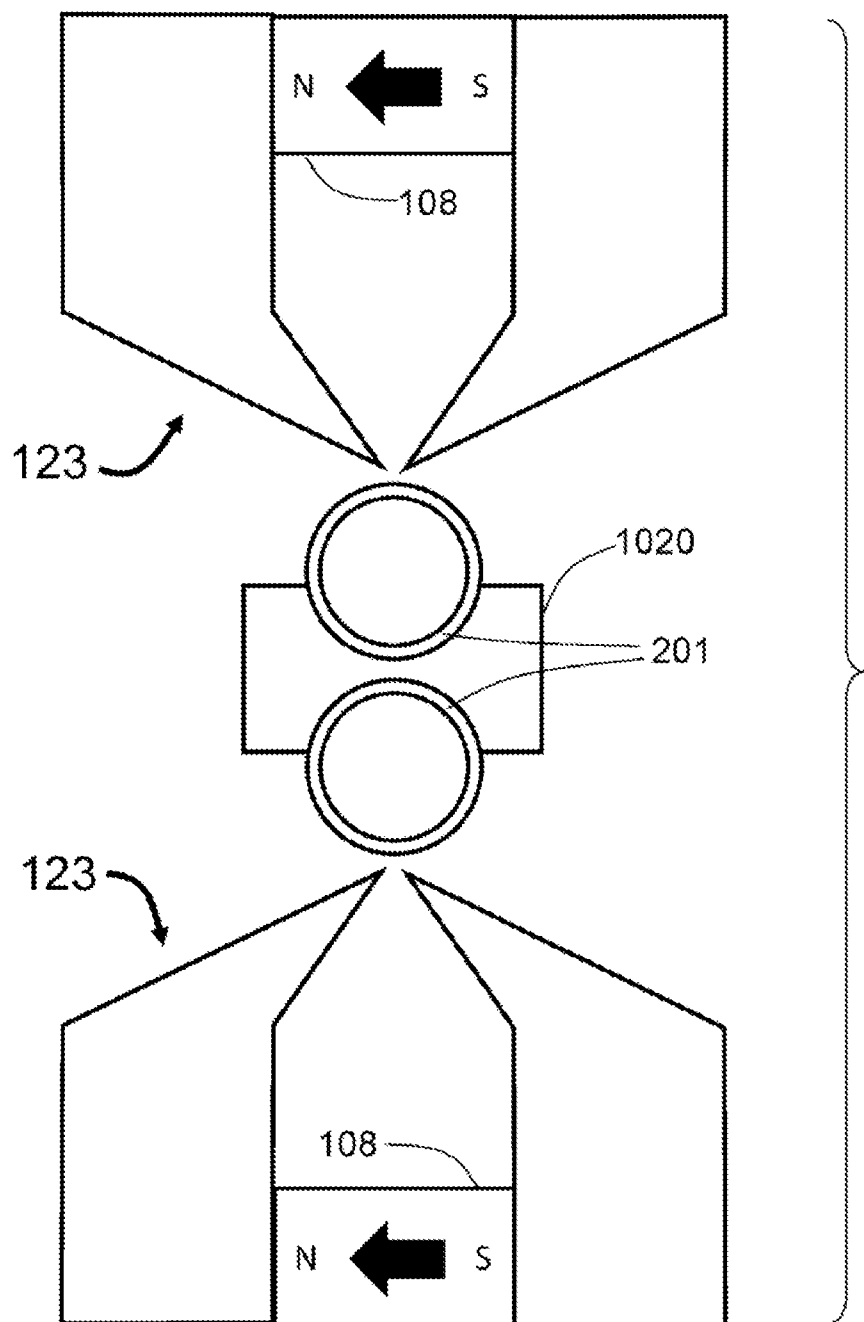


Figura 16

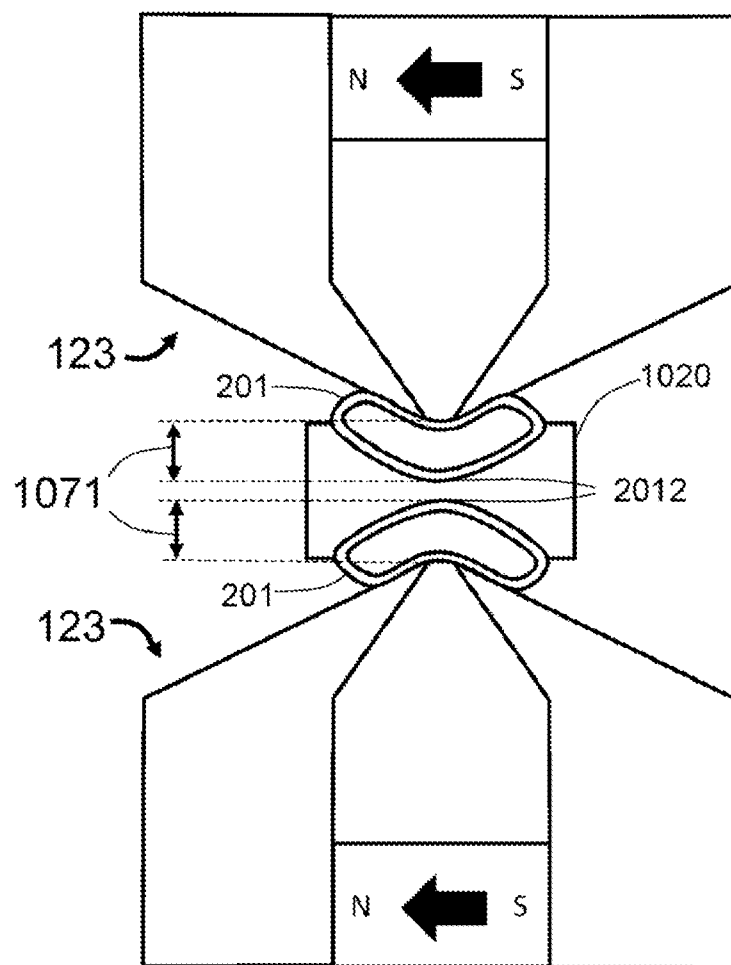


Figura 17

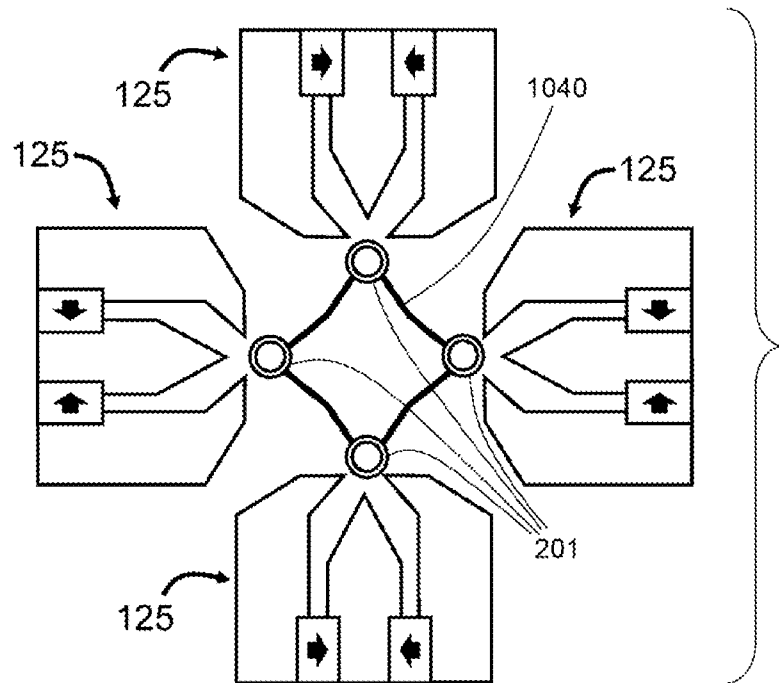


Figura 18

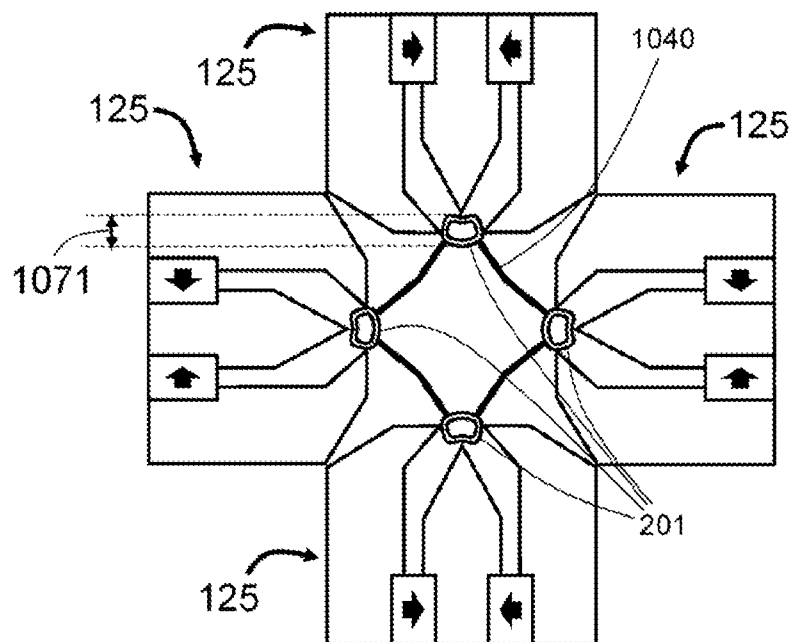


Figura 19

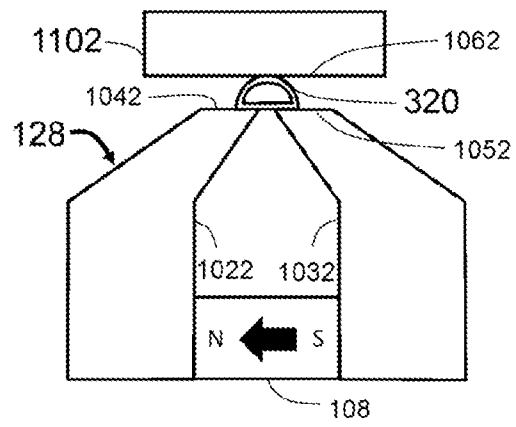


Figura 20A

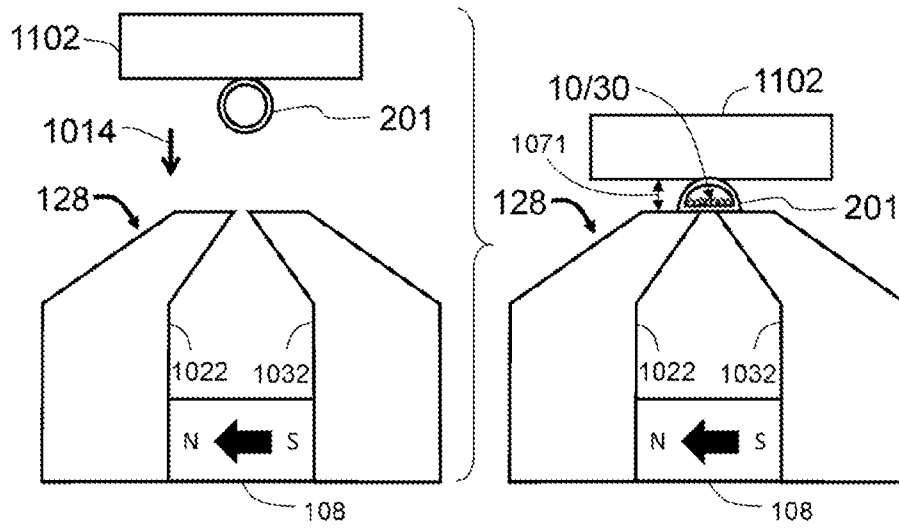


Figura 20B

Figura 20C

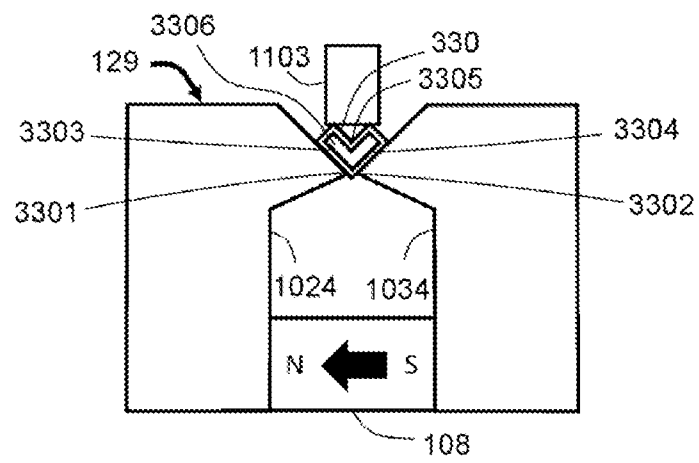


Figura 21A

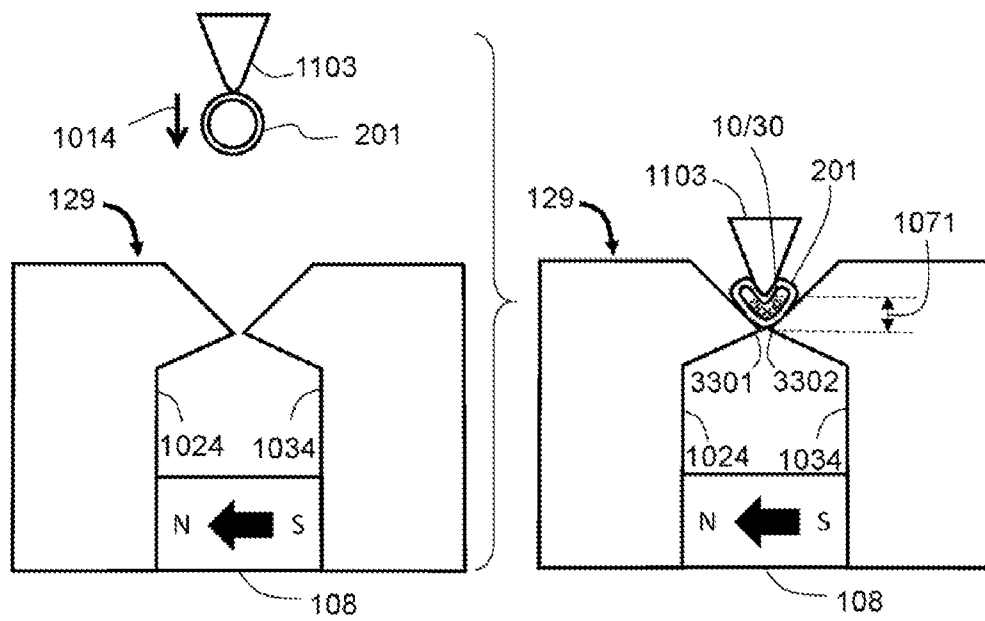


Figura 21B

Figura 21C

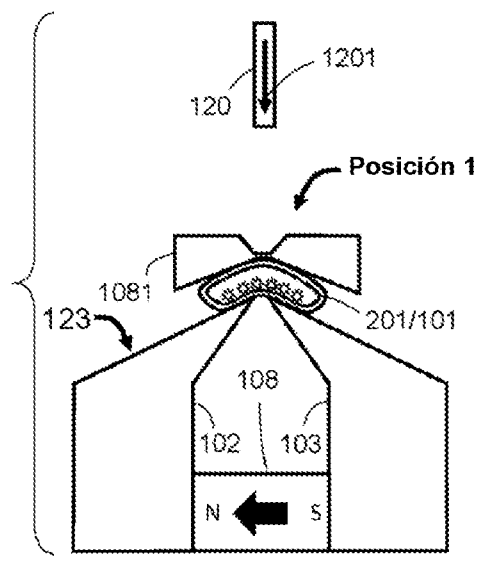


Figura 22A

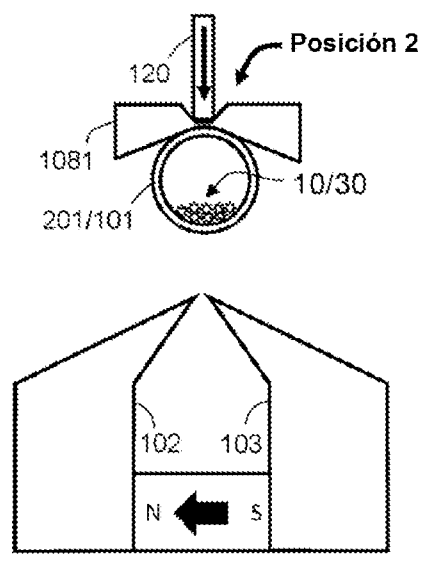


Figura 22B

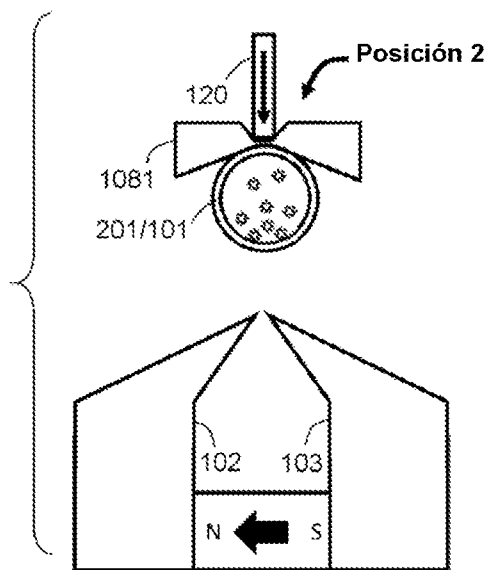


Figura 22C

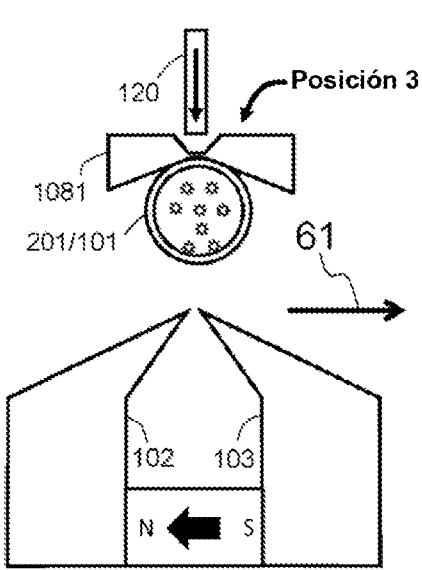


Figura 22D

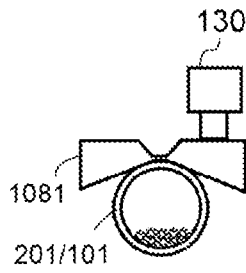


Figura 23A

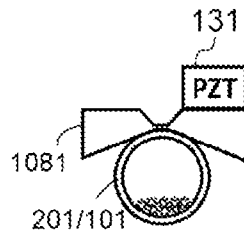


Figura 23B

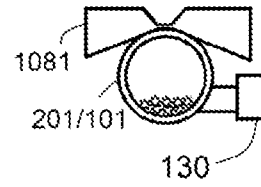


Figura 23C

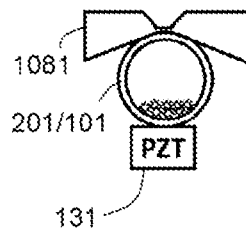


Figura 23D

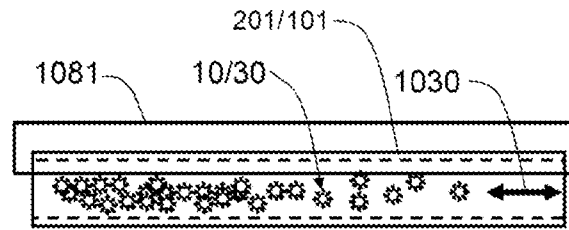


Figura 23E

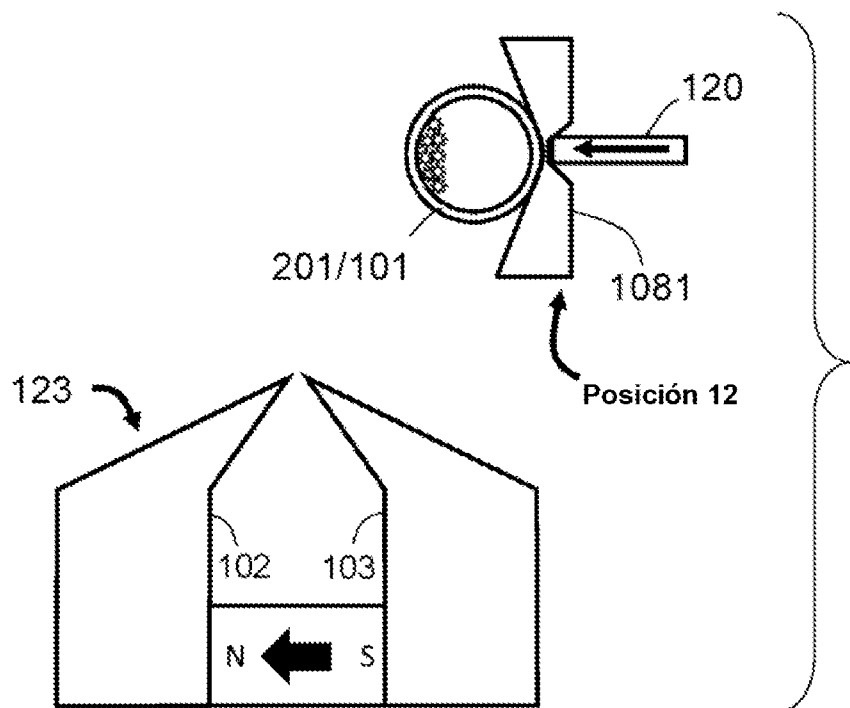


Figura 24A

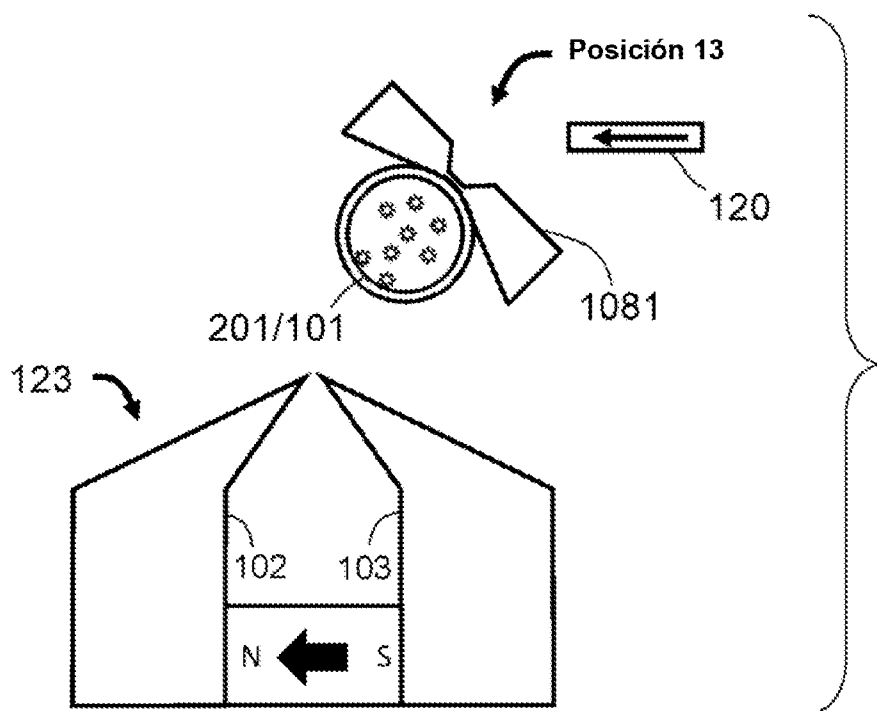


