

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 989 390**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

F16K 99/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2020 PCT/EP2020/073042**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.03.2021 WO21043567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2020 E 20757895 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 4025344**

54 Título: **Dispositivo microfluídico con una unidad centrífuga integrada para el procesamiento de muestras líquidas**

30 Prioridad:

03.09.2019 DE 102019213313

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

26.11.2024

73 Titular/es:

ROBERT BOSCH GMBH (100.0%)

Postfach 30 02 20

70442 Stuttgart, DE

72 Inventor/es:

MAUCHER, TANJA;

LAERMER, FRANZ y

BOTT, HANNAH

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 989 390 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

Dispositivo microfluídico con una unidad centrífuga integrada para el procesamiento de muestras líquidas

5 La presente invención hace referencia a un dispositivo microfluídico para el procesamiento de muestras líquidas, en el que está integrado una unidad centrífuga, así como a un procedimiento para operar un dispositivo microfluídico de esa clase y a una utilización de dispositivo microfluídico con unidad centrífuga integrada.

Estado de la técnica

10 Se conocen dispositivos microfluídicos, los así llamados sistemas (LoC) de laboratorio en un chip, que reúnen toda la funcionalidad de un laboratorio macroscópico, por ejemplo, en un sustrato del tamaño de una tarjeta plástica: con los sistemas de esa clase pueden realizarse pruebas bioquímicas o microbiológicas y ensayos de forma miniaturizada y automatizada. Por ejemplo, la plataforma Vivalytic® (de la empresa Robert Bosch GmbH) ofrece una plataforma de diagnóstico universal con la que pueden realizarse distintas pruebas simples o múltiples en un cartucho.

15 En los protocolos de procesamiento convencionales a menudo se requieren etapas de centrifugación, por ejemplo en general para la separación de células o para separar componentes de la sangre no deseados, como por ejemplo eritrocitos, de una muestra de sangre completa. En los dispositivos microfluídicos, como alternativa para una etapa de centrifugación, pueden utilizarse por ejemplo filtros (por ejemplo fritas de vidrio). Los filtros de esa clase, sin embargo, no pueden reproducir en todo su alcance la función de una centrífuga. Además, los filtros de esa clase se obstruyen muy fácilmente y se vuelven inutilizables. Para evitar esos
20 problemas es habitual realizar aguas arriba o efectuar de forma externa y por separado etapas de centrifugación requeridas del procesamiento automatizado de la muestra en un dispositivo microfluídico, por ejemplo al procesar una muestra de sangre completa.

25 La solicitud EP 2 926 906A1 hace referencia a un dispositivo de válvula con al menos un medio de cierre y un componente con al menos una cavidad. El medio de cierre está proporcionado para hermetizar al menos una abertura de la cavidad. El dispositivo de válvula puede ser accionado mediante fuerzas centrífugas o fuerzas que actúan de forma similar.

30 En la solicitud DE 10 2015 203 779 A1 se describe un dispositivo para el procesamiento automatizado de líquidos. El dispositivo comprende al menos dos cuerpos que están dispuestos de forma axialmente superpuesta dentro de una estructura de manguito circundante, y que en función de una fuerza centrífuga o de una fuerza que actúa de forma similar pueden rotar uno contra otro. En los cuerpos están proporcionados al menos un recipiente de inyección de muestras y al menos un recipiente receptor para un líquido procesado.

35 Por la solicitud DE 10 2010 003 223A1 se conoce un dispositivo para la utilización en un rotor de una centrífuga. El mismo, en una carcasa, presenta dos cuerpos apilados uno sobre otro. Al rotar el rotor, una distancia de uno de los cuerpos con respecto a un eje de rotación del rotor es menor que una distancia del otro cuerpo con respecto al eje de rotación. El primer cuerpo presenta dos cavidades y el segundo cuerpo presenta una cavidad. Los dos cuerpos están dispuestos en la carcasa de forma móvil uno con respecto a otro, para, en reacción a una rotación del rotor, en una primera fase, acoplar fluidicamente la primera cavidad del primer cuerpo con la cavidad del segundo cuerpo y, en una segunda fase, acoplar fluidicamente la
40 segunda cavidad del primer cuerpo con la cavidad del segundo cuerpo.