Figura 24B

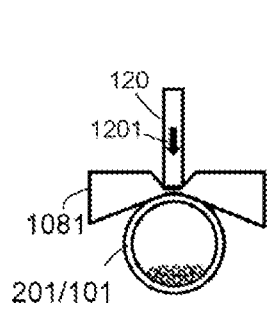


Figura 25A

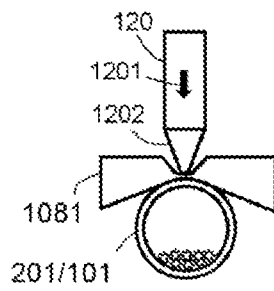


Figura 25B

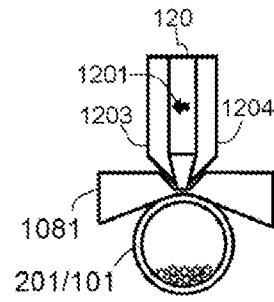


Figura 25C

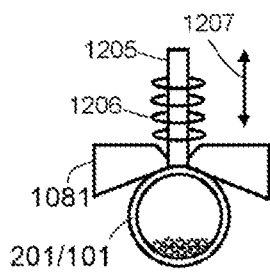


Figura 25D

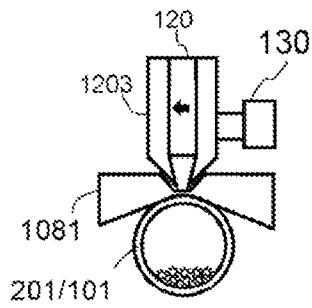


Figura 25E

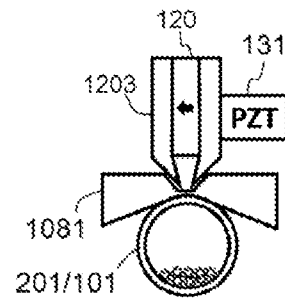


Figura 25F

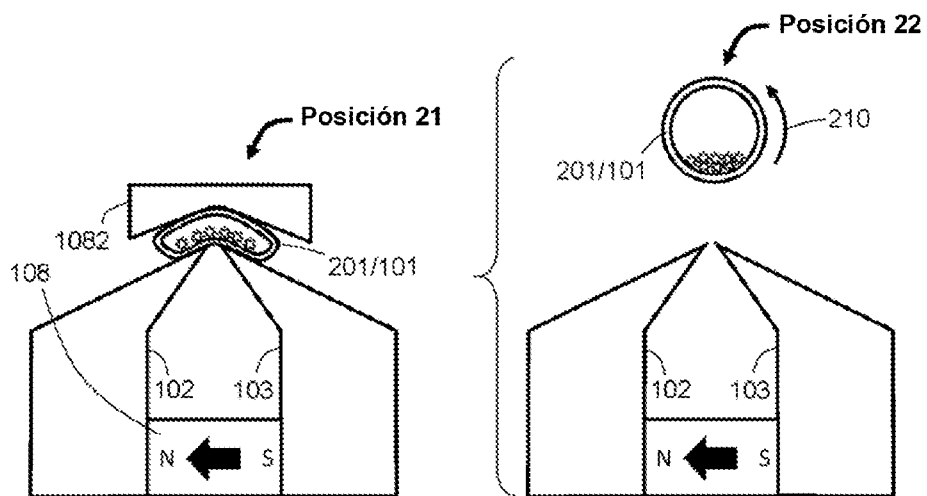


Figura 26A

Figura 26B

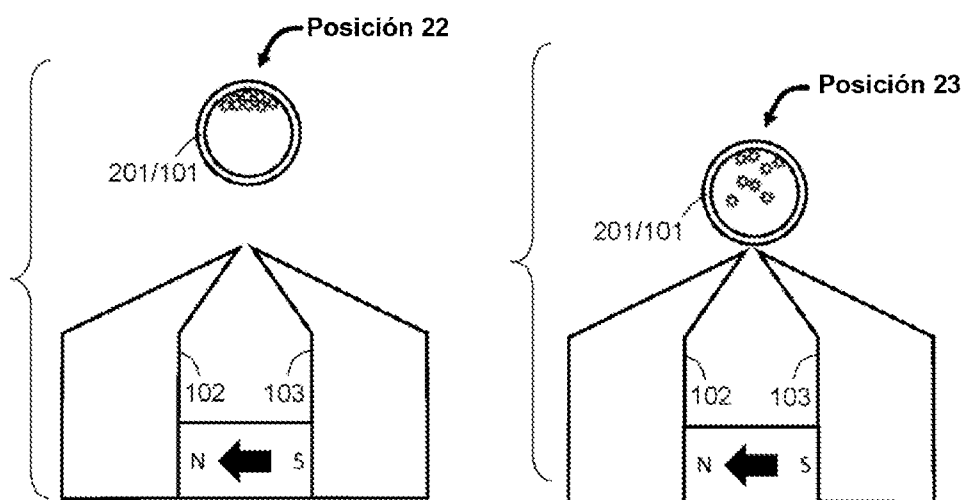


Figura 26C

Figura 26D

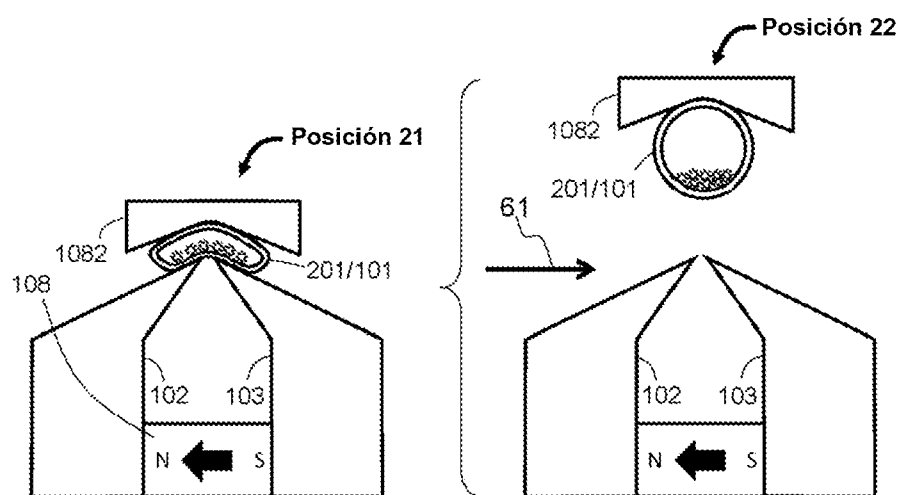


Figura 27A

Figura 27B

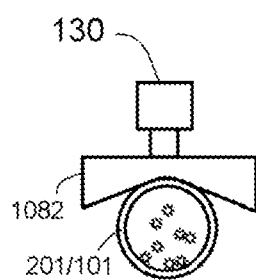


Figura 27C

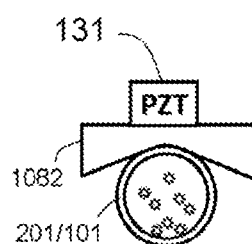


Figura 27D

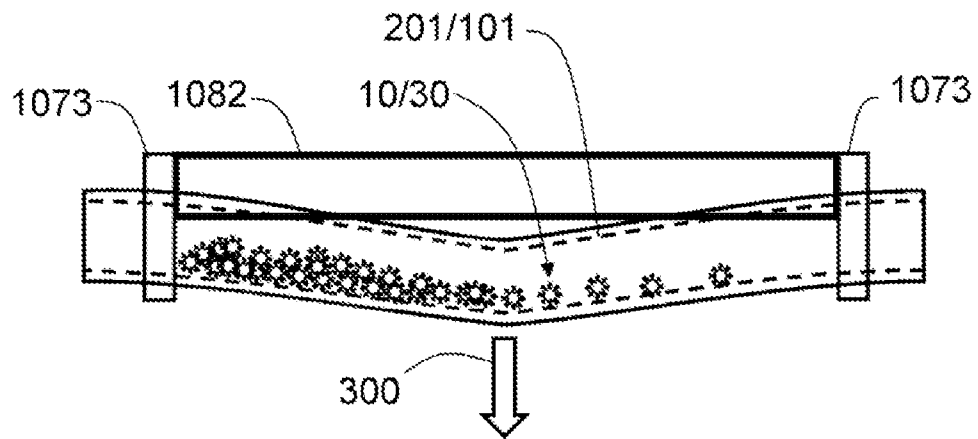


Figura 28A

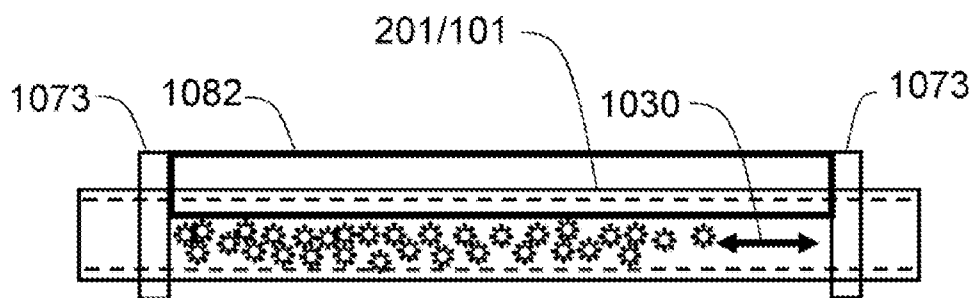


Figura 28B

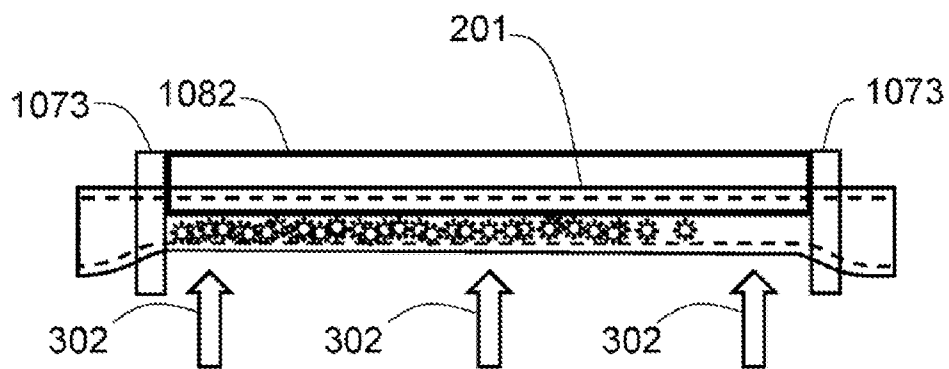


Figura 29A

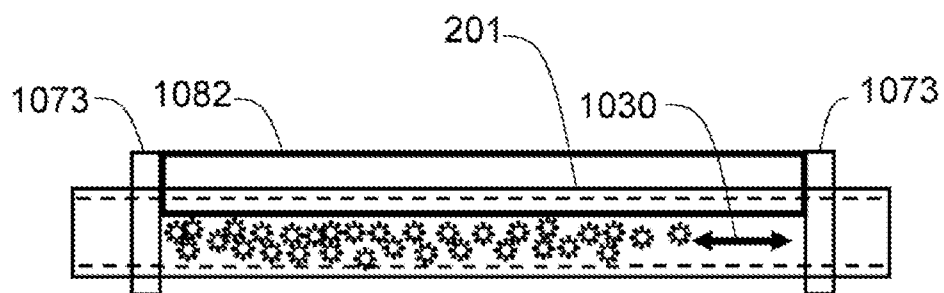


Figura 29B

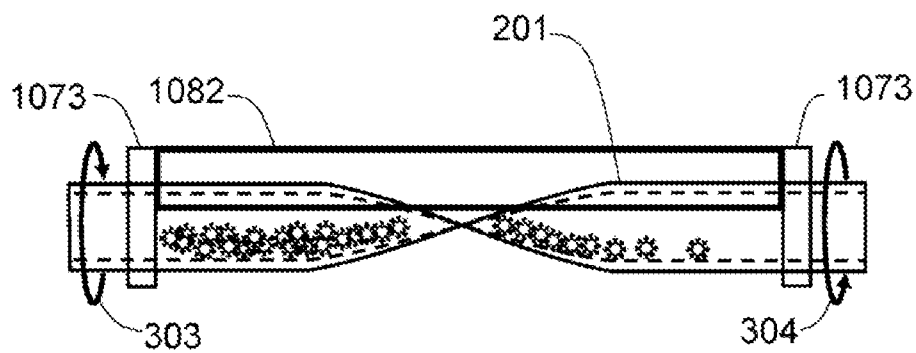


Figura 30A

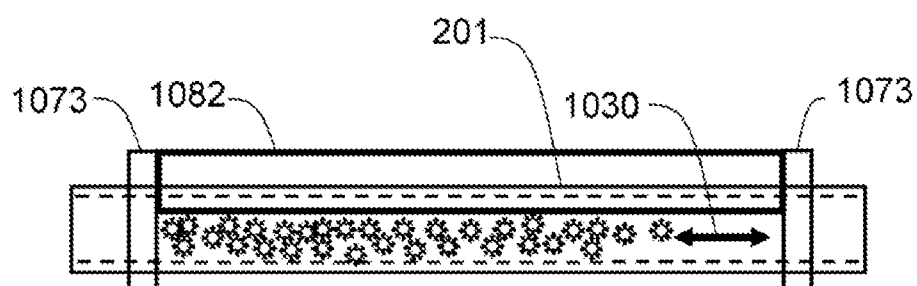


Figura 30B

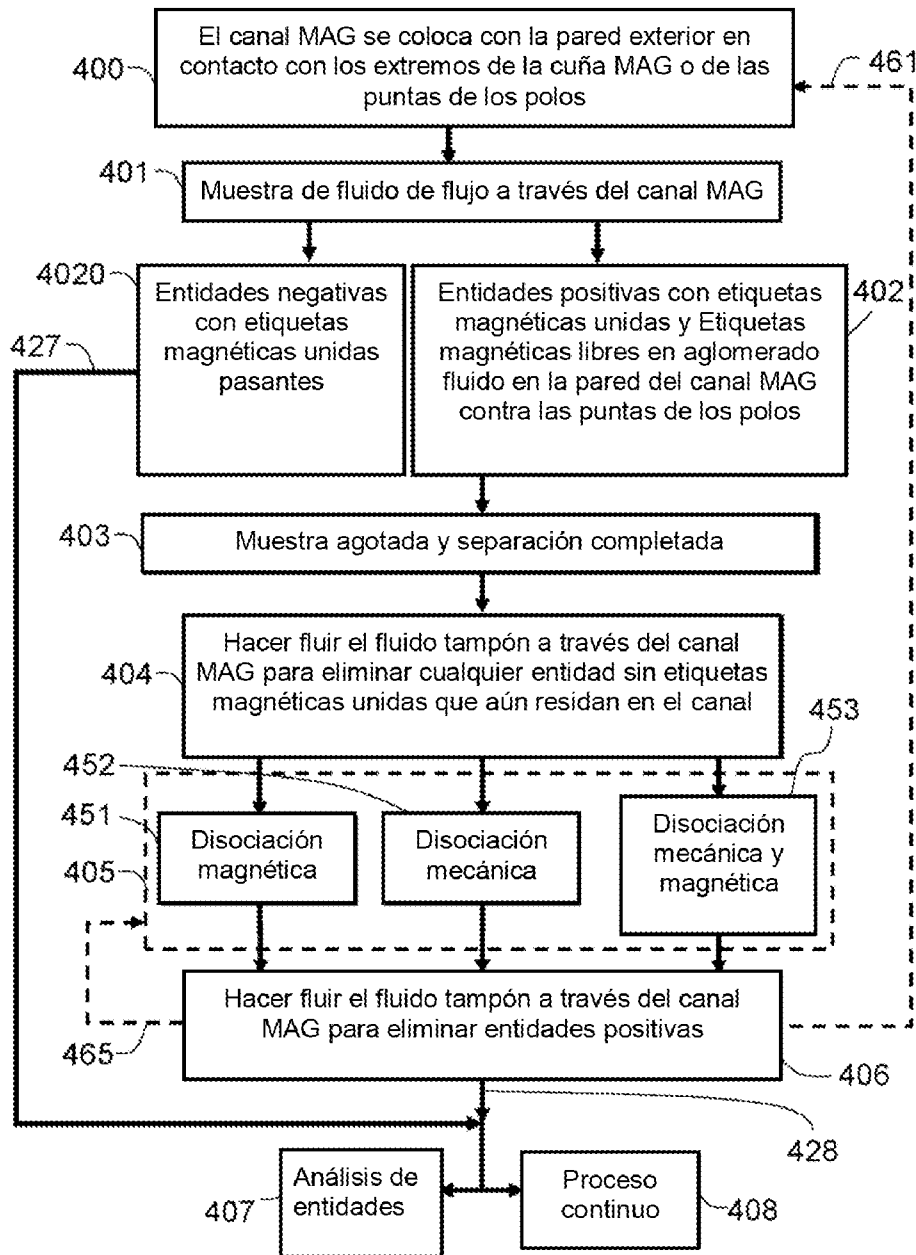


Figura 31

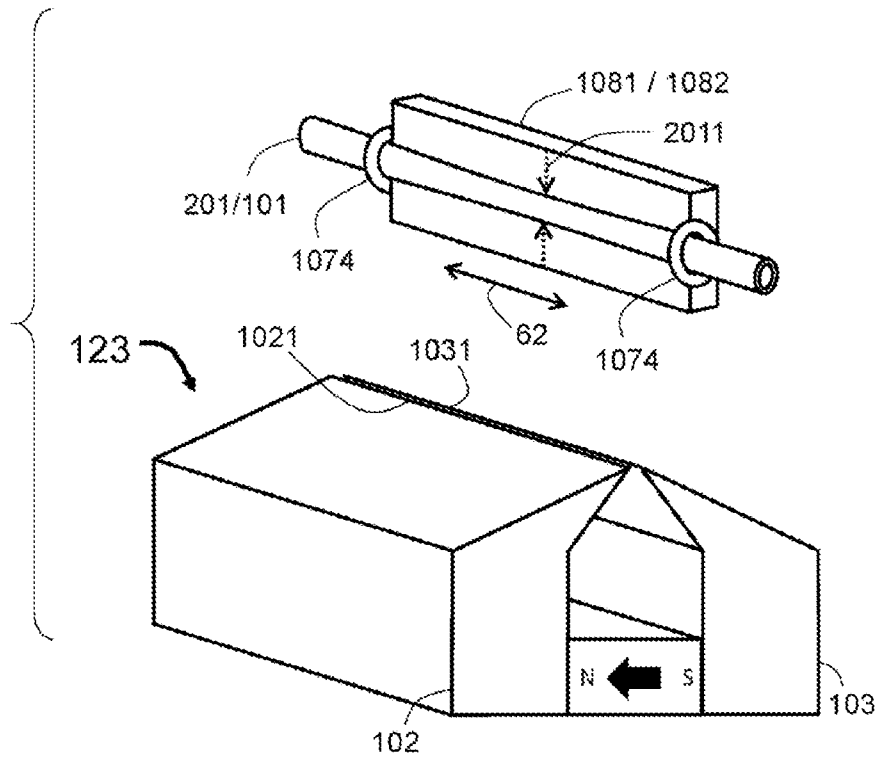


Figura 32

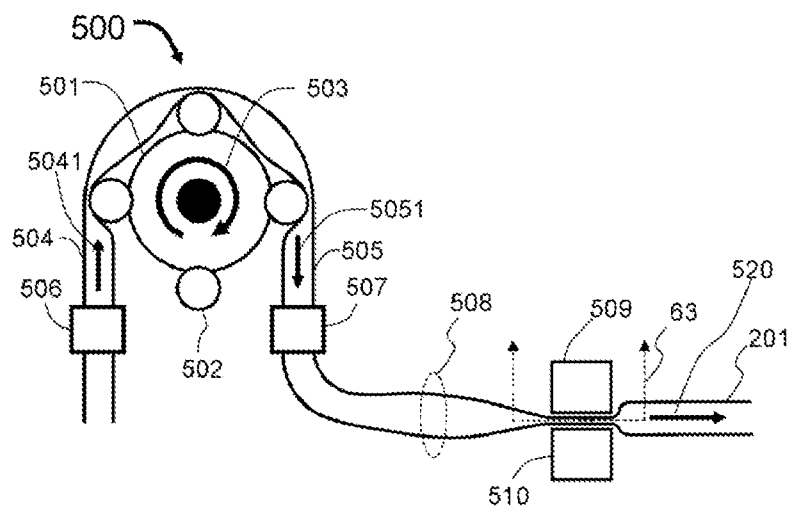


Figura 33A

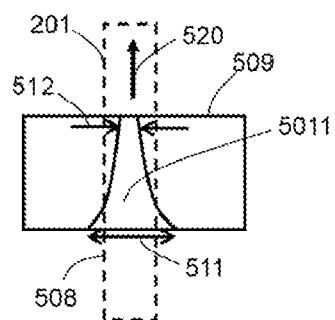


Figura 33B

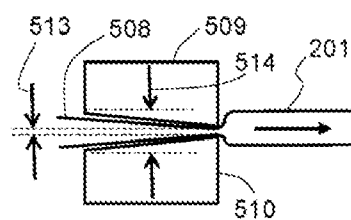


Figura 33C

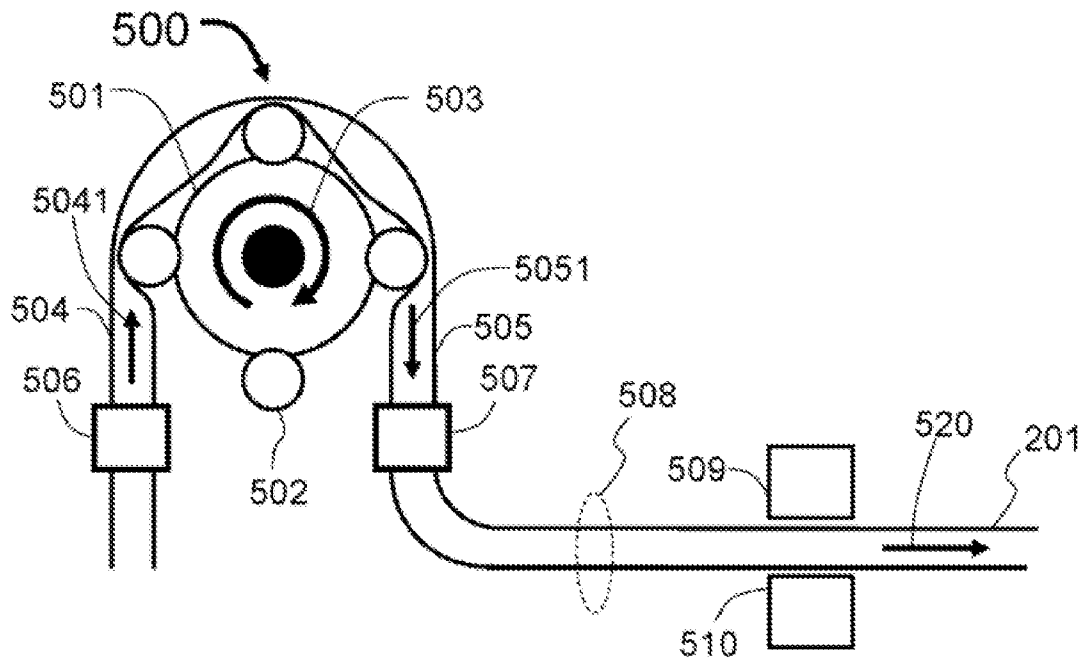


Figura 34A

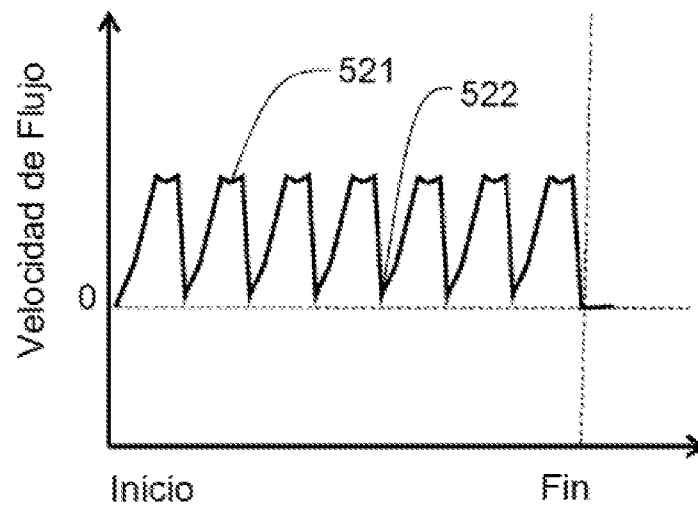


Figura 34B

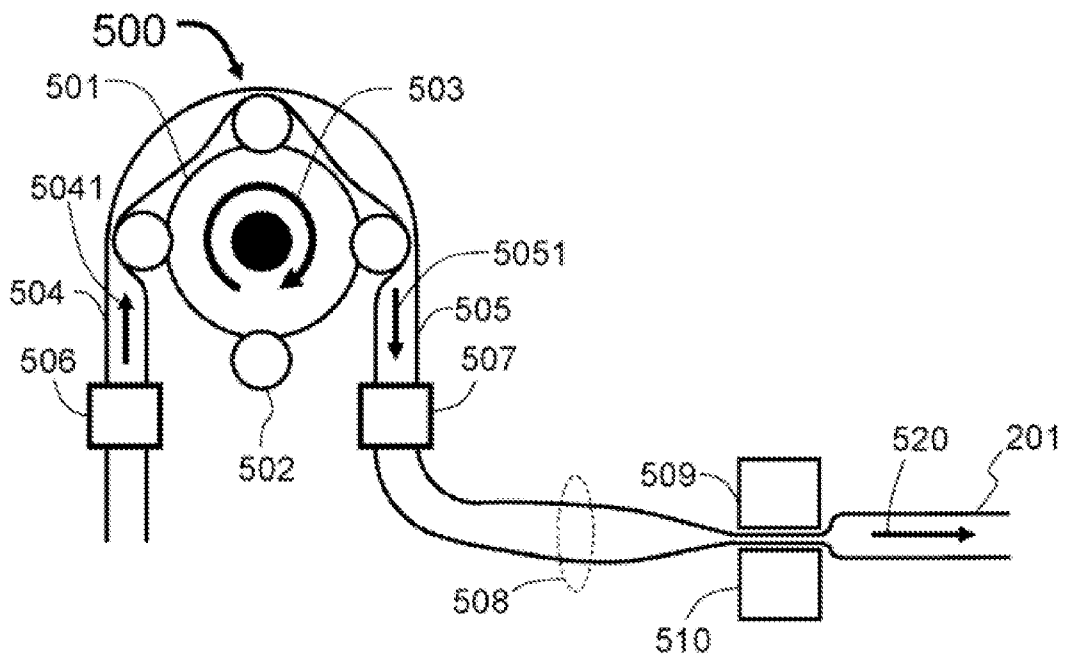


Figura 35A

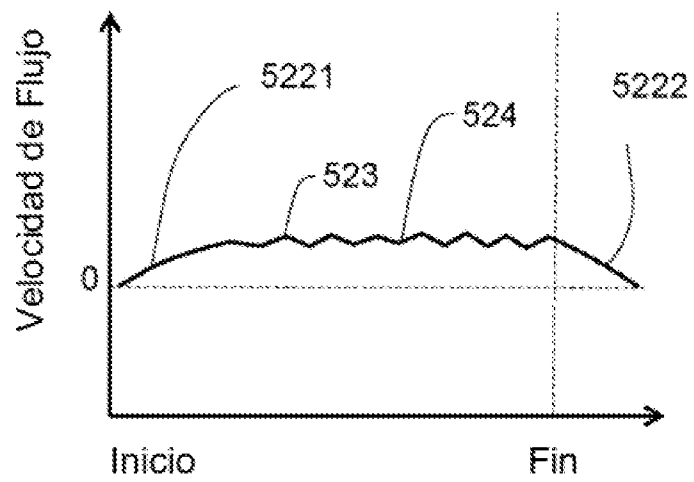


Figura 35B

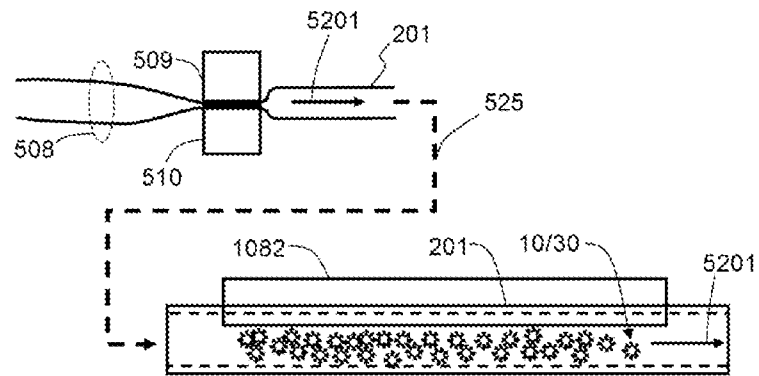


Figura 36A

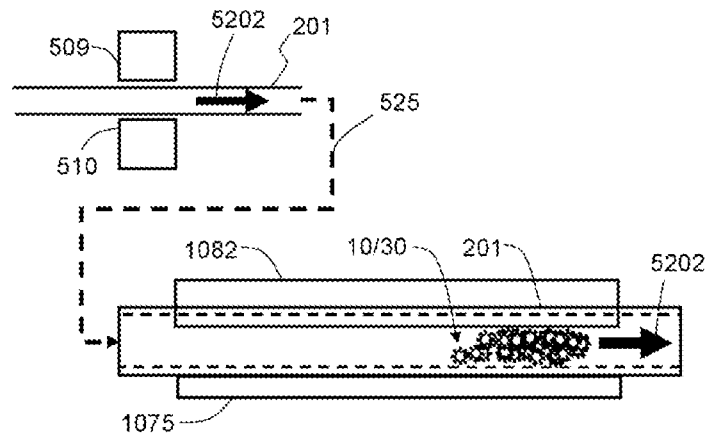


Figura 36B

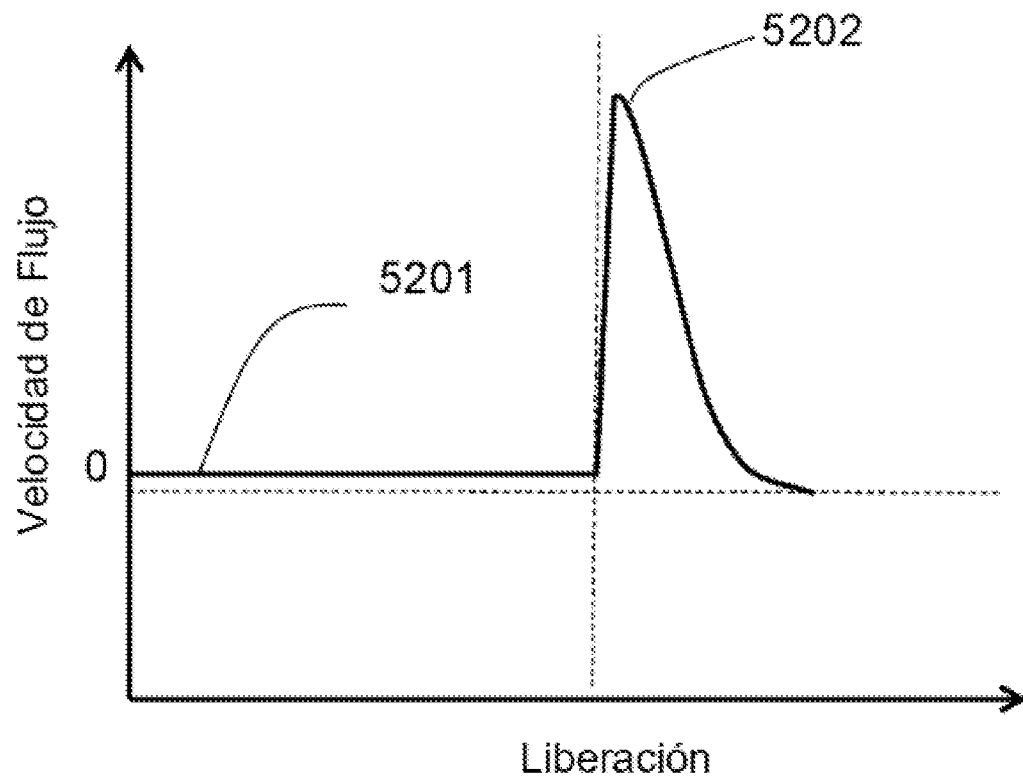


Figura 37

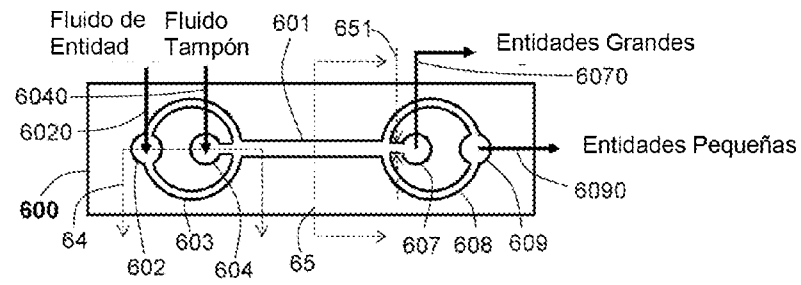


Figura 38A

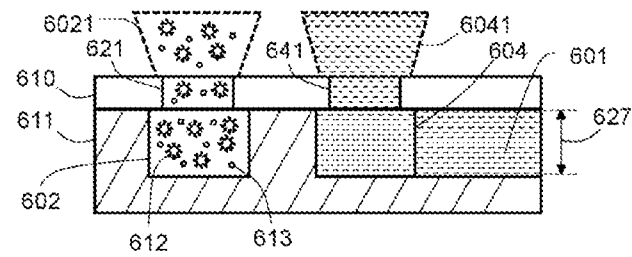


Figura 38B

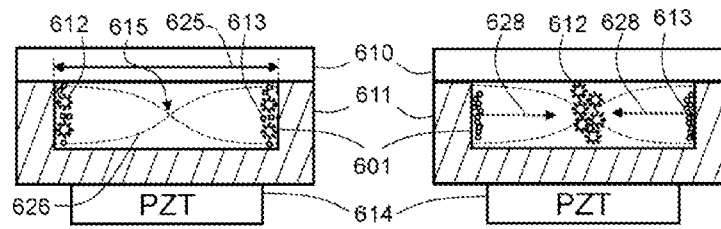


Figura 38C

Figura 38D

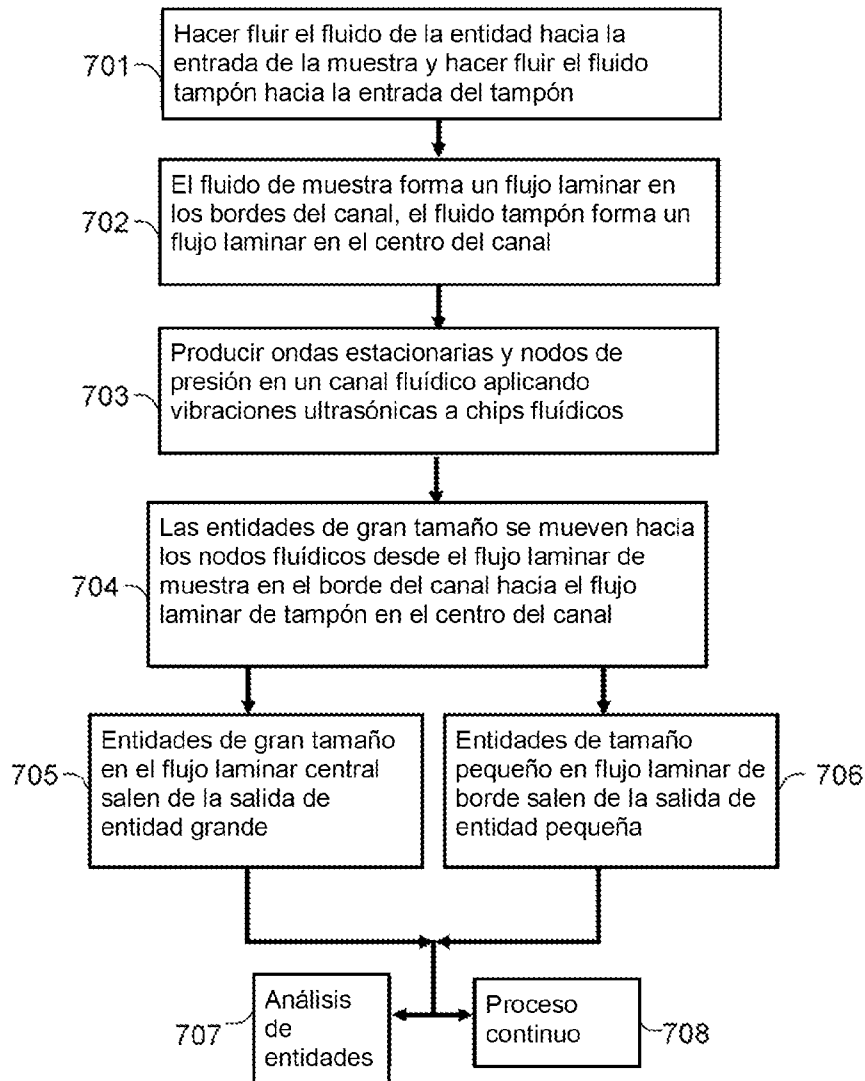


Figura 39

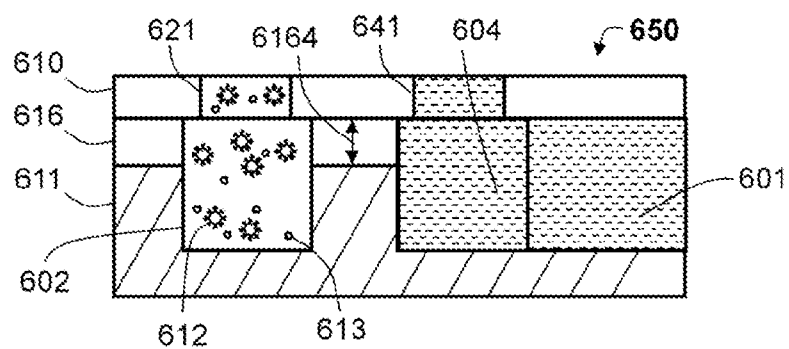


Figura 40A

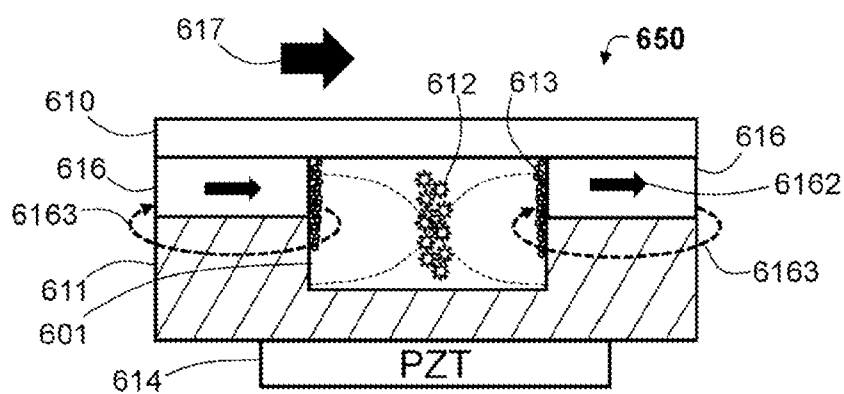


Figura 40B

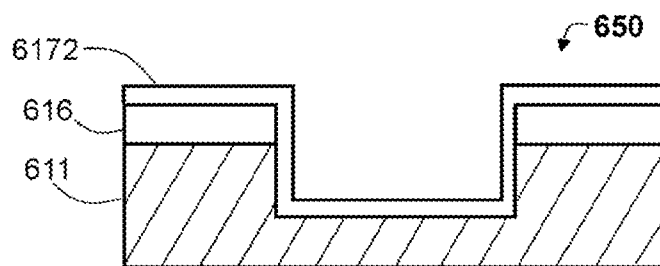


Figura 40C

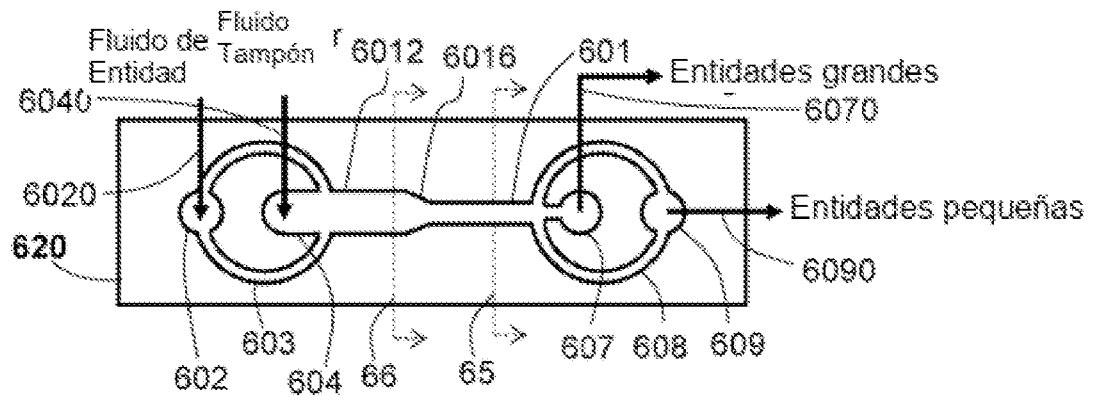