Descripción de la invención

Ventajas de la invención

45 La presente invención proporciona un dispositivo microfluídico para el procesamiento de muestras líquidas con una unidad centrífuga, donde la unidad centrífuga está caracterizada por un bote de centrifugado y al menos una función de válvula que depende de la fuerza centrípeta. La idea central de la invención, con ello, consiste en una integración de una mini-centrífuga en un dispositivo microfluídico, en particular en un dispositivo de laboratorio en un chip. La integración de la unidad centrífuga en el dispositivo microfluídico, de manera especialmente ventajosa, permite un flujo de trabajo durante el procesamiento de muestras líquidas que comprende una etapa de centrifugación completa o eventualmente varias etapas de centrifugación. Con ello, de manera que puede automatizarse por completo, pueden procesarse por ejemplo muestras de sangre
50 completa, de manera que por ejemplo todo el material celular (células de la sangre) puede separarse de la sangre completa y puede extraerse el plasma sanguíneo libre de células. Por ejemplo, también células de la sangre determinadas, por ejemplo eritrocitos, pueden separarse mediante la unidad centrífuga dentro del

dispositivo microfluídico, por medio de lisis selectiva y centrifugación, y pueden desecharse, y el resto de las células, por ejemplo eritrocitos, pueden lisarse para la extracción de ácidos nucleicos y pueden acoplarse al sistema de canales del dispositivo microfluídico y procesarse de forma posterior. En conjunto, la unidad centrífuga que puede integrarse en el dispositivo microfluídico facilita considerablemente el procesamiento de muestras líquidas, ya que pueden suprimirse etapas de centrifugación que deben realizarse externamente, aguas arriba, y las etapas de centrifugación pueden integrarse en el procesamiento automatizable de la muestra dentro del dispositivo microfluídico.

La unidad centrífuga en particular está proporcionada para una integración en una cámara de entrada de muestras del dispositivo microfluídico. En principio, la unidad centrífuga o eventualmente varias unidades centrífugas también pueden estar integradas en otras posiciones dentro de un dispositivo microfluídico. El bote de centrifugado en particular está montado de forma giratoria entre dos capas del dispositivo, mediante un husillo, por ejemplo un husillo de metal (aguja de metal) o de plástico. En general, los dispositivos microfluídicos conforme al género están estructurados en base a dos o más capas de plástico, por ejemplo de policarbonato, de manera que la integración de la unidad centrífuga es posible sin una inversión especial. En general, una cavidad simple dentro de las capas o un soporte plástico es suficientemente estable para alojar el husillo, ya que habitualmente los periodos de funcionamiento de la unidad centrífuga en el dispositivo son comparativamente cortos.

La red microfluídica de un dispositivo microfluídico en general se realiza mediante estructuras de canal dentro de las capas, que por ejemplo se logran mediante estructuraciones de la superficie o por medio de la colocación en la superficie de elementos que otorgan una estructura. Además, en general están proporcionadas capas de recubrimiento y de sellado, así como eventualmente capas elásticas y/o neumáticas. Los dispositivos microfluídicos de esa clase, por ejemplo, pueden producirse en forma de un cartucho y estar proporcionados para un único uso o para varios usos. La integración de una unidad centrífuga según la invención, de manera conveniente, tiene lugar ya durante el ensamblado de un dispositivo microfluídico, donde la unidad centrífuga se monta y eventualmente se ajusta en la posición prevista de forma manual o por ejemplo mediante un robot industrial, antes de que tenga lugar un sellado final de las capas.