Figura 41A

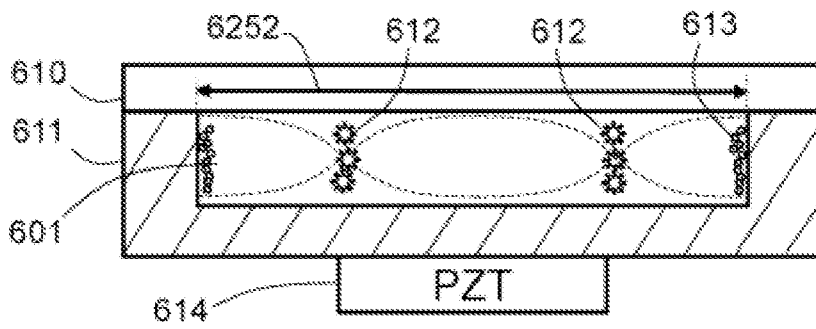


Figura 41B

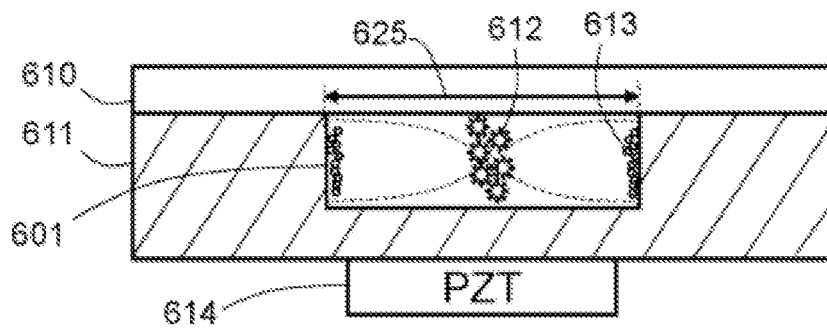


Figura 41C

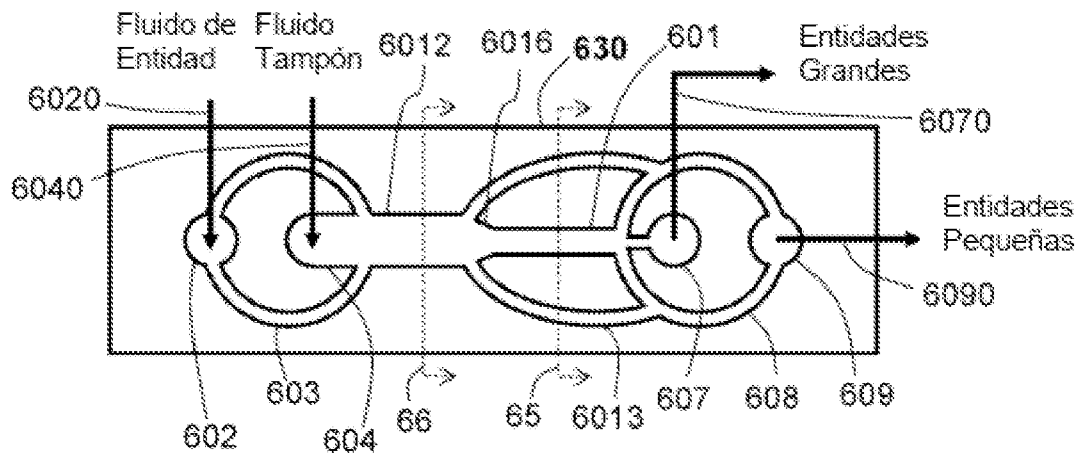


Figura 42A

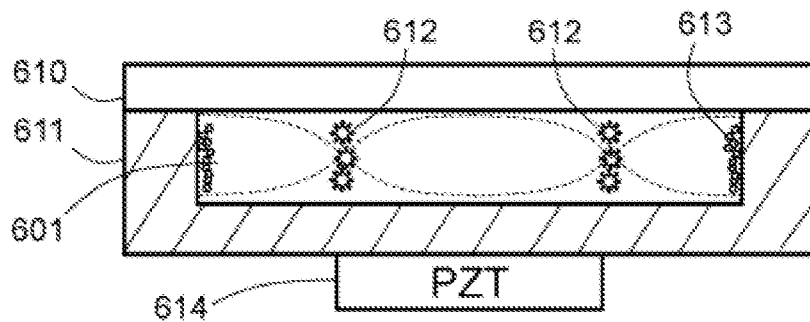


Figura 42B

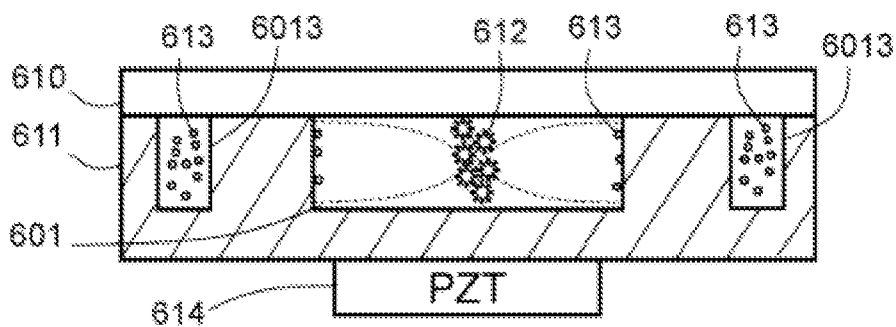


Figura 42C

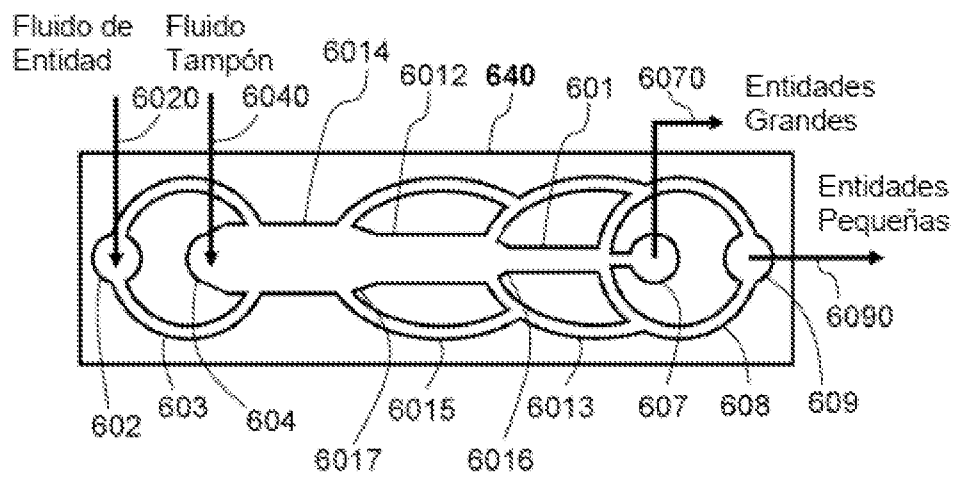


Figura 43

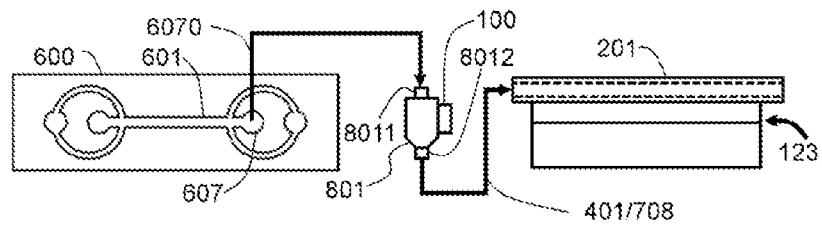


Figura 44A

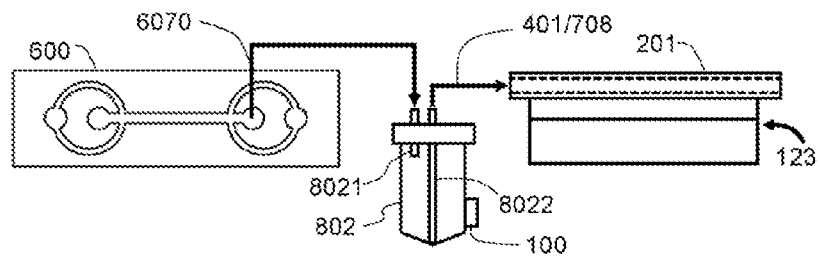


Figura 44B

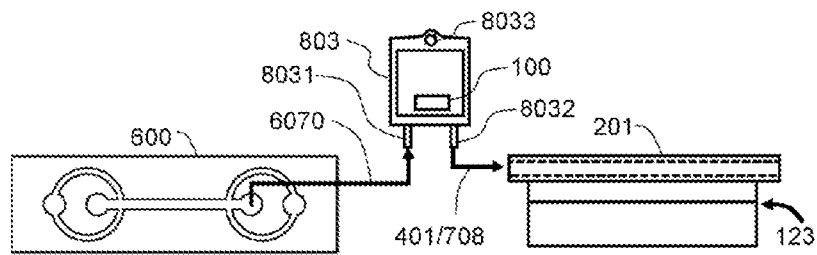


Figura 44C

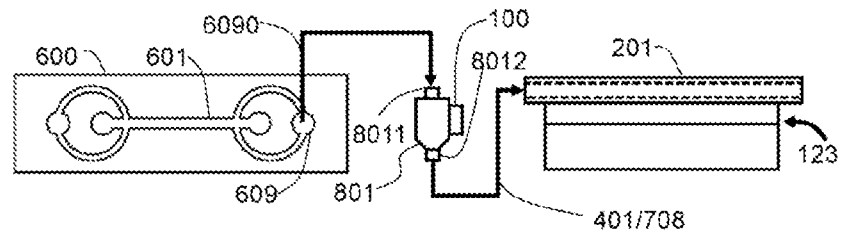


Figura 45A

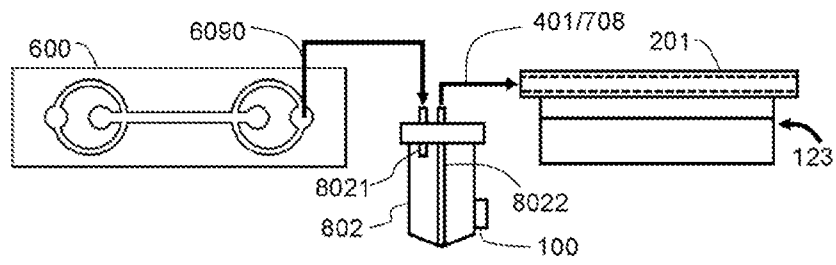


Figura 45B

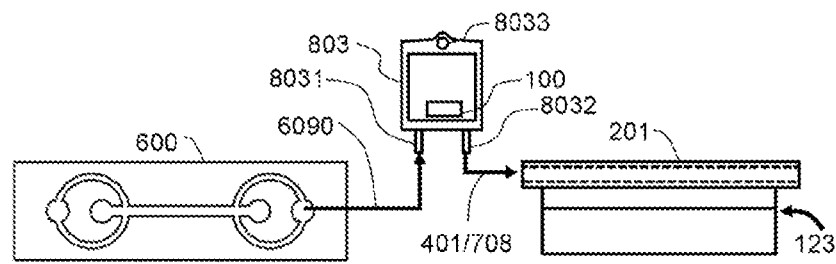


Figura 45C

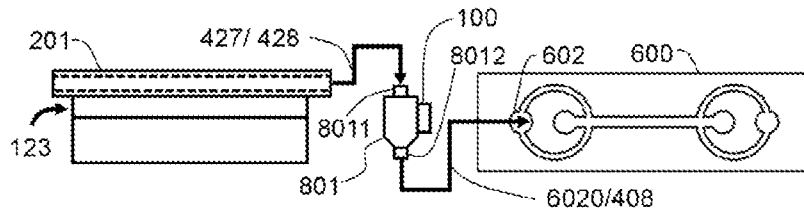


Figura 46A

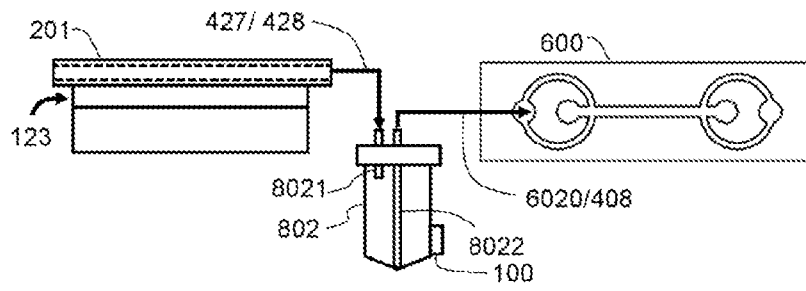


Figura 46B

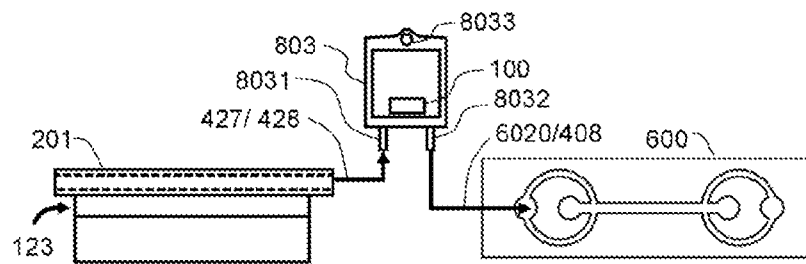


Figura 46C

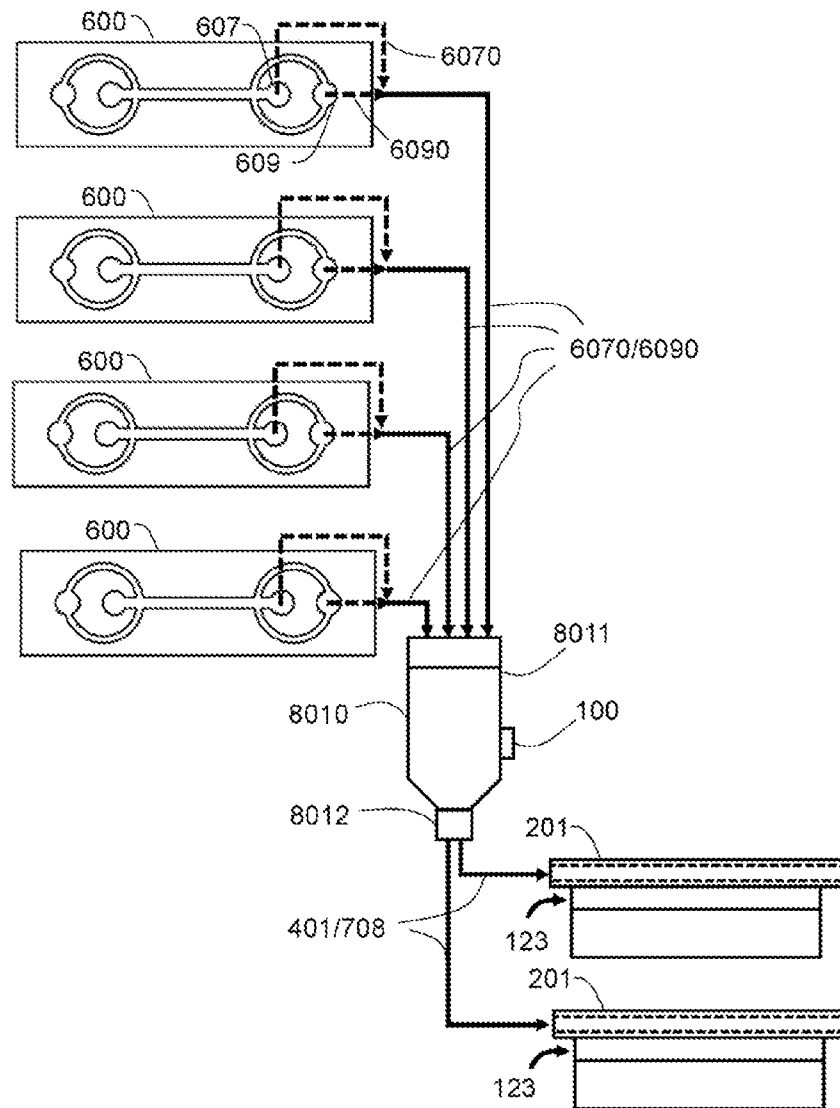


Figura 47

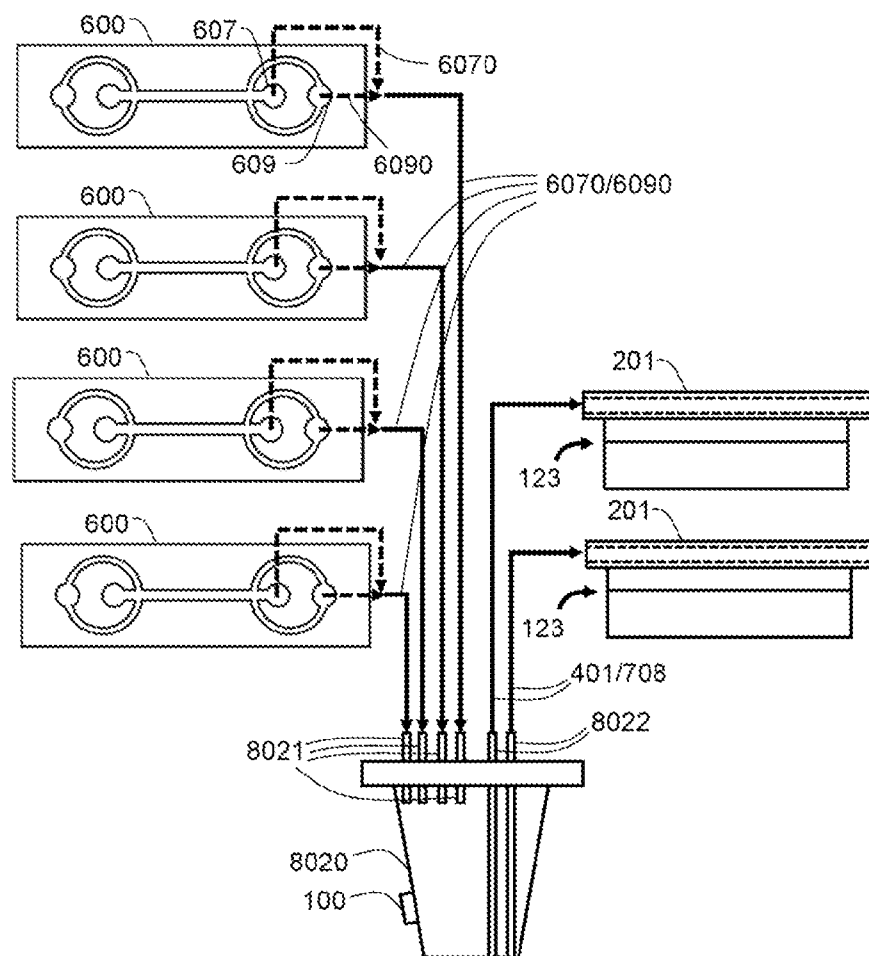


Figura 48

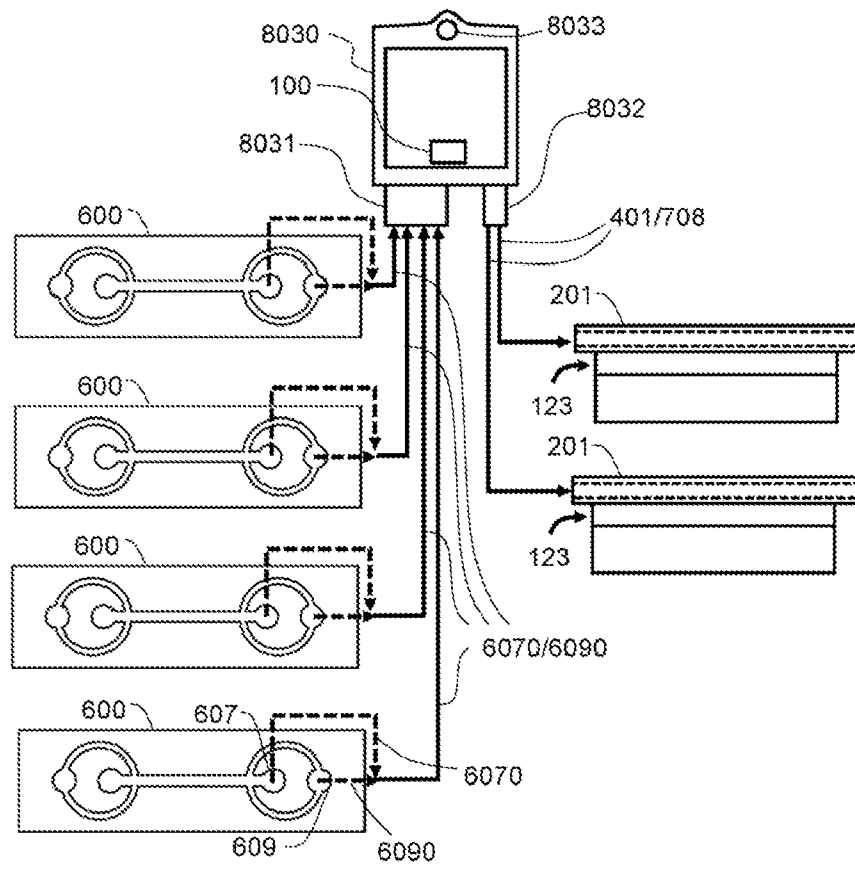


Figura 49

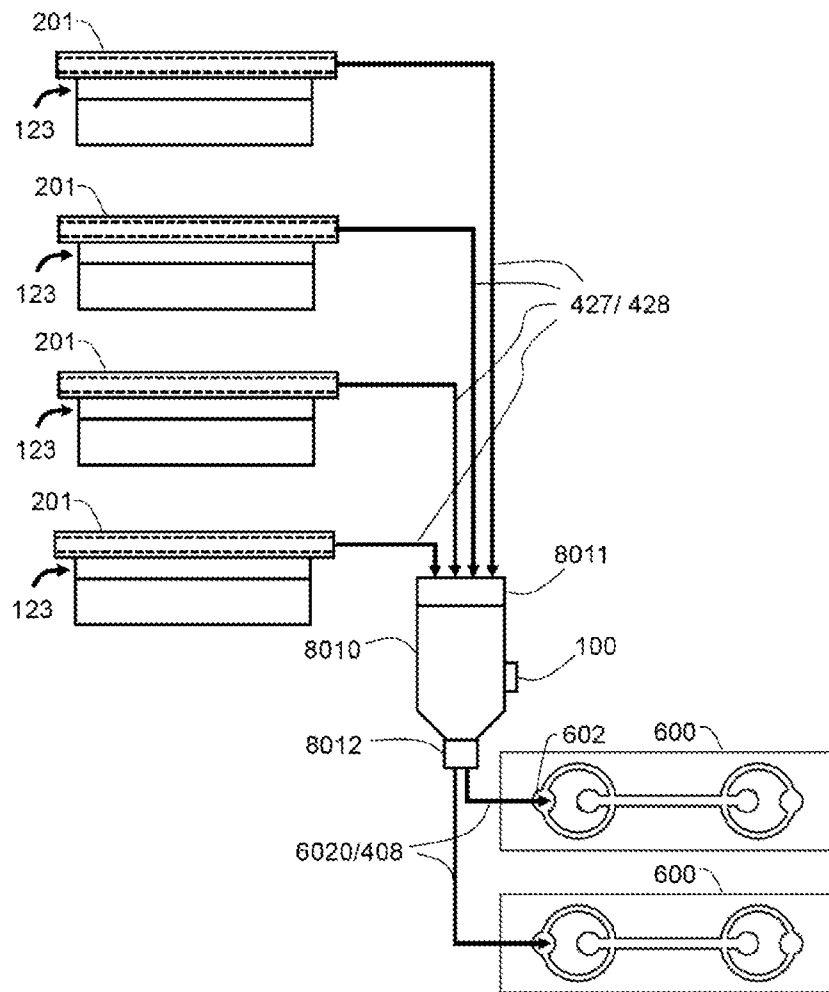


Figura 50

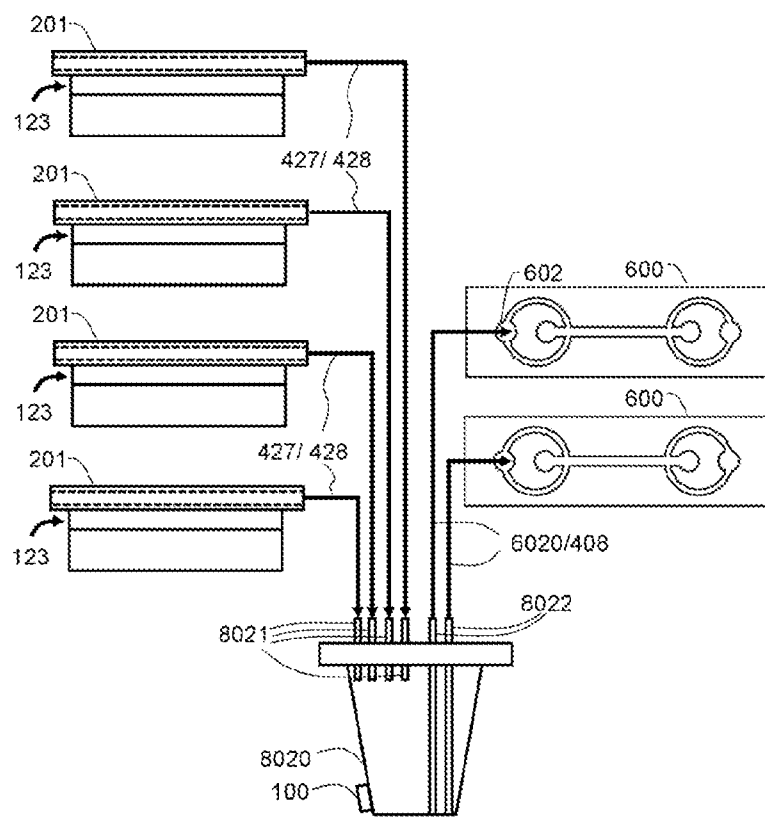


Figura 51

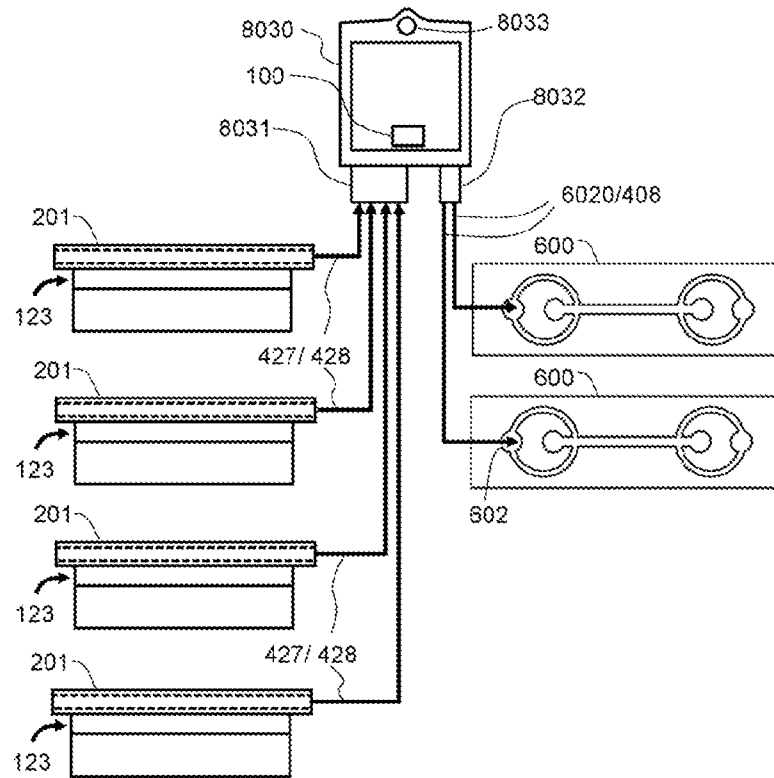


Figura 52

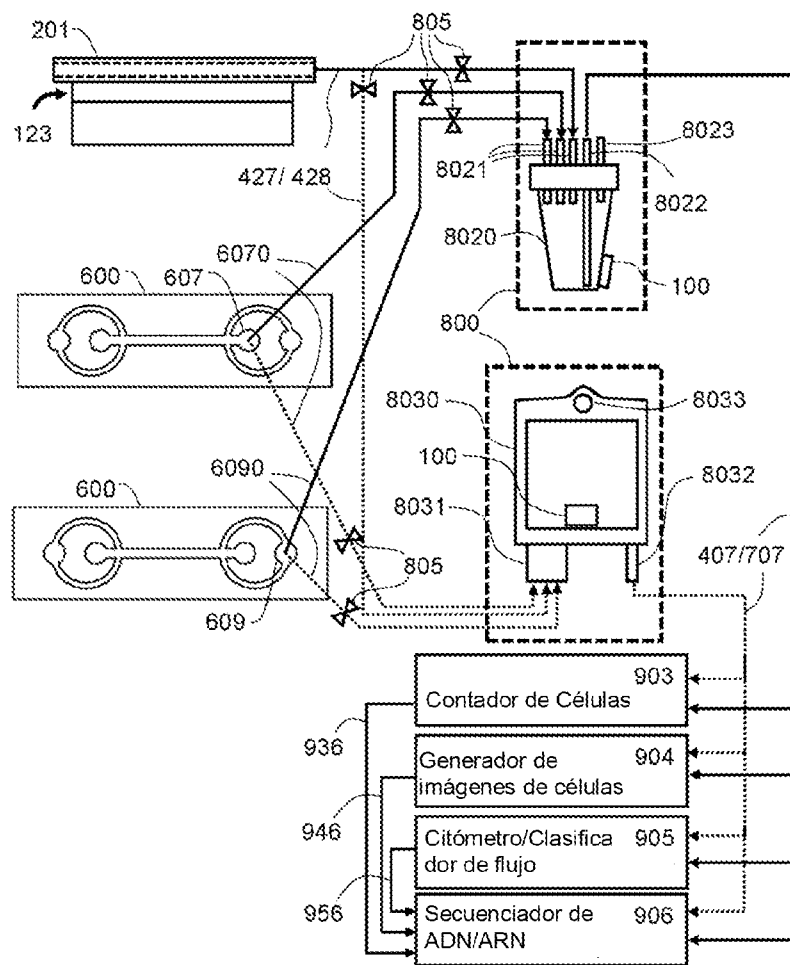


Figura 53

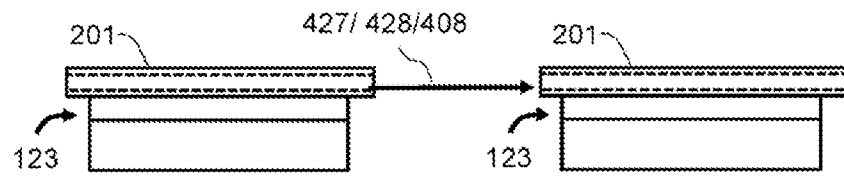


Figura 54A

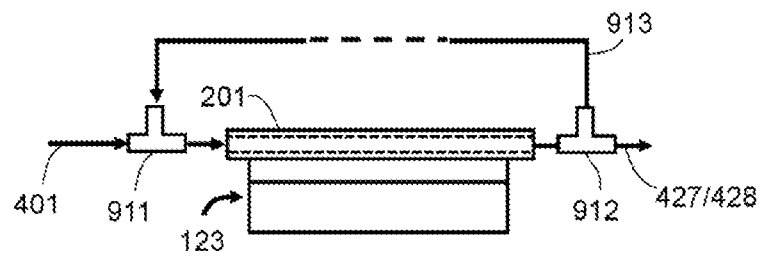


Figura 54B

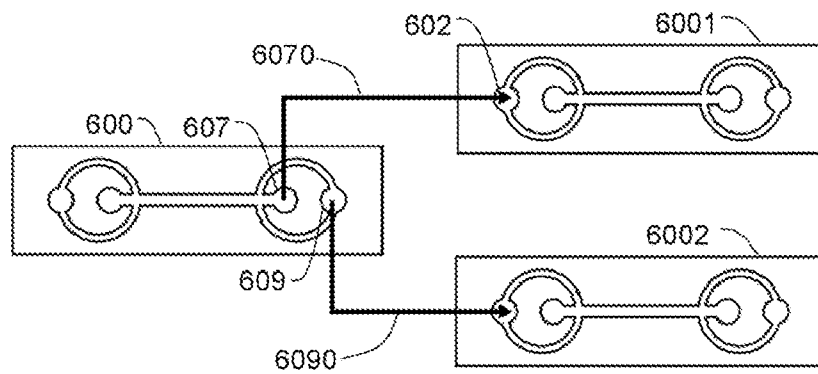


Figura 54C

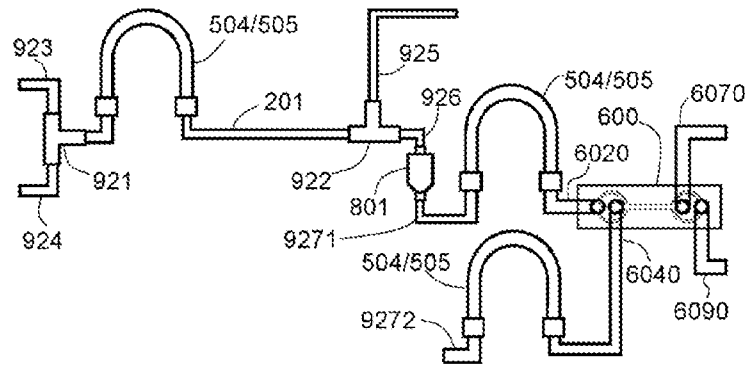


Figura 55A

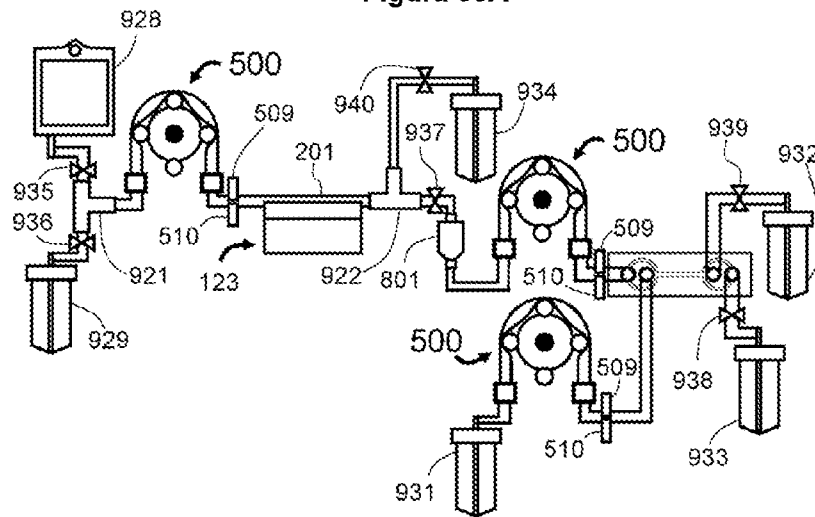


Figura 55B

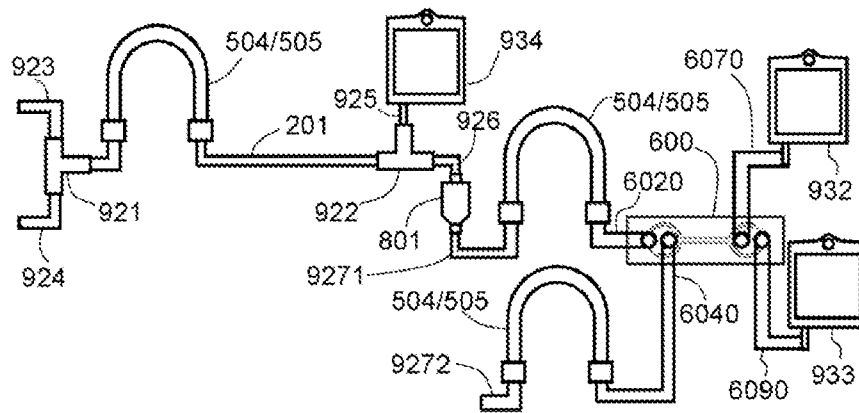


Figura 56A

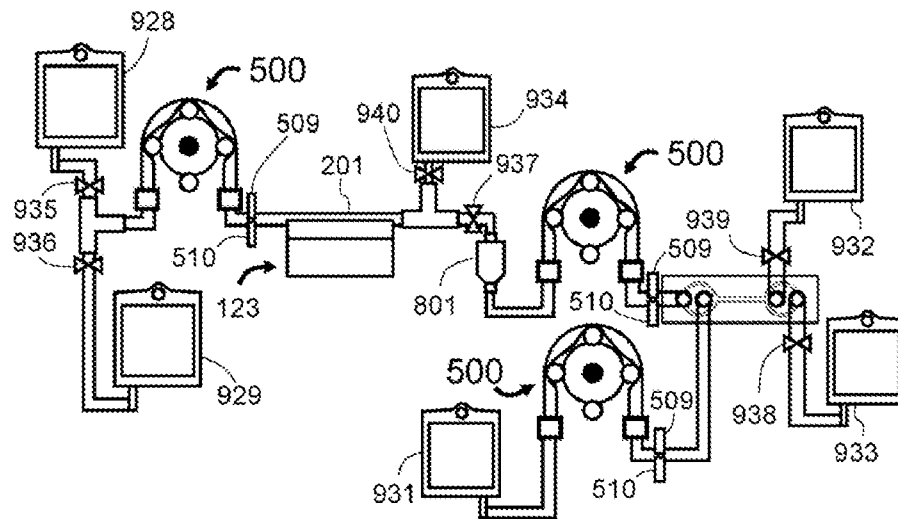


Figura 56B

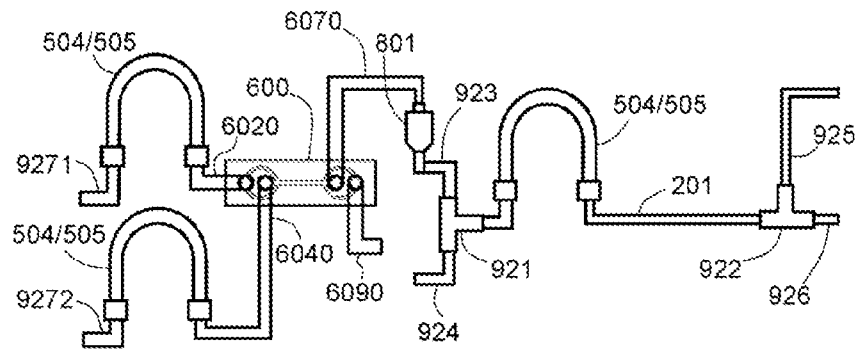


Figura 57A

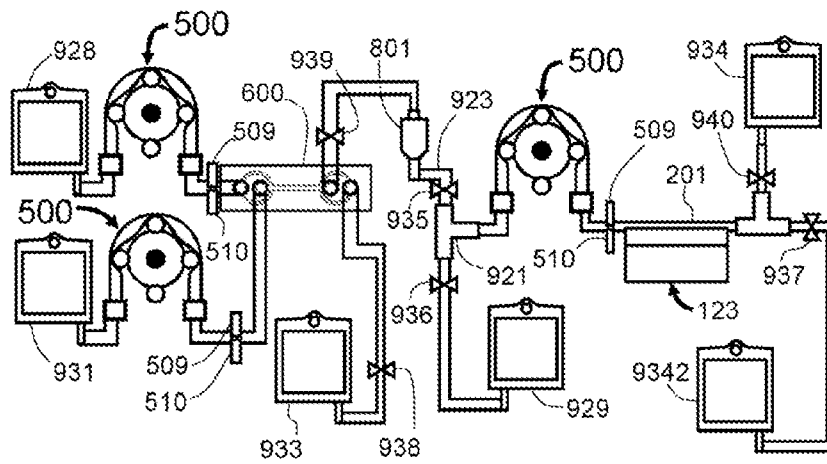


Figura 57B

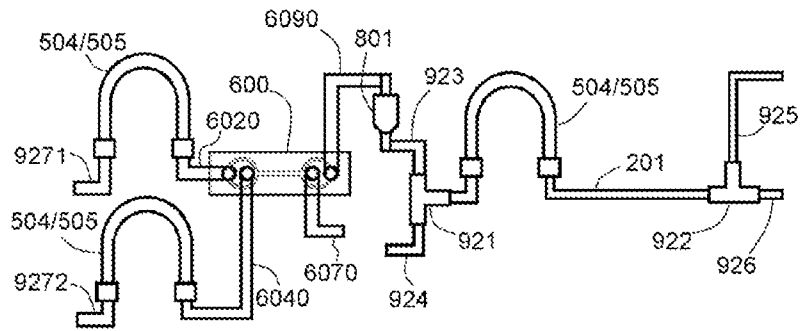


Figura 58A

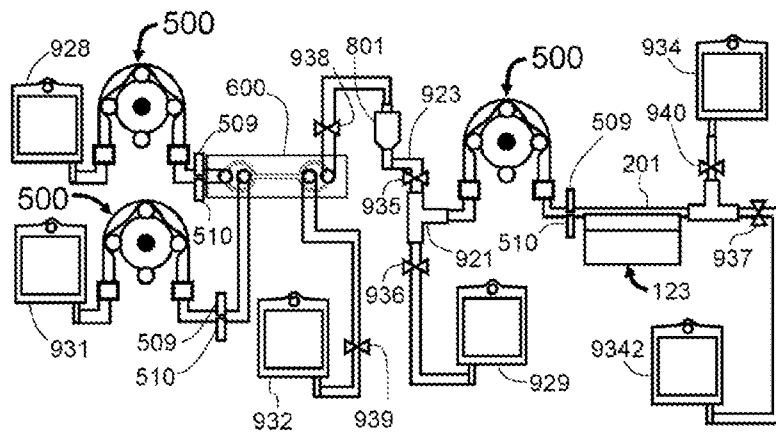


Figura 58B

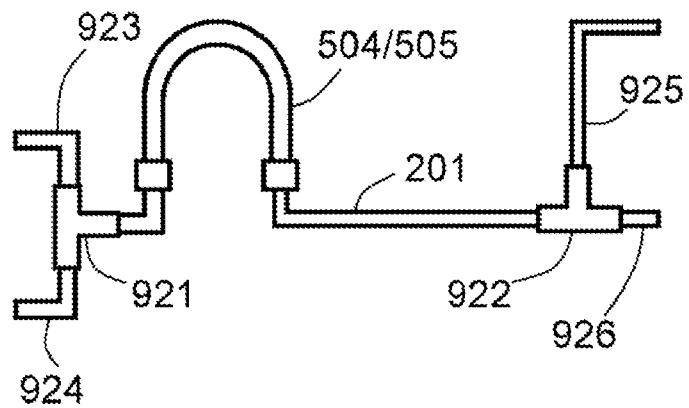


Figura 59A

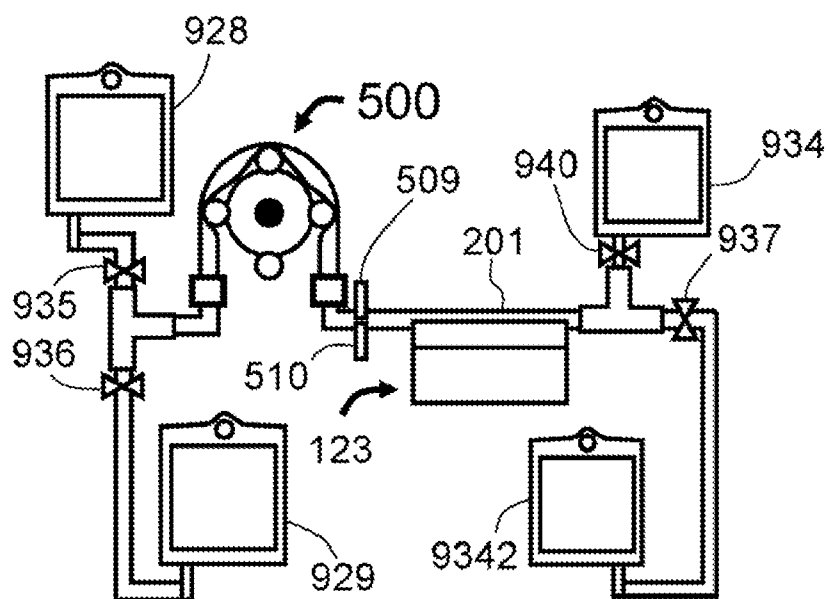


Figura 59B

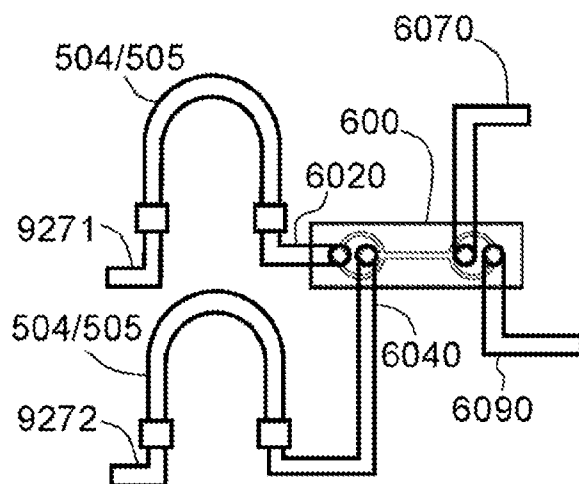


Figura 60A

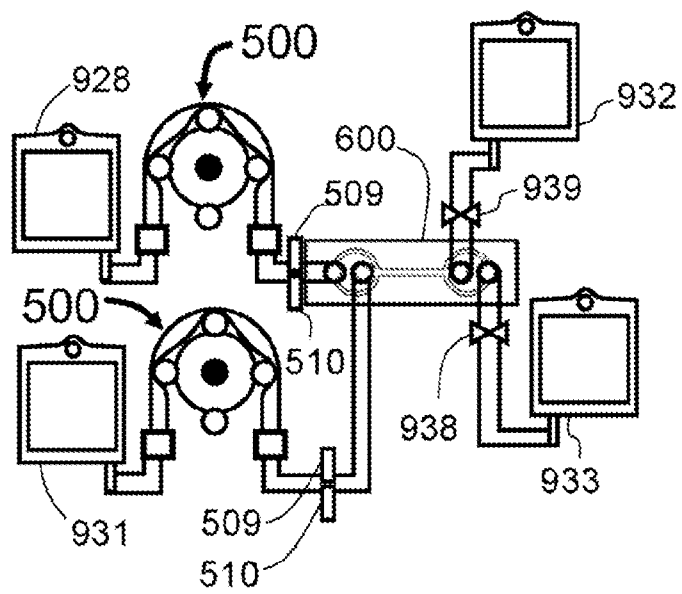


Figura 60B

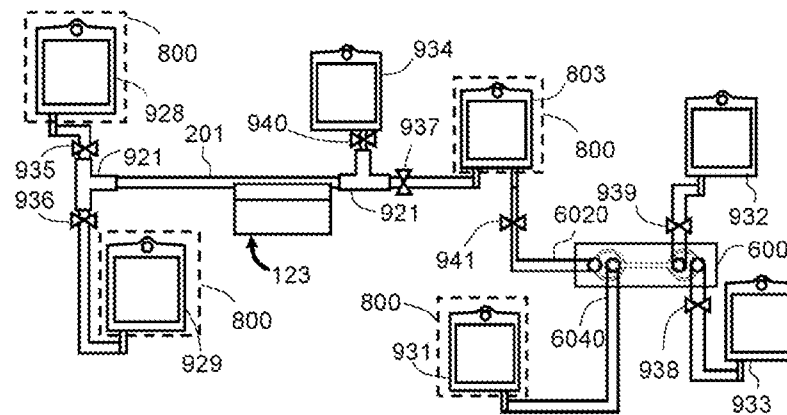