Para el giro o rotación del bote de centrifugado en particular pueden estar proporcionados un accionamiento mecánico y/o un accionamiento magnético y/o un accionamiento neumático. Por ejemplo, el accionamiento puede estar proporcionado mediante un enganche mecánico directo de un motor de accionamiento en el dispositivo microfluídico, donde para ello puede estar proporcionado un "elemento de arrastre" mecánico conformado de forma adecuada o por ejemplo un acoplamiento magnético, por ejemplo mediante imanes pequeños, entre el bote de centrifugado y un motor externo. Por ejemplo, el accionamiento también puede tener lugar con la ayuda de un campo de rotación magnético de un motor de accionamiento que, desde el exterior, actúa por ejemplo sobre un imán pequeño dentro del bote de centrifugado, moviendo el mismo como un motor síncrono. Además, por ejemplo es posible un accionamiento neumático, en donde aire comprimido actúa por ejemplo palas de turbinas o por debajo del bote de centrifugado. A menudo, para el funcionamiento habitual de un dispositivo microfluídico ya está proporcionado aire comprimido, en particular para el accionamiento de válvulas neumáticas y bombas de membrana, por ejemplo con una presión neumática de 1,5 bar. Esa presión también puede utilizarse para el accionamiento o la rotación del bote de centrifugado. Mediante palas de turbina, la velocidad del flujo de aire desde el sistema neumático puede transformarse directamente en un movimiento de rotación del bote de centrifugado.

La función de válvula que depende de la fuerza centrípeta, de la unidad centrífuga, en particular se trata de una función de válvula reversible, de modo que en función de la fuerza centrípeta actuante la válvula puede abrirse o cerrarse. La función de válvula, con ello, puede controlarse o accionarse mediante la velocidad de rotación de la unidad centrífuga.

La función de válvula que depende de la fuerza centrípeta, por ejemplo, puede estar realizada mediante un anillo de sellado. Por ejemplo, el anillo de sellado puede estar dispuesto dentro, en el área superior del bote de centrifugado. Para la separación de material celular desde una muestra, la unidad centrífuga con el líquido de muestra que se encuentra dentro, primero puede rotar por ejemplo con una primera velocidad de rotación en el rango de velocidad de rotación medio. Debido a las fuerzas centrípetas actuantes, el líquido de muestra se encuentra contra la pared del bote de centrifugado, como una columna homogénea. Puesto que los líquidos son incompresibles, la fuerza centrípeta provoca una presión sobre la masa del líquido que rota, que predomina por todas partes en el líquido y, con ello, también en la superficie de sellado del anillo de sellado (junta tórica) hacia la pared del bote de centrifugado. Hasta un cierto valor umbral de las fuerzas centrípetas actuantes, esa superficie de sellado resiste la presión que se aplica, de manera que durante un cierto periodo puede centrifugarse a la velocidad de rotación correspondiente, hasta que todos los componentes celulares se hayan depositado en la pared del bote de centrifugado. Si se alcanza ese estado, se aumenta la velocidad de rotación del bote de centrifugado, de modo que se supera el valor umbral del efecto de sellado del anillo de sellado en la superficie de sellado y el líquido liberado de componentes celulares (por ejemplo plasma sanguíneo, después de la centrifugación de una muestra de sangre completa), se presiona mediante la

superficie de sellado, entre el anillo de sellado y la pared interna del bote, y abandona el bote de centrifugado. El líquido después puede acoplarse a canales correspondientes del dispositivo microfluídico.

5 En otra forma de ejecución especialmente preferente de la función de válvula que depende de la fuerza centrípeta, en el bote de centrifugado están proporcionadas aberturas que, mediante un anillo de sellado que rodea exteriormente el bote de centrifugado, se cierran de forma reversible o se liberan en función de la fuerza centrípeta actuante. De manera conveniente en esta configuración, el bote de centrifugado, en el área superior, presenta un reborde que se proyecta hacia el interior, que evita que el líquido se escape arriba, desde el bote de centrifugado, al rotar el bote de centrifugado. Al aumentar las fuerzas centrípetas, el anillo de sellado se estira desde la superficie de sellado, de manera que la fuerza de sellado se reduce en la superficie externa del bote de centrifugado. En este contexto, es ventajoso un material relativamente blando para el anillo de sellado, que pueda estirarse con facilidad debido al efecto de la fuerza centrípeta. De manera alternativa, por ejemplo, pueden utilizarse tapas de válvula elásticas que se abren o esferas (válvulas de bisagras o válvulas esféricas) que son abiertas por la fuerza centrípeta actuante a partir de una velocidad de rotación determinada del bote de centrifugado.