Figura 61A

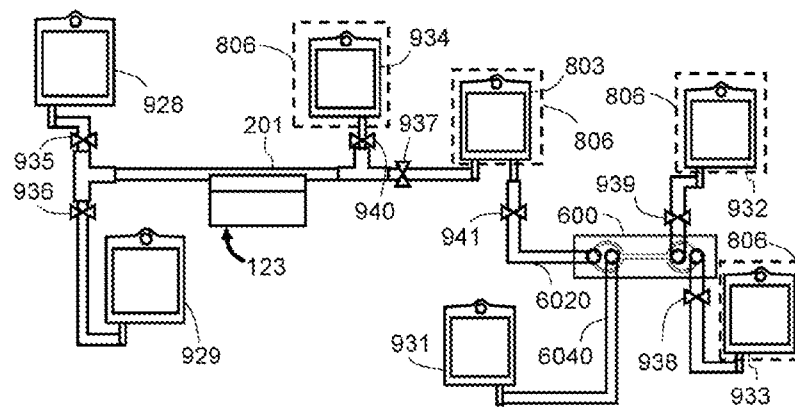


Figura 61B

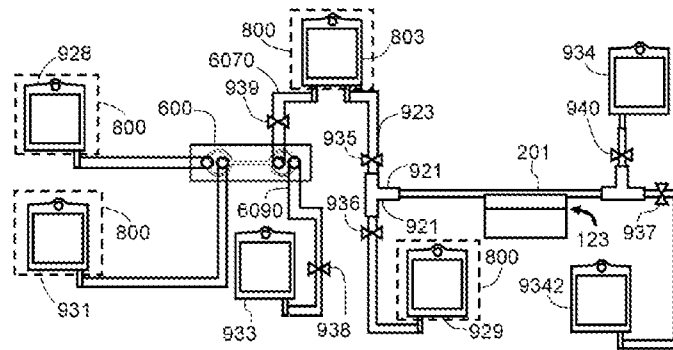


Figura 62A

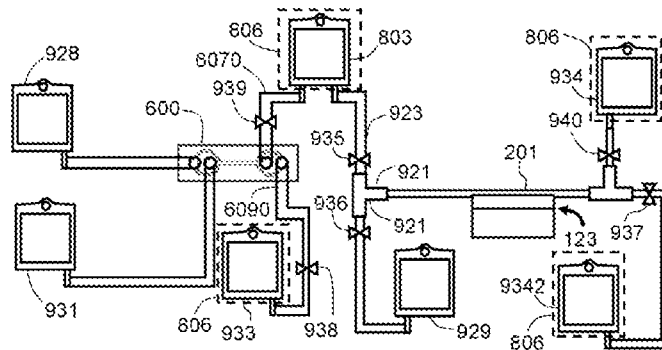


Figura 62B

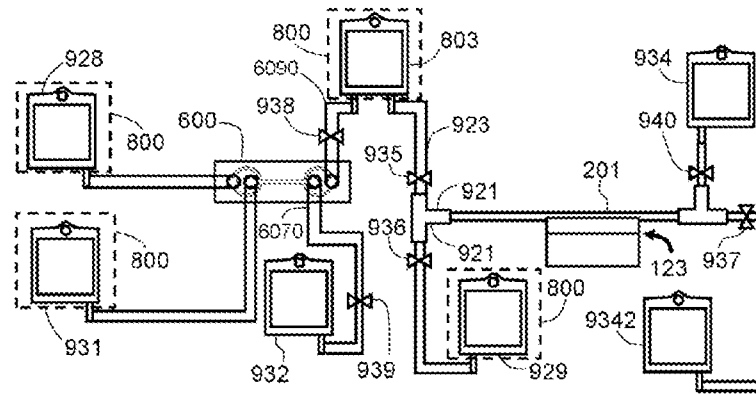


Figura 63A

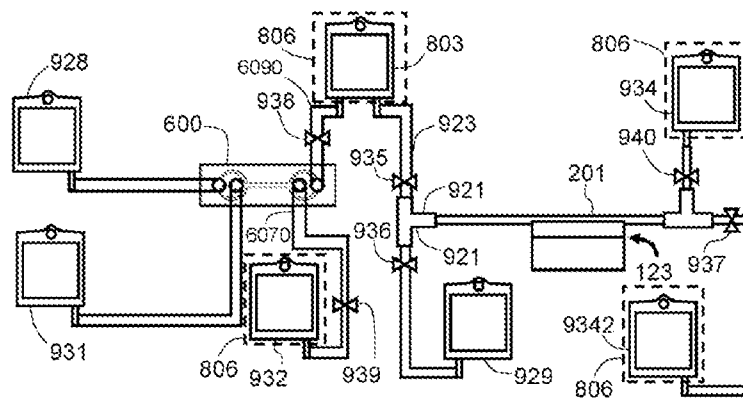


Figura 63B

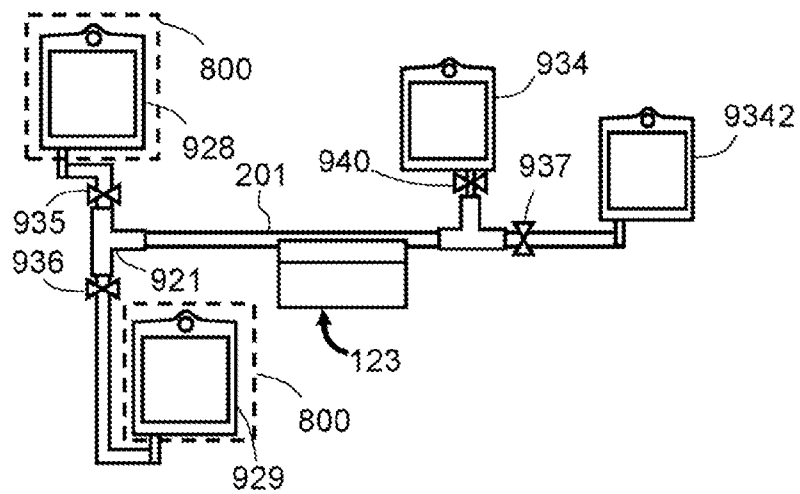


Figura 64A

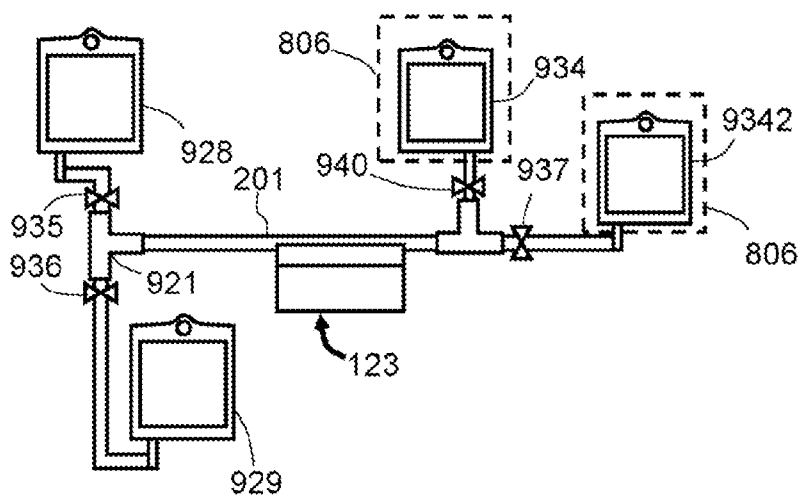


Figura 64B

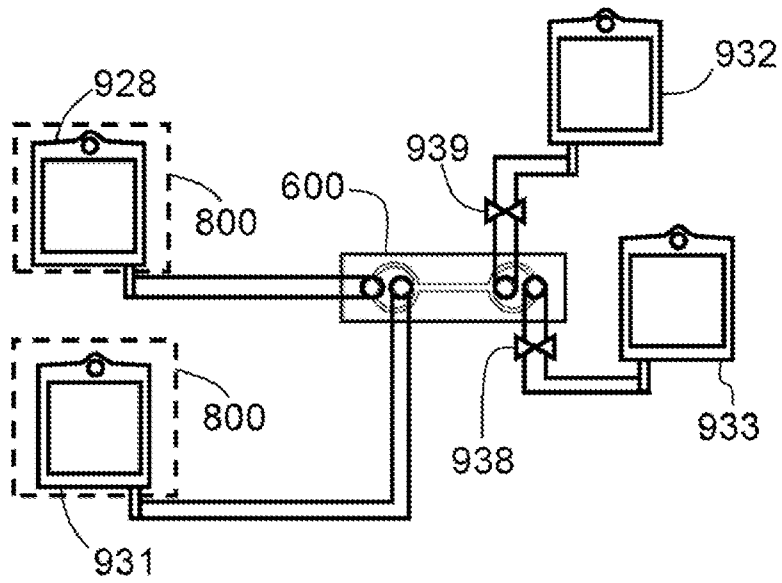


Figura 65A

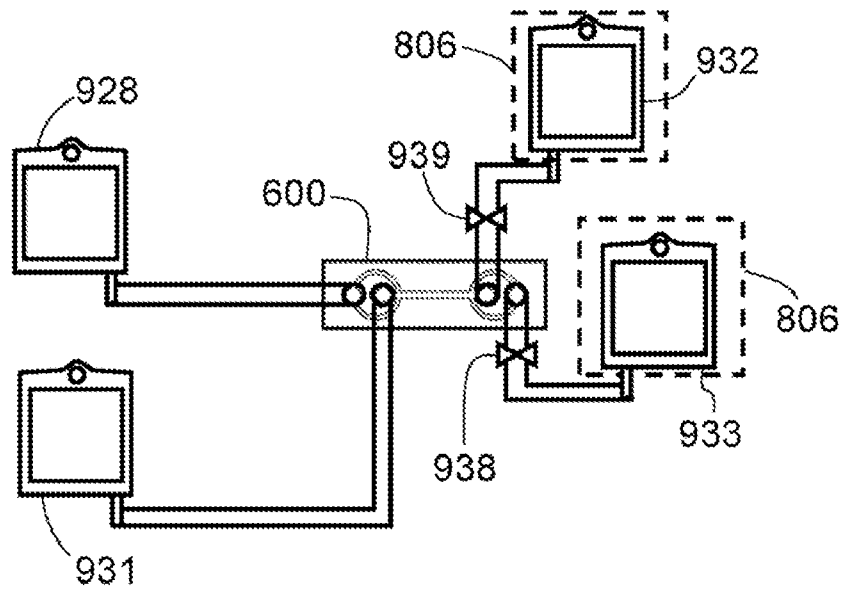


Figura 65B

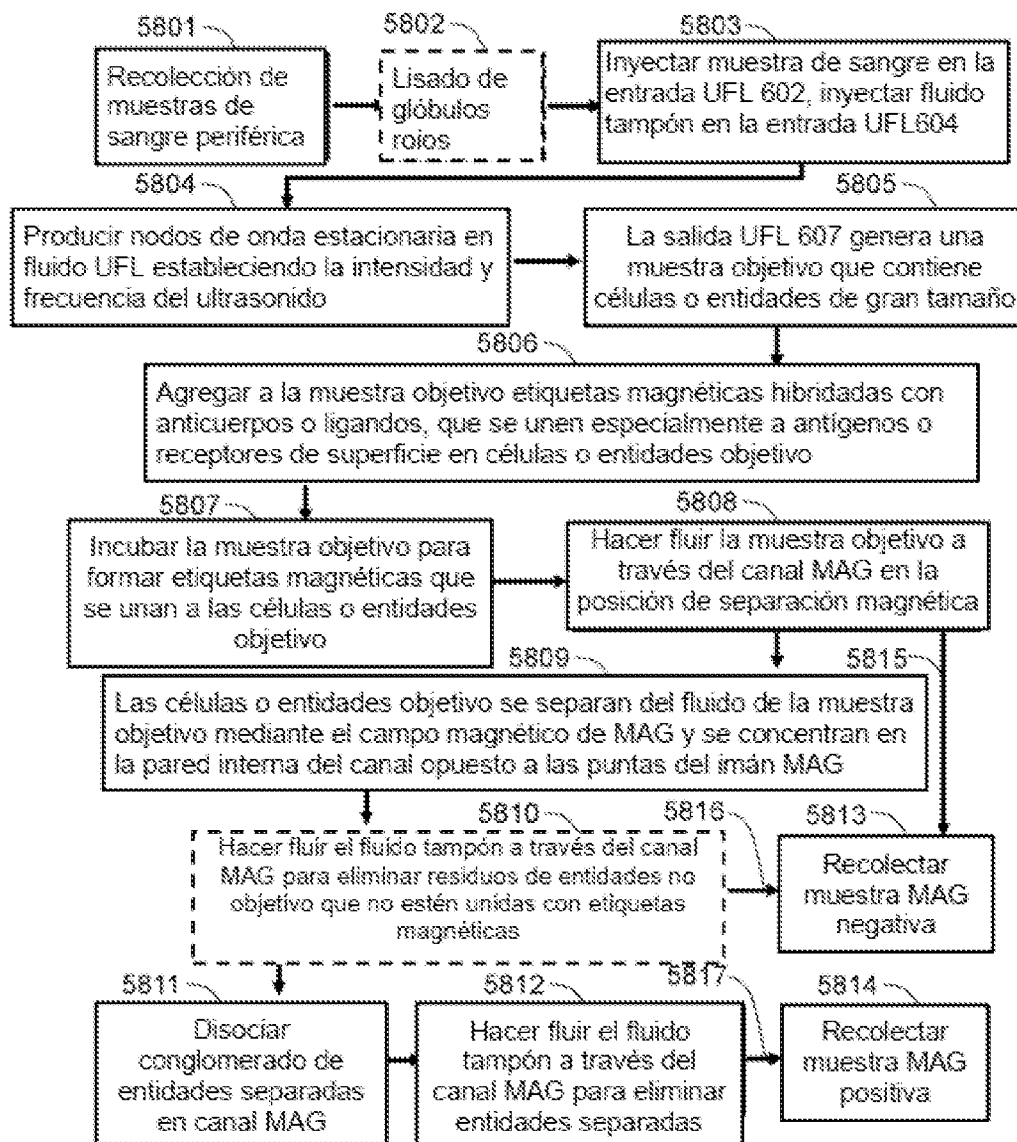


Figura 66

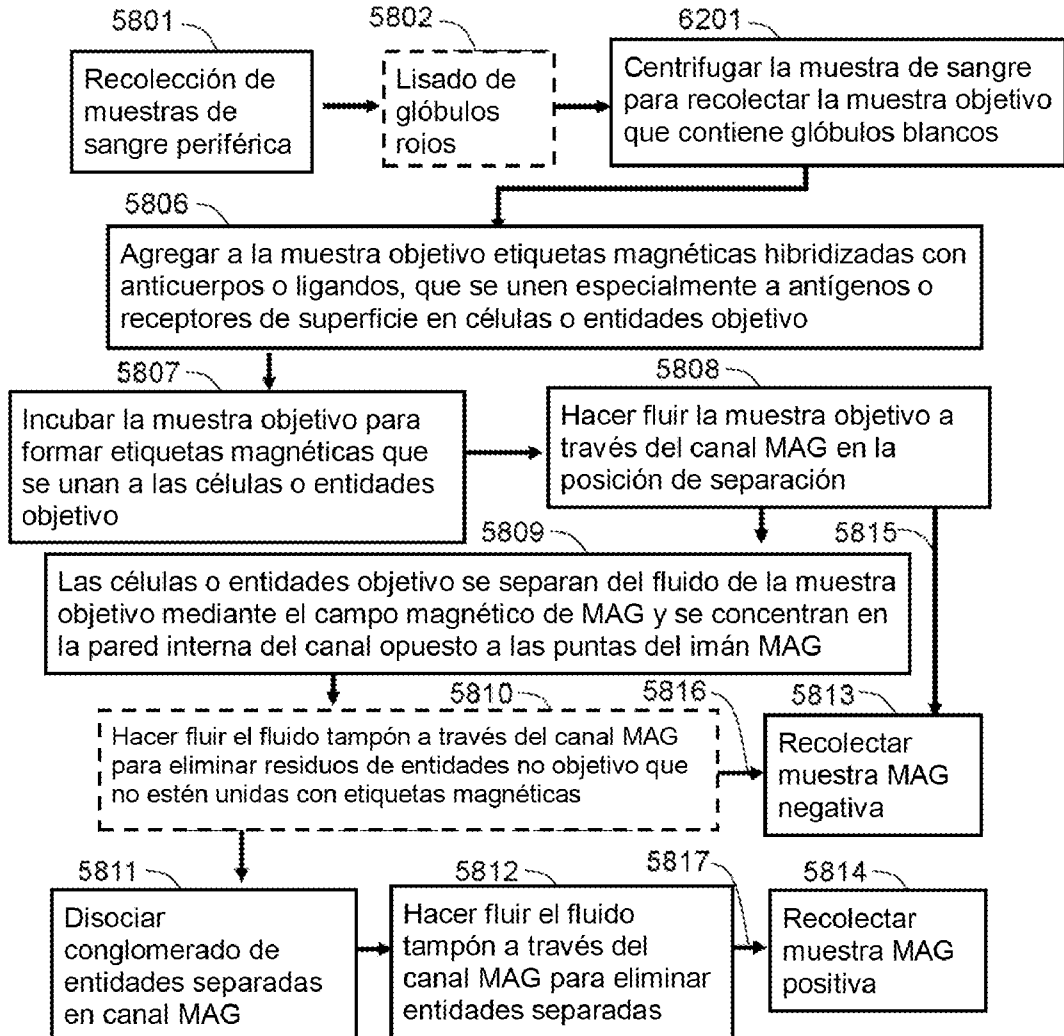


Figura 67

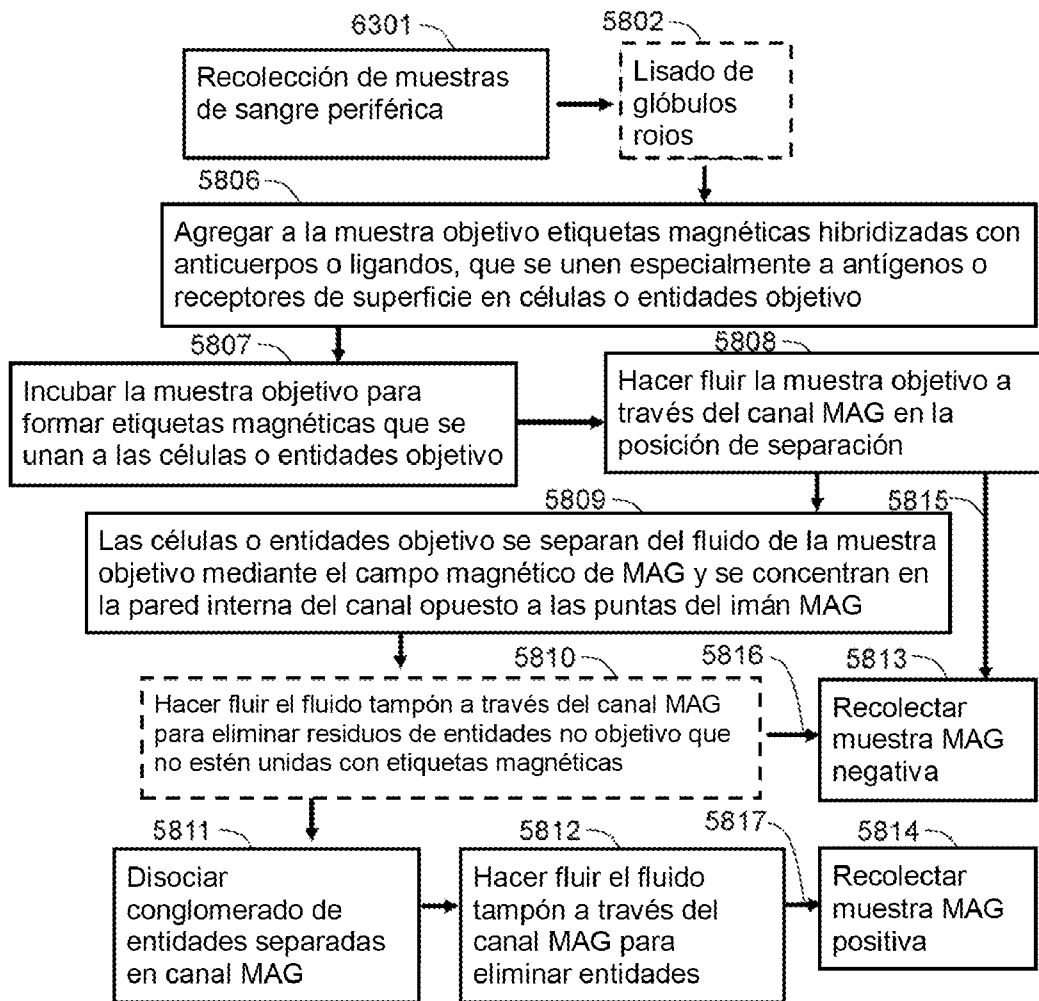


Figura 68

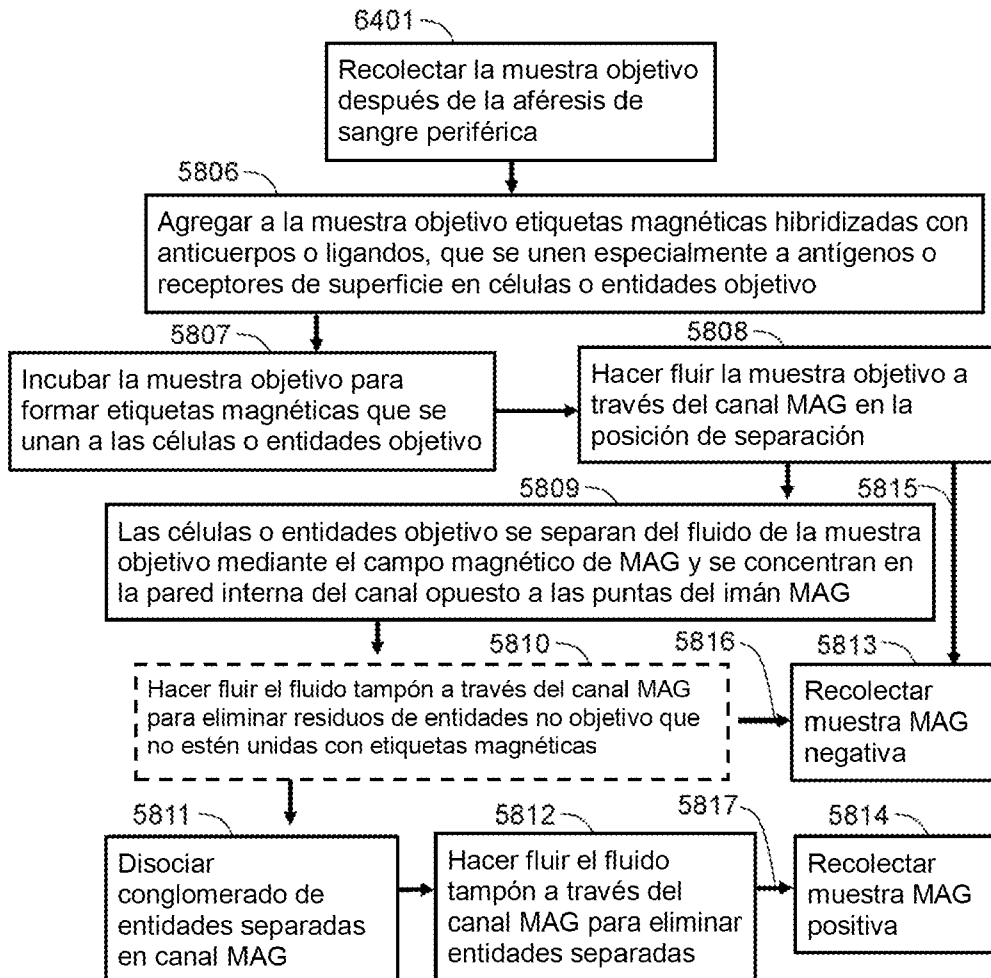


Figura 69

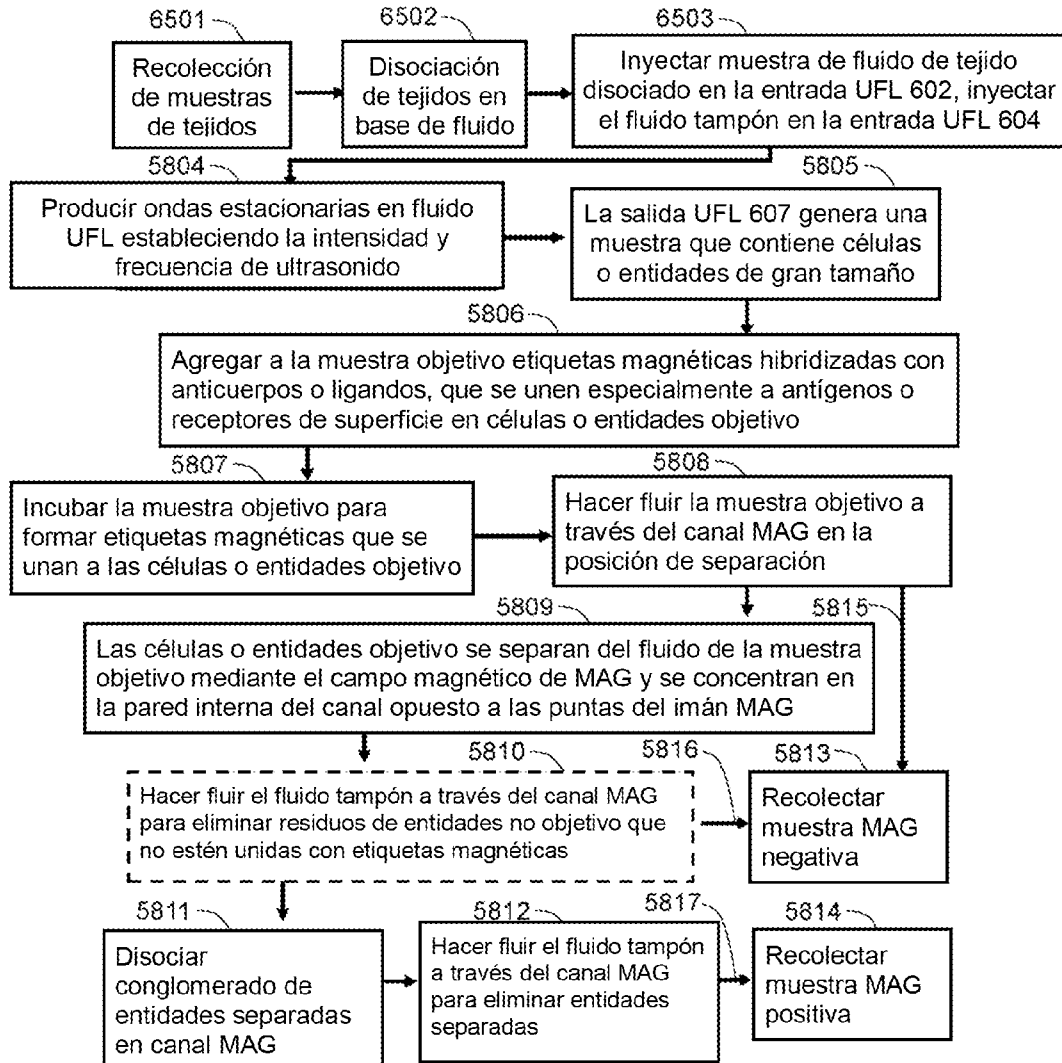
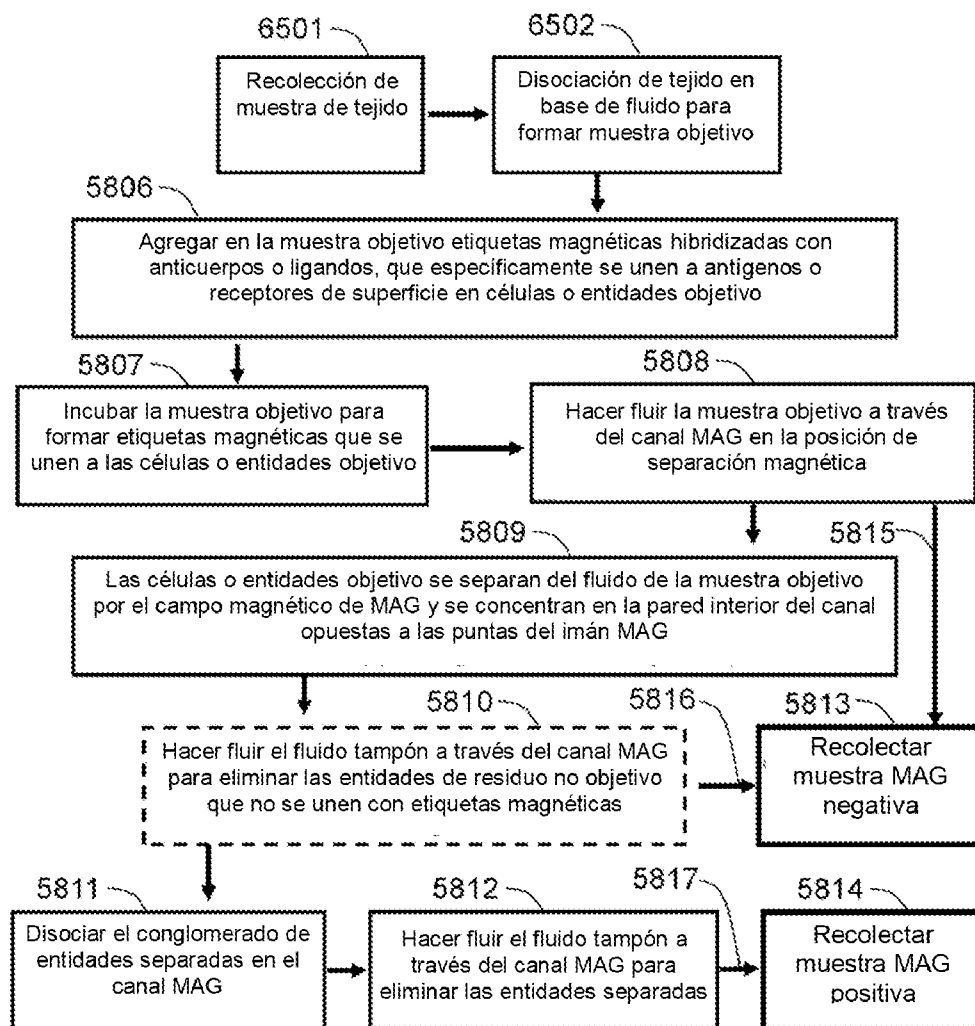
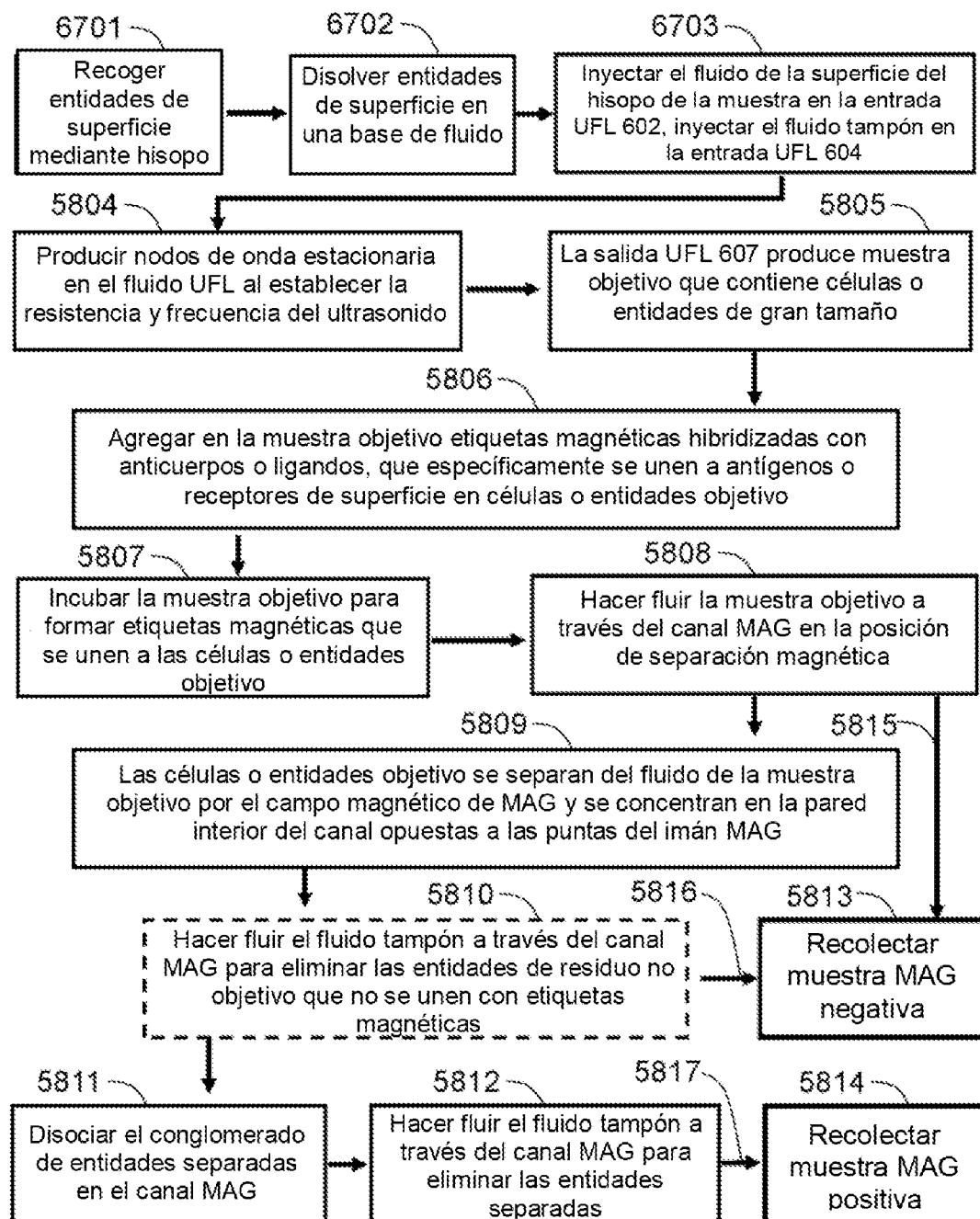


Figura 70

**FIGURA 71**

**FIGURA 72**

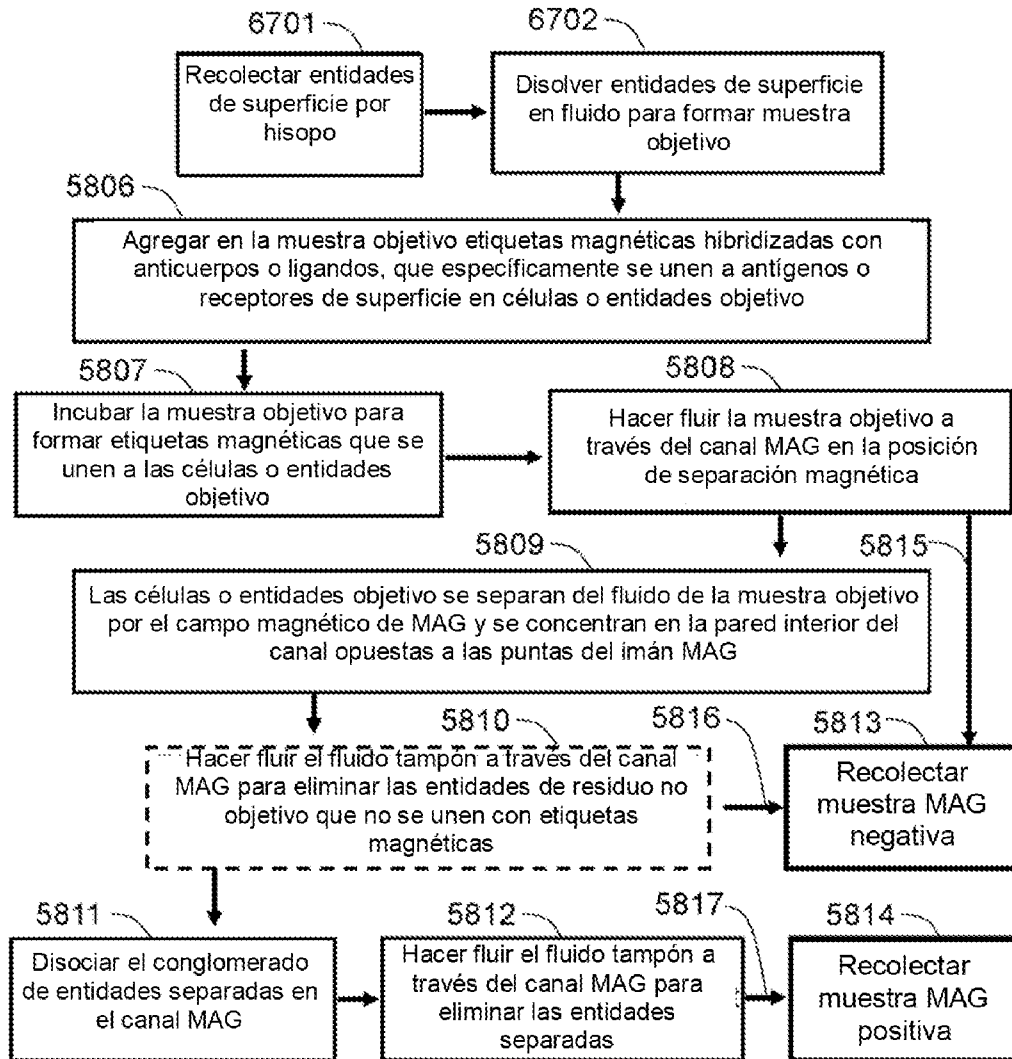


FIGURA 73

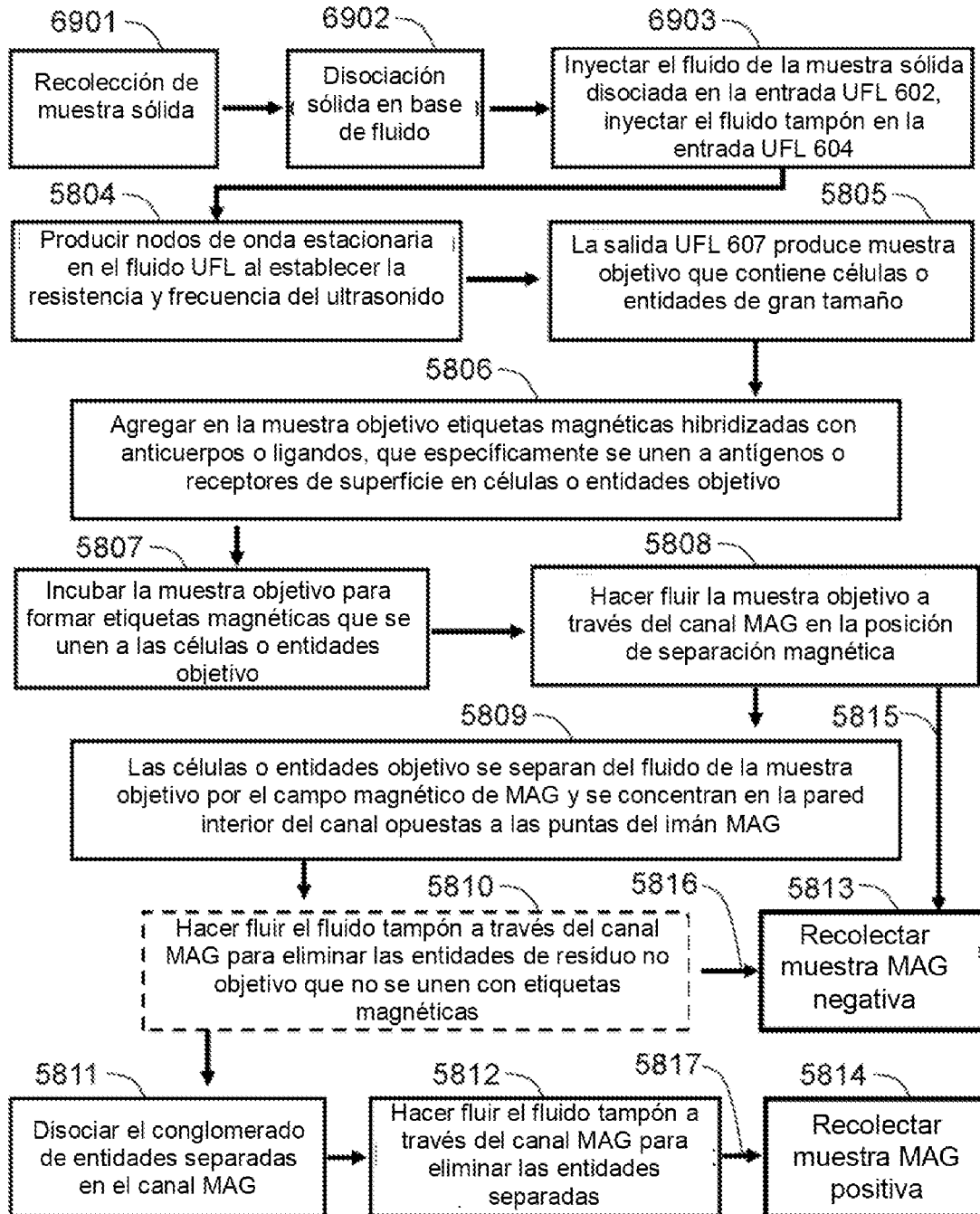
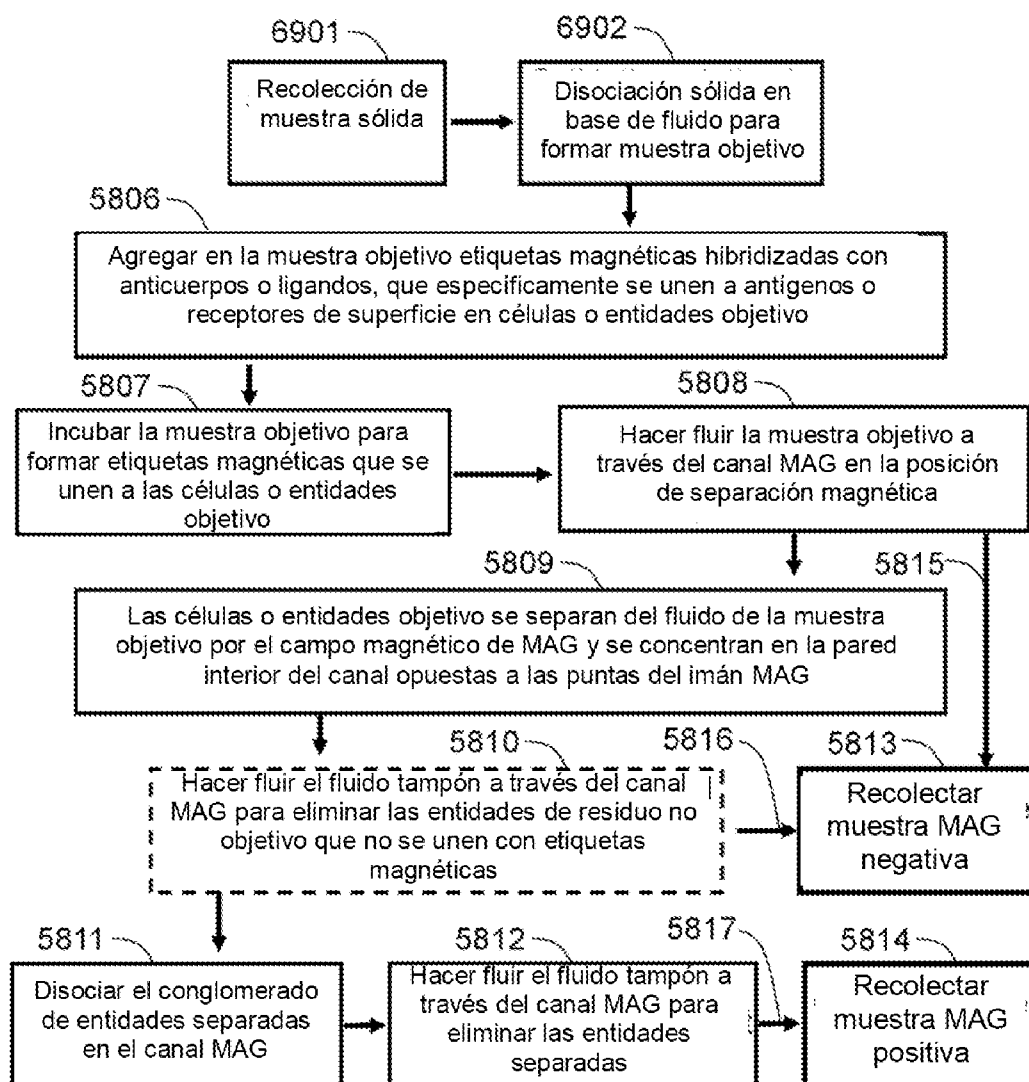


FIGURA 74

**FIGURA 75**

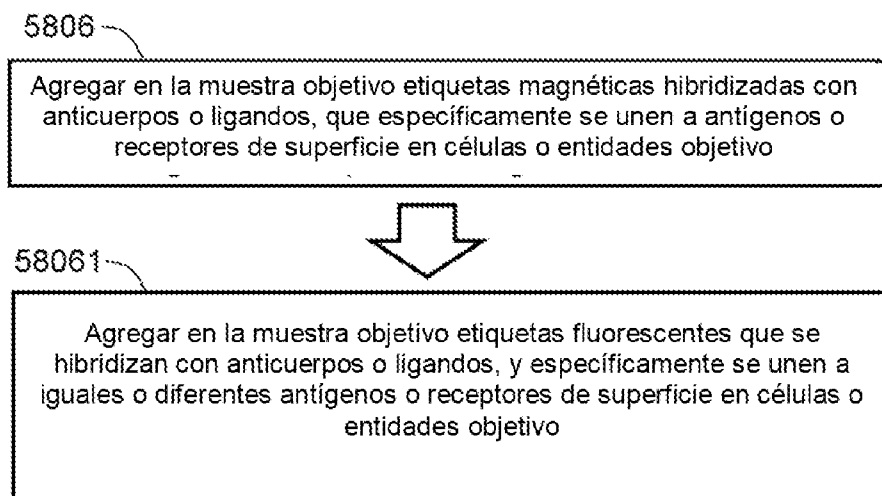


FIGURA 76A

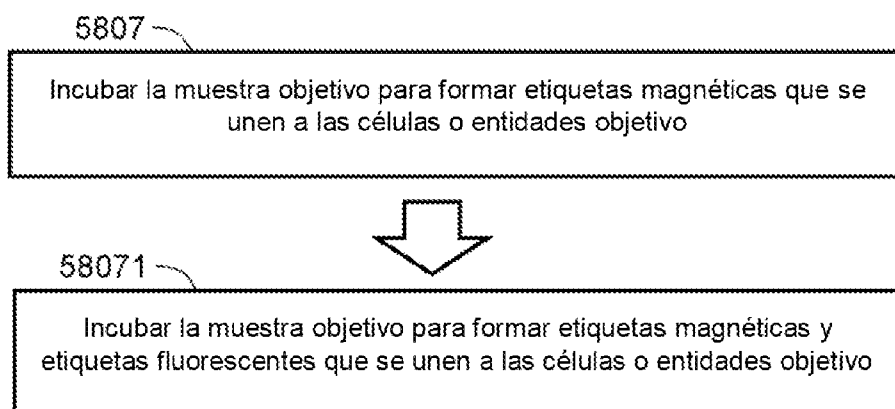


FIGURA 76B

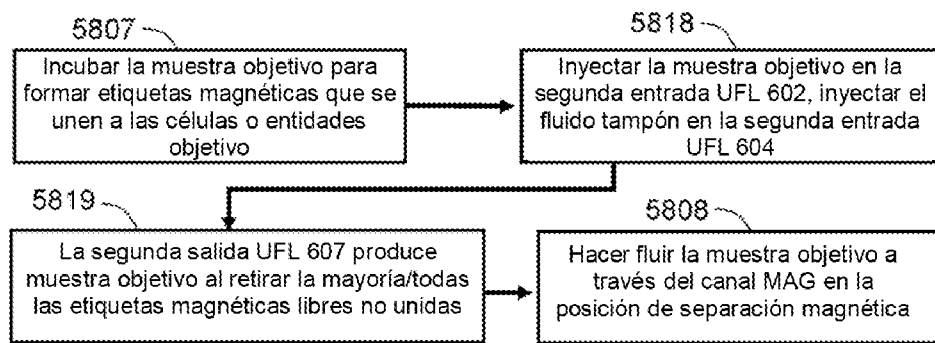


FIGURA 77A

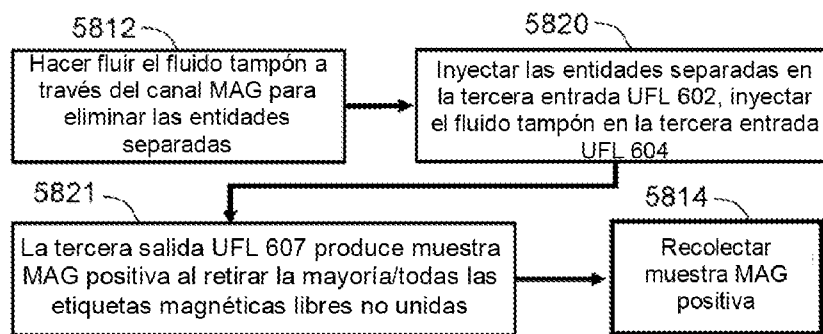


FIGURA 77B

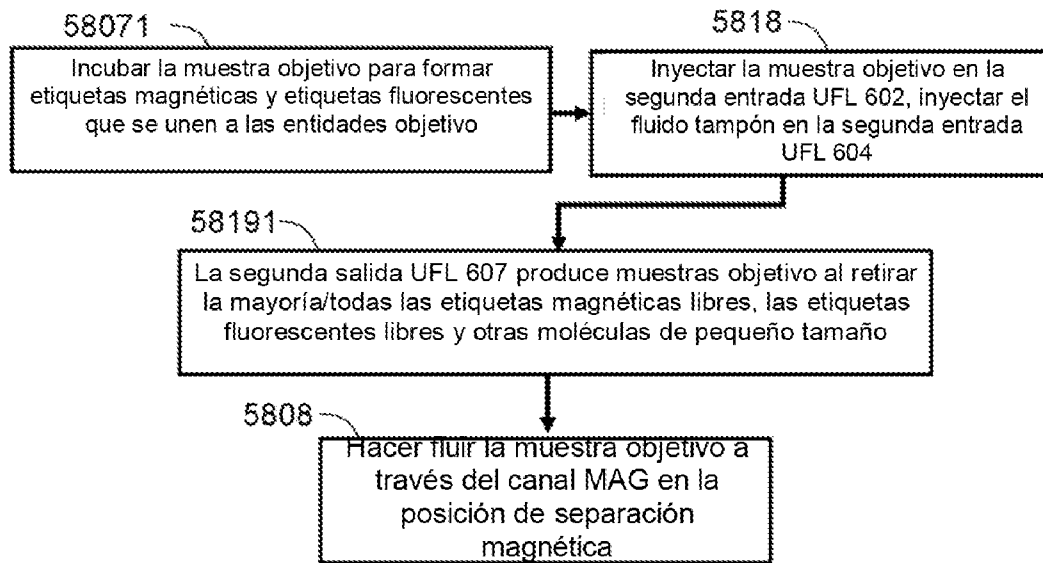


FIGURA 78A

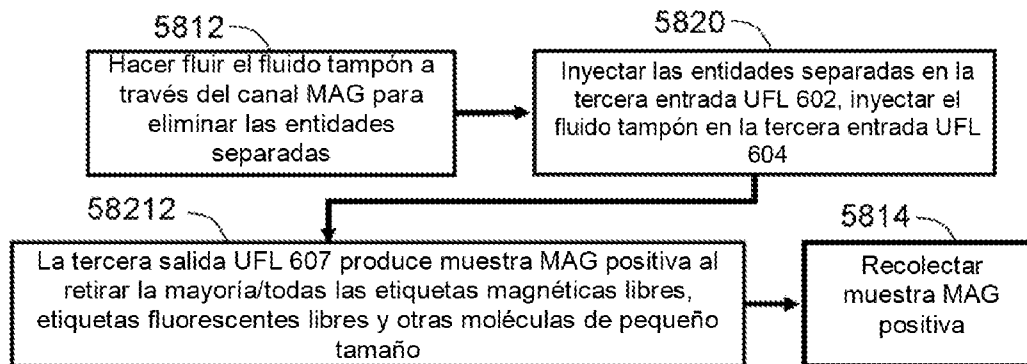


FIGURA 78B

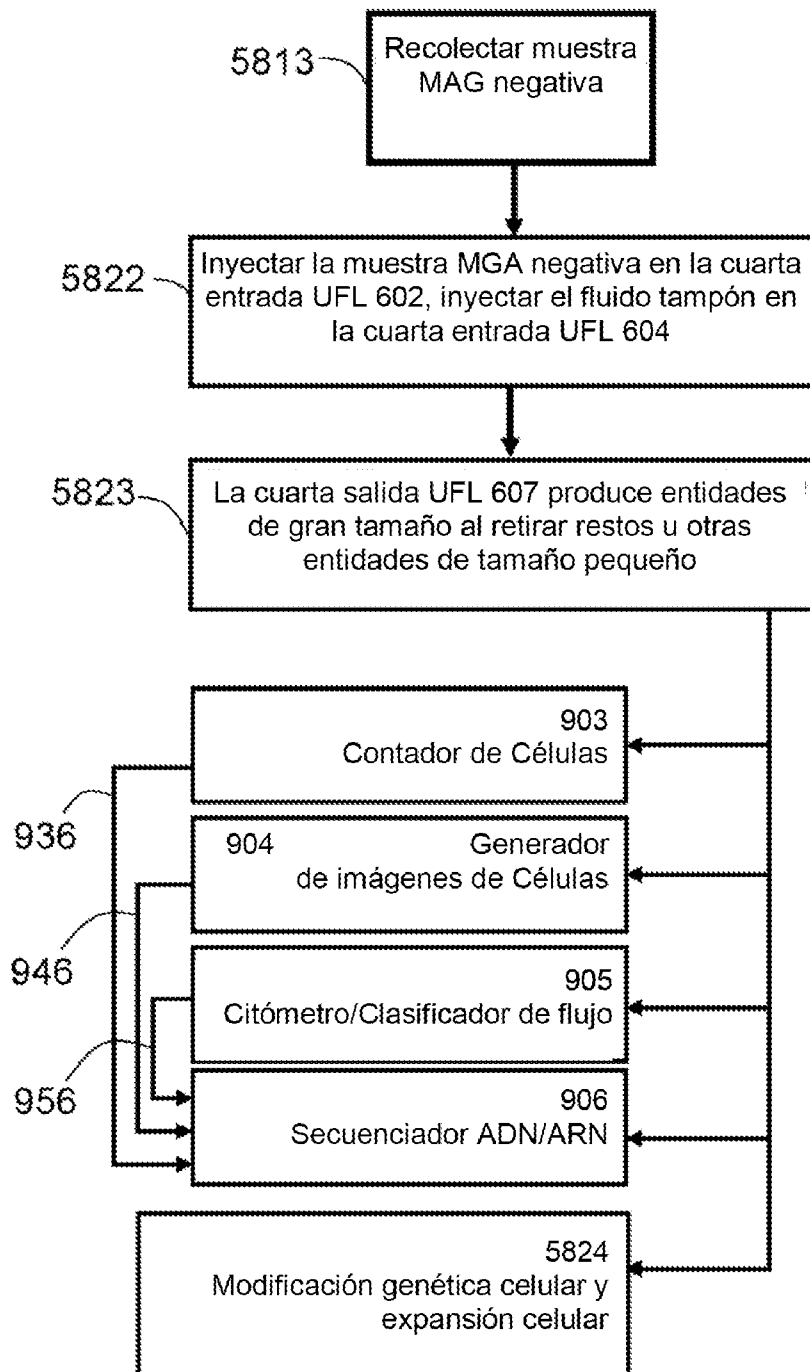


FIGURA 79

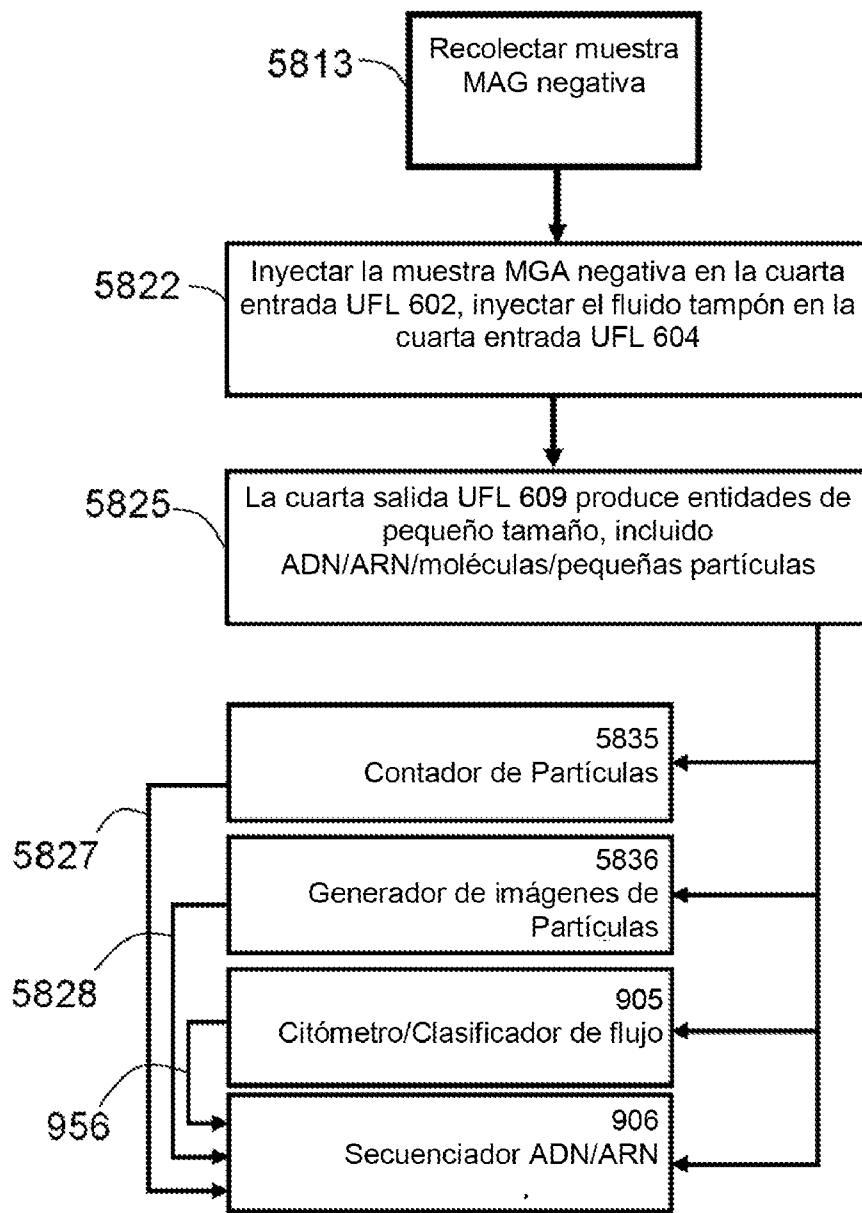


FIGURA 80

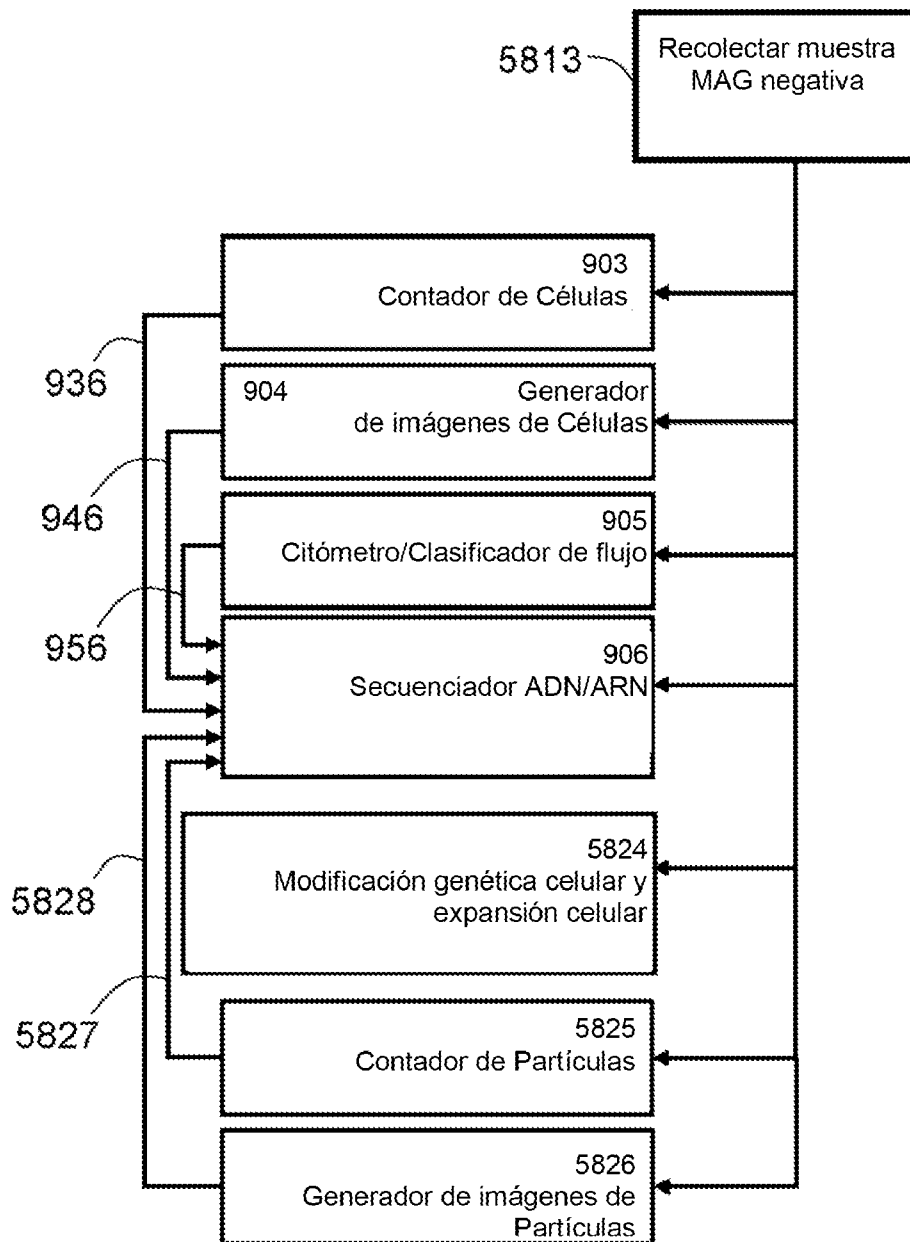


FIGURA 81

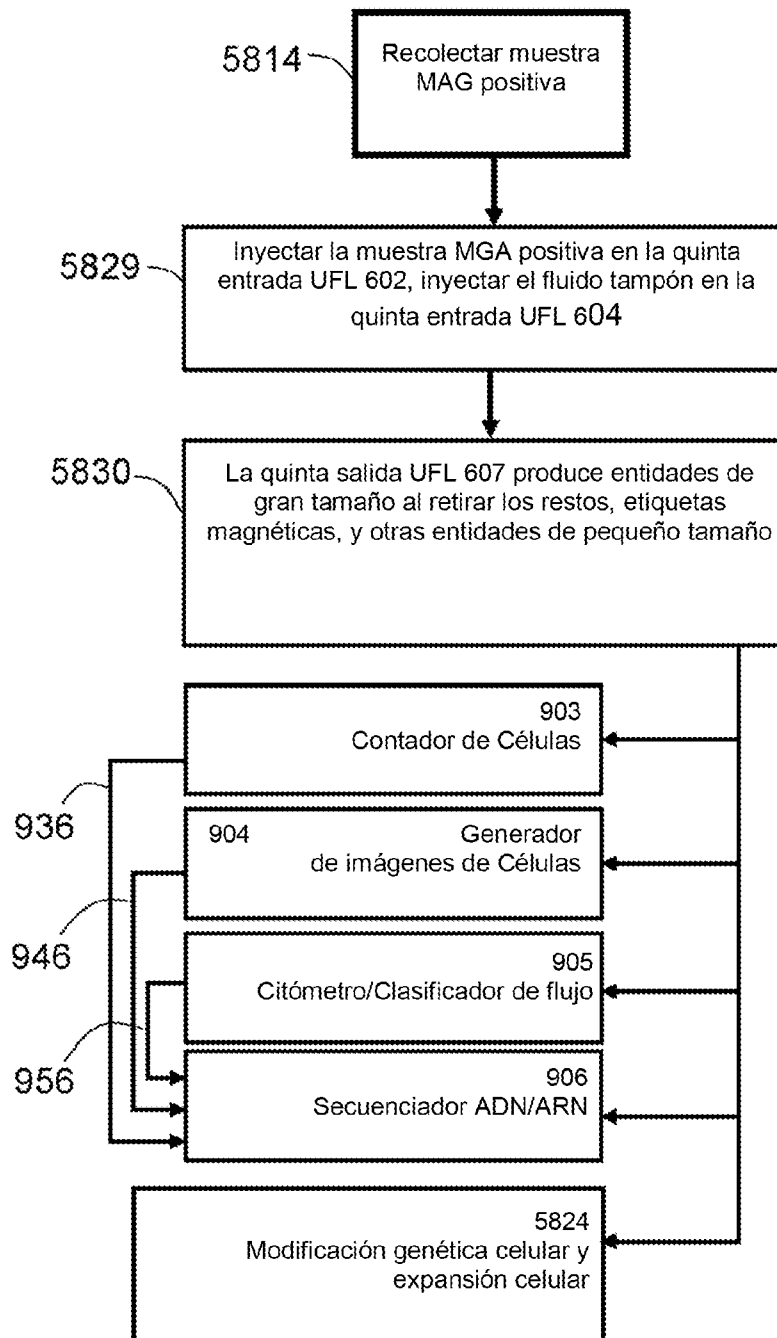


FIGURA 82

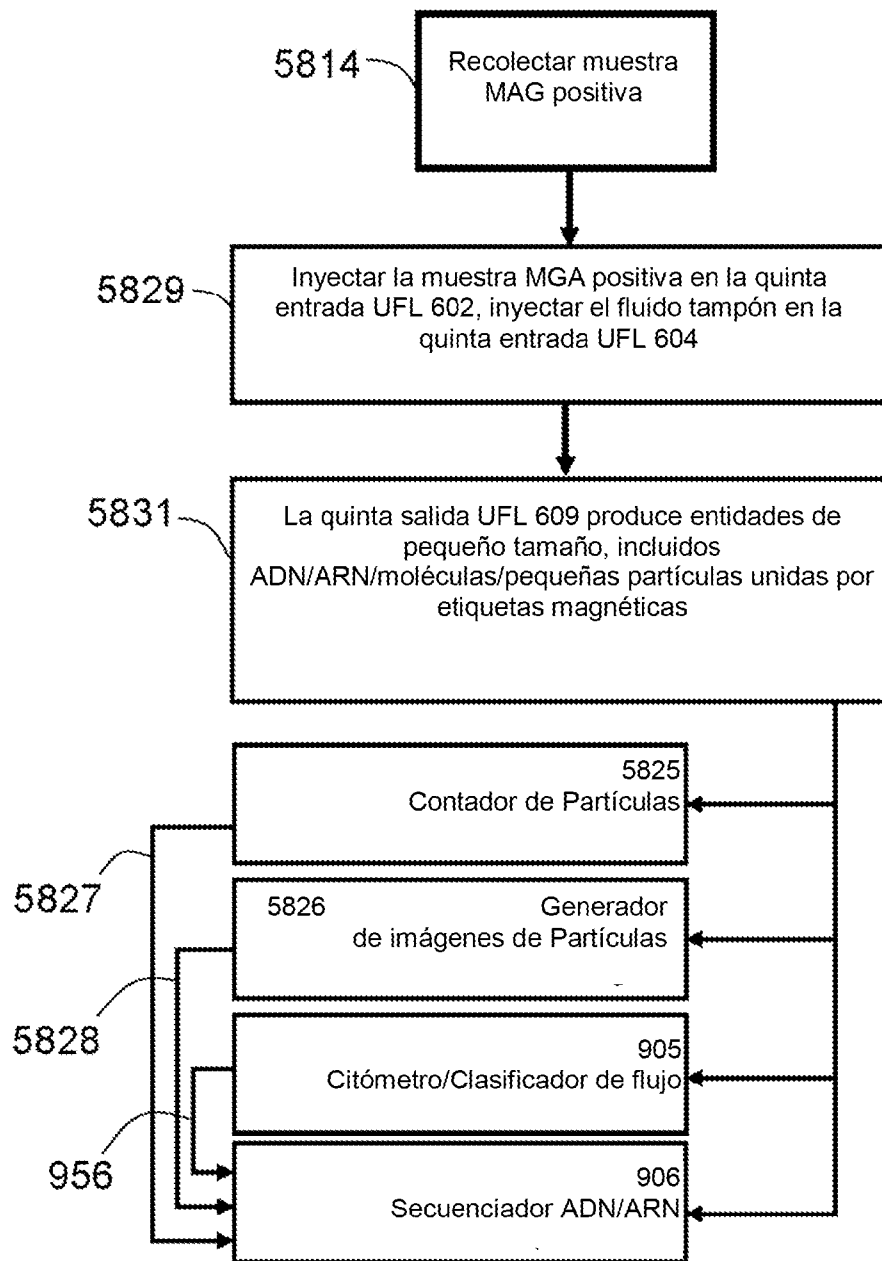


FIGURA 83

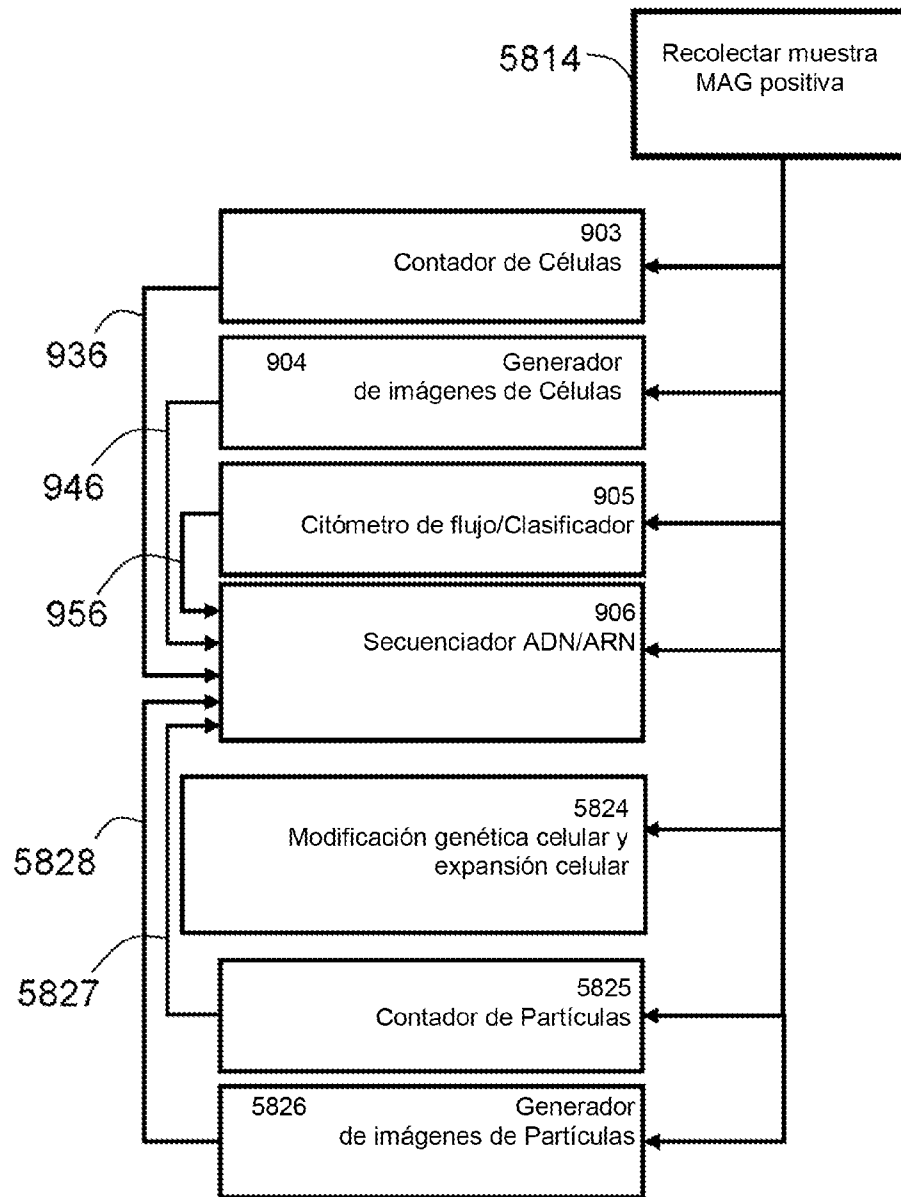


FIGURA 84

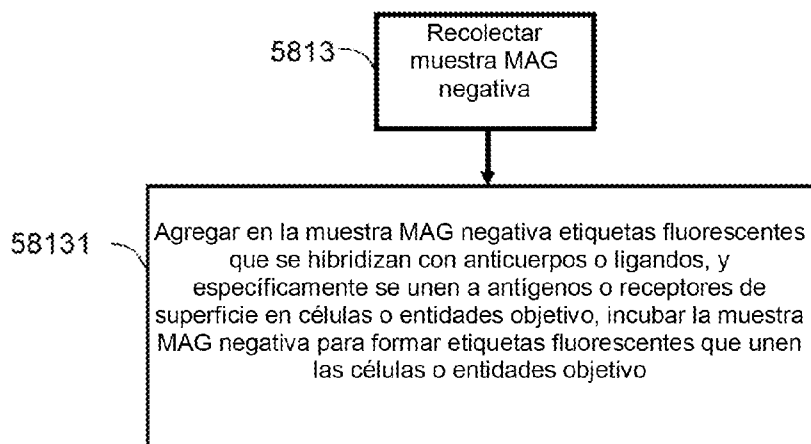


FIGURA 85A

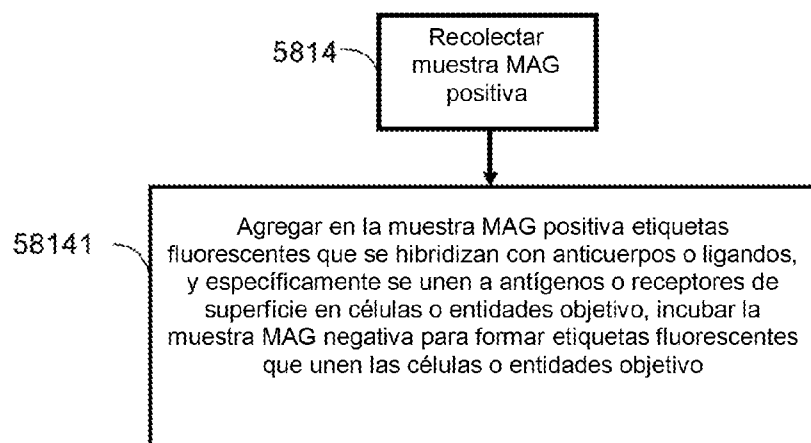


FIGURA 85B

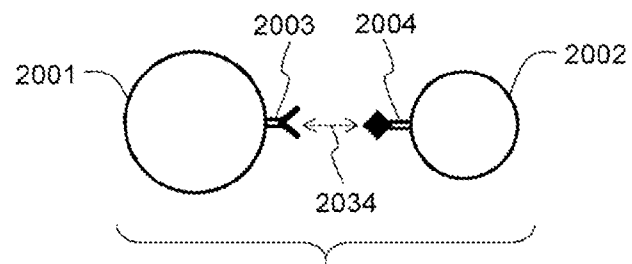


FIGURA 86A

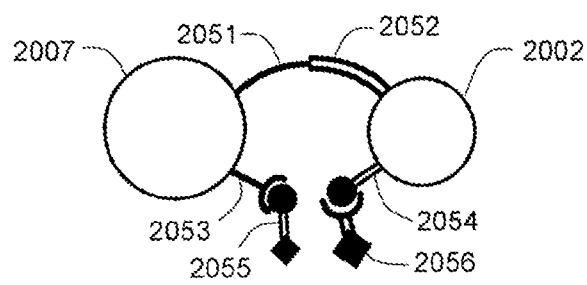


FIGURA 86B

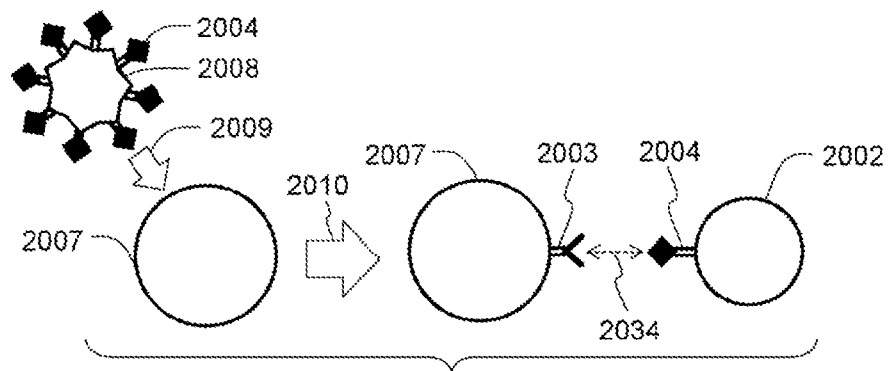


FIGURA 86C

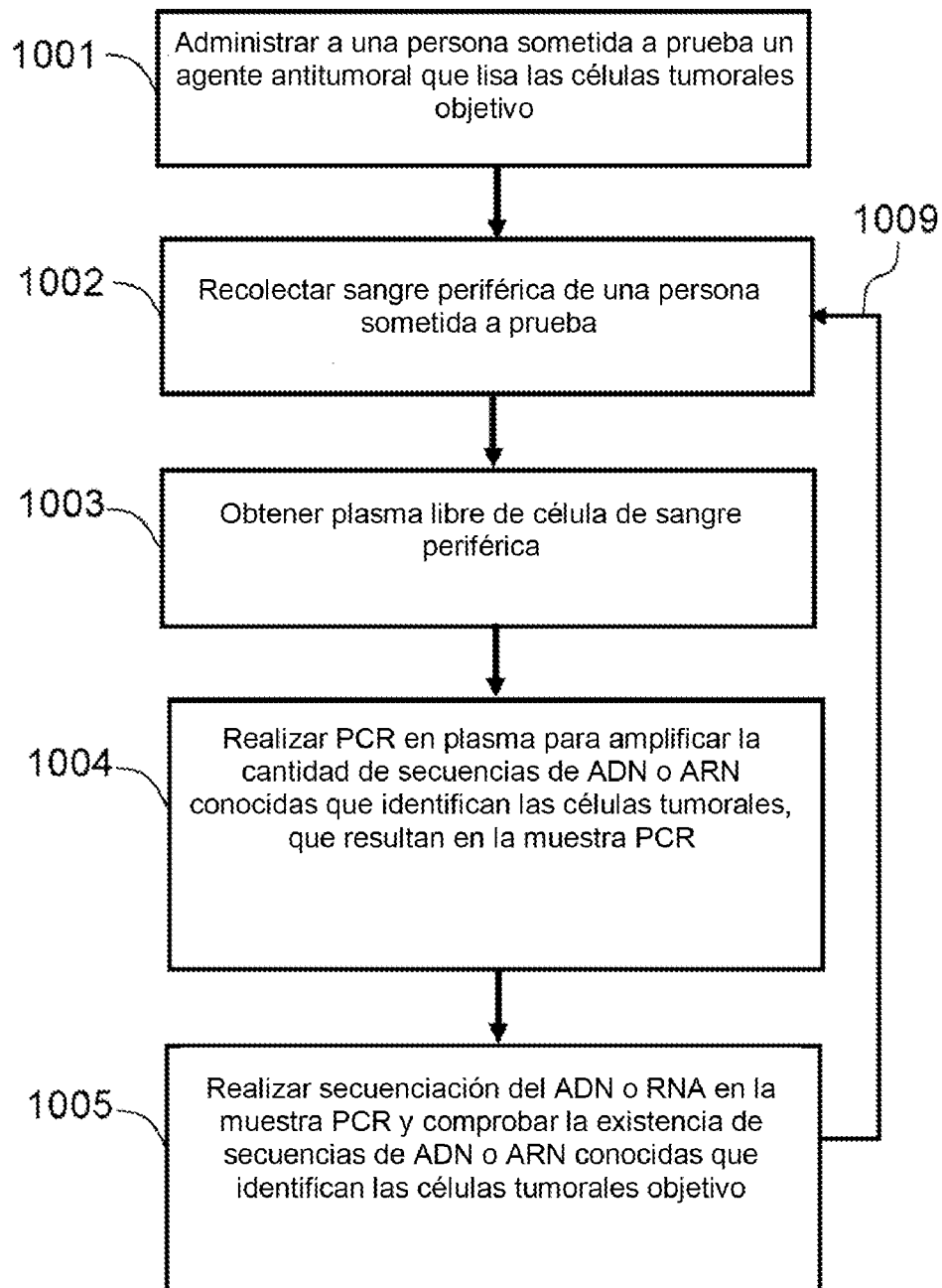


FIGURA 87

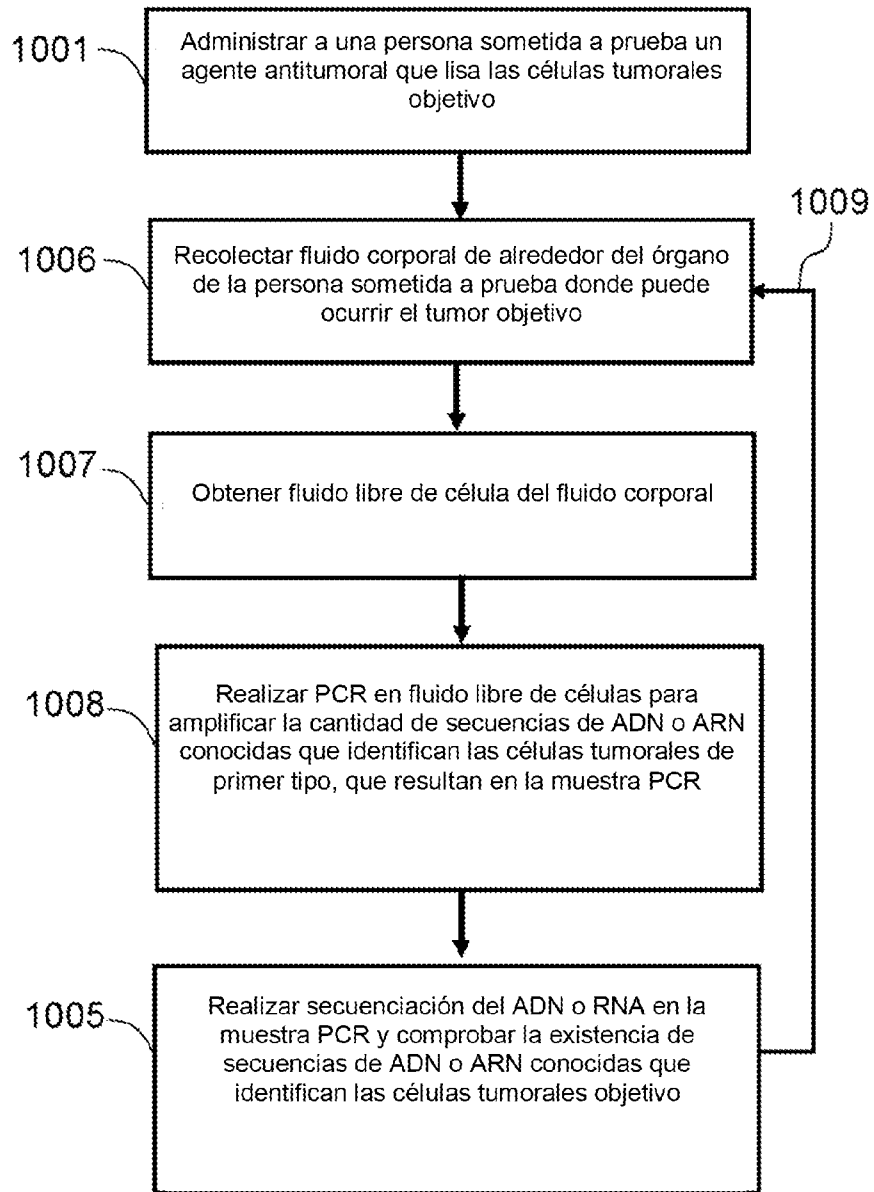


FIGURA 88

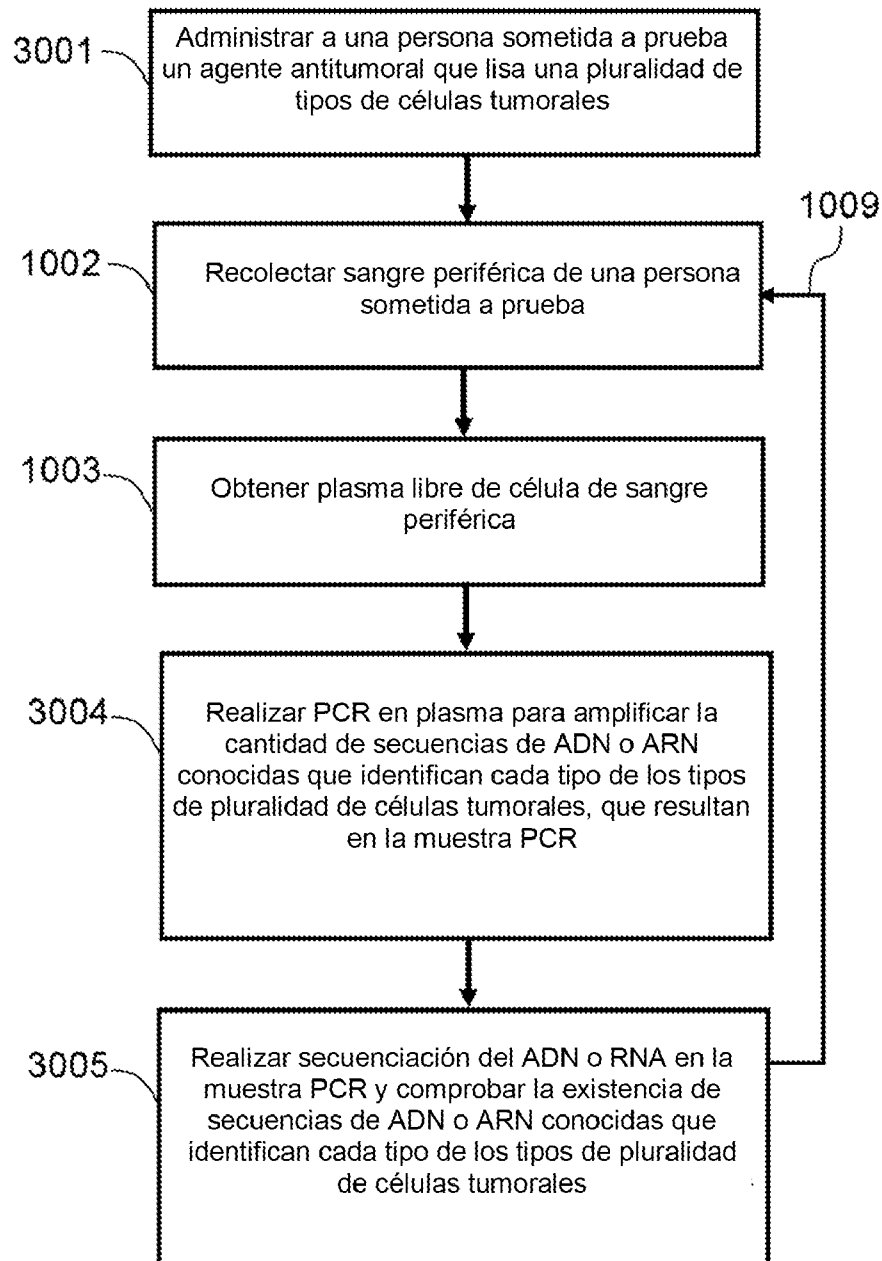
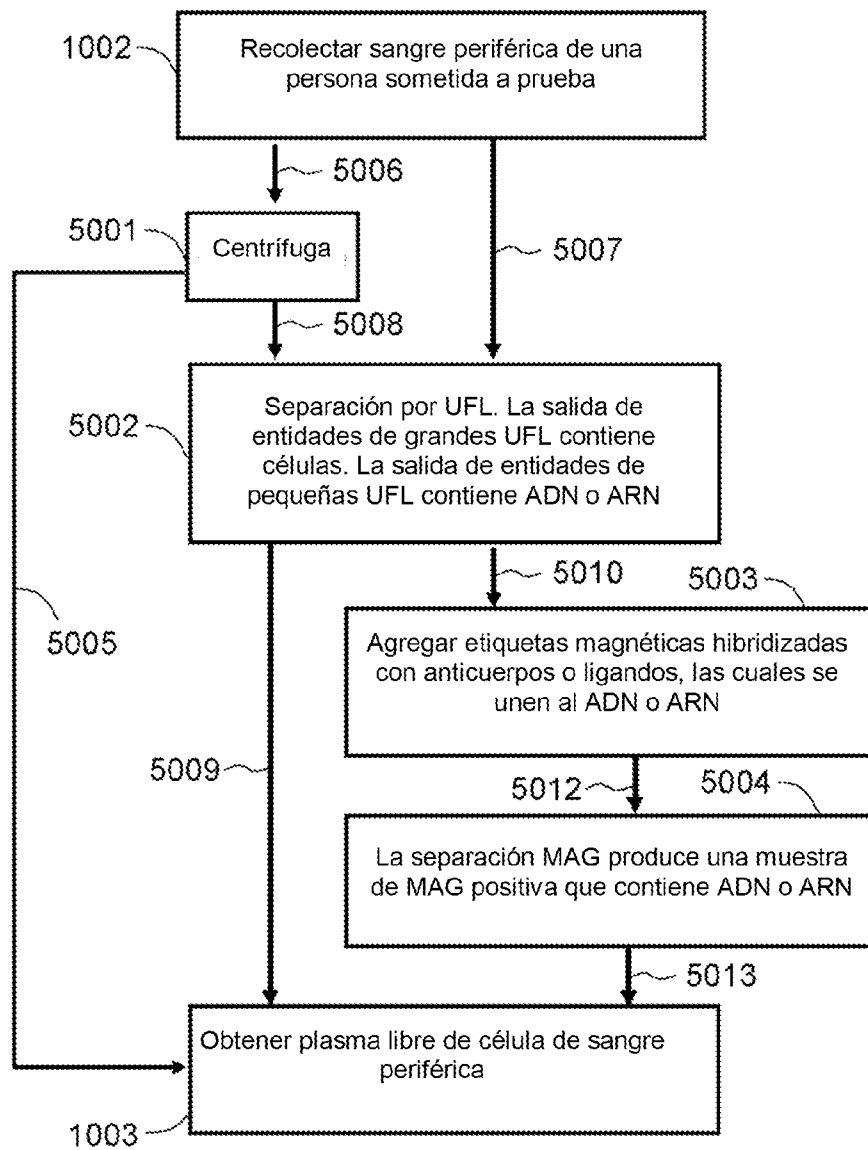


FIGURA 89

**FIGURA 90**

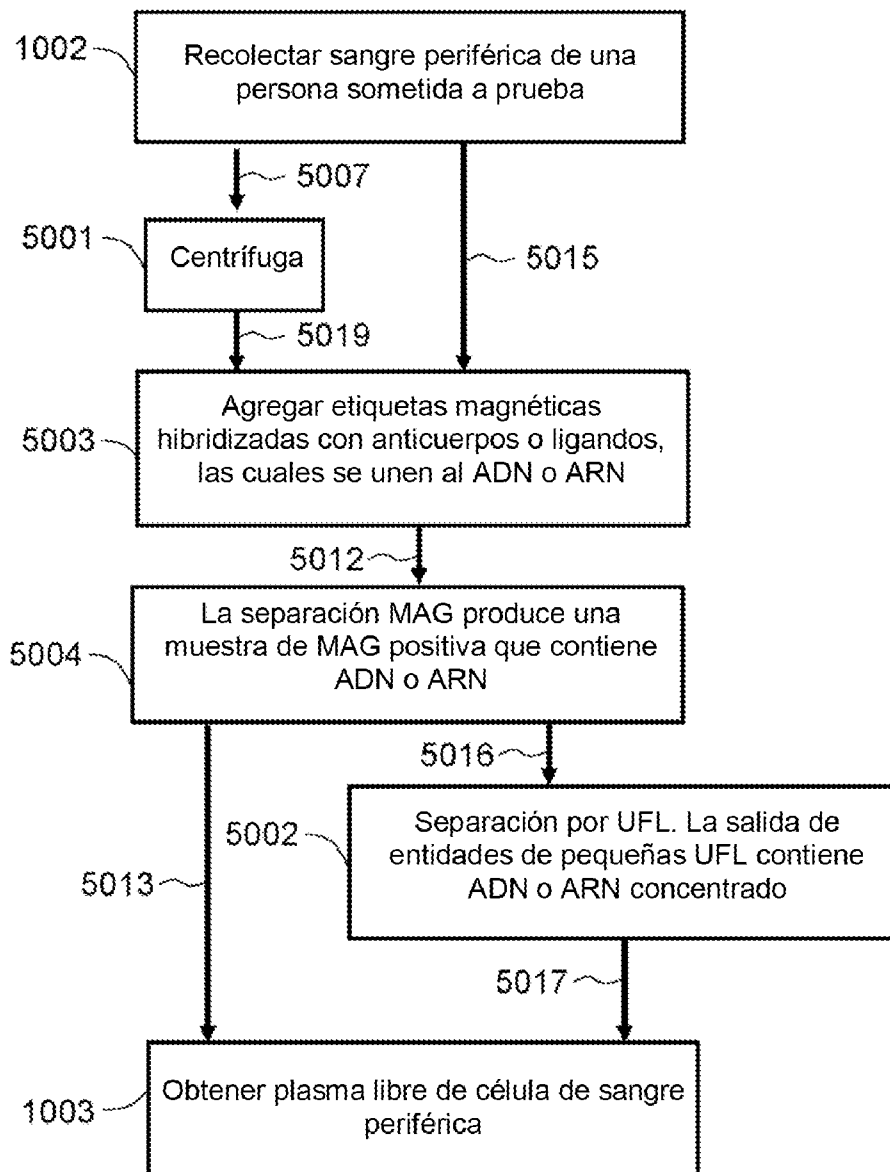


FIGURA 91

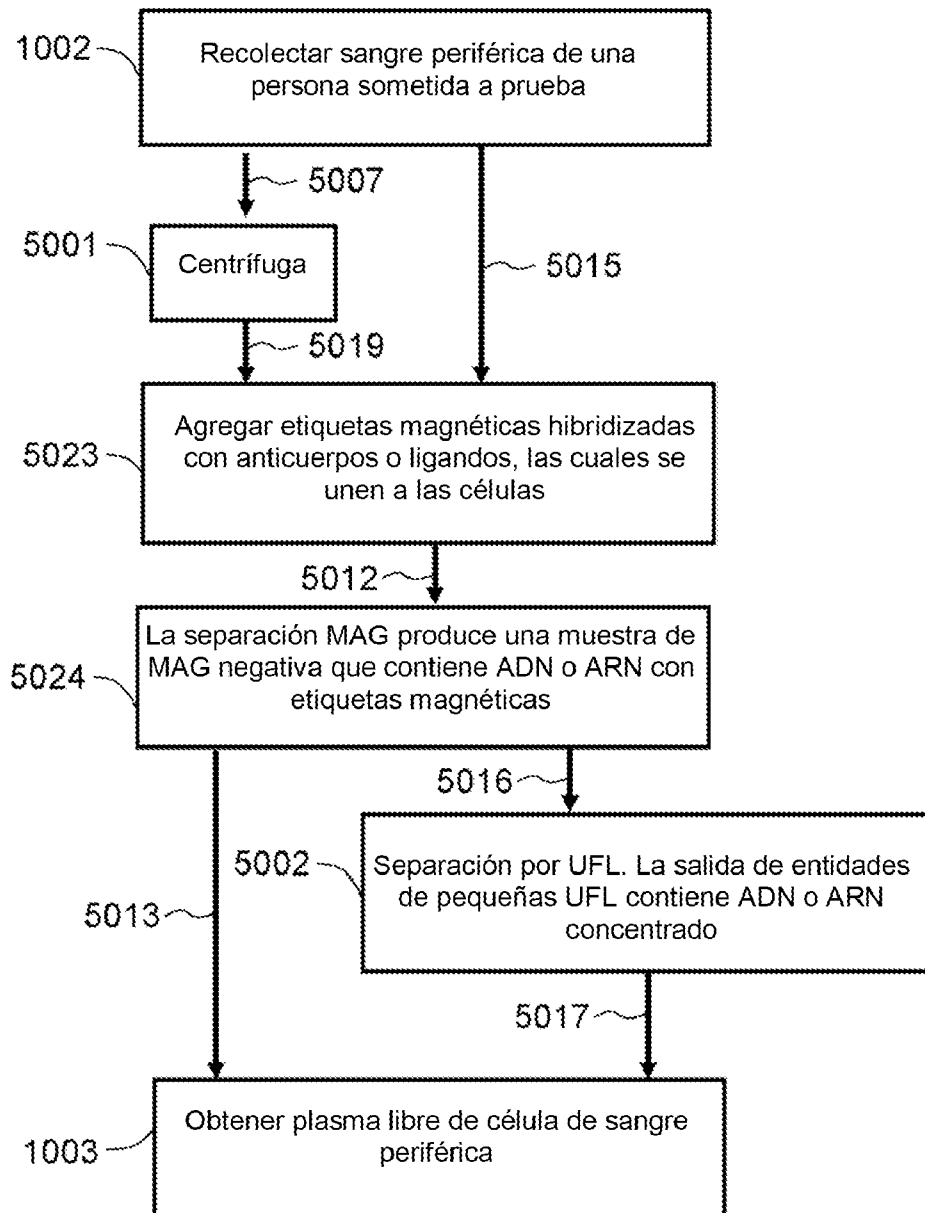


FIGURA 92

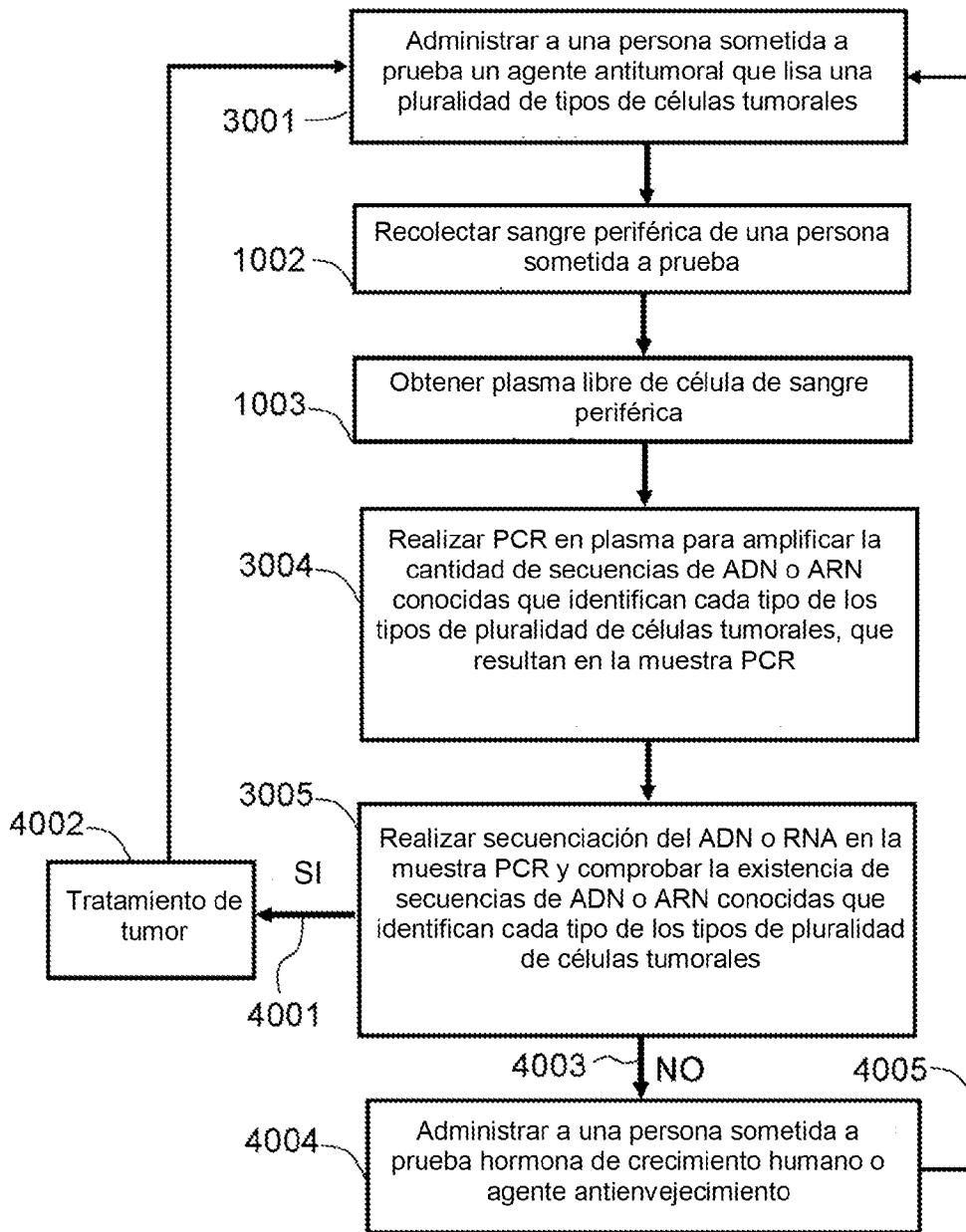


FIGURA 93