15 En otra configuración especialmente preferente, la función de válvula se forma mediante al menos una abertura en la pared del bote de centrifugado, en donde está dispuesto de forma móvil un perno que atraviesa la pared del bote de centrifugado. Por fuera del bote de centrifugado, el perno está provisto de una cabeza del perno y de un anillo de sellado dispuesto por debajo de la cabeza del perno, de modo que debido a ello la abertura está cerrada en caso de que falte fuerza centrípeta o eventualmente ésta sea reducida. Dentro del bote de centrifugado, el perno es mantenido en una posición de sellado mediante un resorte de compresión asegurado (resorte de recuperación). La fuerza de resorte está regulada de manera que se proporciona la posición de sellado por debajo de una fuerza centrípeta predeterminable. Tan pronto como la fuerza centrípeta supera un valor umbral determinado, la cabeza del perno se aleja de la abertura en la pared del bote de centrifugado, de modo que se abandona la posición de sellado y puede salir líquido desde el bote de centrifugado.

El aseguramiento del resorte de compresión por ejemplo puede estar realizado mediante una contratuerca que está colocada sobre un roscado del perno (roscado de tornillo) en el interior del bote de centrifugado. El valor umbral para la velocidad de rotación, así como para la fuerza centrípeta, a partir de la que tiene lugar una apertura de la válvula o de las válvulas, en particular se determina mediante la masa del perno y eventualmente de la contratuerca. Además, el valor umbral se determina mediante la fuerza elástica del resorte de compresión y mediante la posición de la contratuerca en el roscado del perno, que influye en la pretensión del resorte de compresión, así como del resorte de recuperación. En este sentido, mediante la posición de la contratuerca puede regularse la fuerza de retención del resorte. Mediante la selección de pernos correspondientes (o tornillos) y contratuercas, o de sus masas, así como de resortes más o menos rígidos y de la regulación correspondiente (posicionamiento) de la contratuerca en el roscado, puede lograrse una regulación precisa de la función de válvula en función de la fuerza centrípeta actuante. Por ejemplo, si están proporcionadas varias válvulas de esa clase en un bote de centrifugado, por ejemplo tres válvulas, puede regularse con precisión, de modo que todas las válvulas se abran y cierren nuevamente a exactamente la misma velocidad de rotación deseada. Como componentes para la construcción de válvulas son adecuados en particular materiales biocompatibles, por ejemplo acero fino o acero inoxidable, plásticos o titanio.

En el caso de una rotación por debajo de la velocidad de rotación de valor umbral tiene lugar una centrifugación del material de muestras dentro del bote de centrifugado. En caso de superarse la velocidad de rotación de valor umbral se activa la función de válvula y puede tener lugar de forma controlada un pasaje bien definido y rápido del líquido centrifugado hacia la red microfluídica del dispositivo.

De la respectiva clase de la configuración de la función de válvula resulta la variable de valor umbral de la fuerza centrípeta, en la que se activa la función de válvula, así como al superarse el mismo la válvula se abre y en el caso de un valor inferior la válvula se cierra nuevamente, en el caso de una función de válvula reversible. De ello resulta la fuerza centrípeta, en base a la aceleración centrípeta y a la masa. Por ejemplo, la función de válvula puede estar configurada de manera que la válvula se abra en el caso de una aceleración centrípeta de aproximadamente 400 – 500 g. En el caso de un diámetro interno del bote de centrifugado de por ejemplo 8 mm y una película de líquido en el bote de centrifugado de aproximadamente un grosor de 1 mm, esto correspondería a aproximadamente 10.000 U/min. La función de válvula también puede estar configurada de manera que se requieran aceleraciones centrípetas más elevadas para la apertura de la válvula, por ejemplo de 3.500 - 4.000 g (en el caso del diámetro interno antes mencionado corresponde a aproximadamente 30.000 U/min) o aproximadamente 4.500 - 5.000 g (en el caso del diámetro interno antes mencionado corresponde aproximadamente a 35.000 U/min).

En otra configuración de la unidad centrífuga, la función de válvula es una función de válvula irreversible, donde preferentemente la función de válvula irreversible está proporcionada adicionalmente con respecto a

una función de válvula reversible. La función de válvula irreversible, por ejemplo, puede estar realizada mediante una lámina y/o un tapón o un elemento similar que cierre una o varias aberturas en la pared del bote de centrifugado. A partir de una fuerza centrípeta determinada se abre la lámina o se separa el tapón, de manera que la abertura se libera para un pasaje de líquido. Esa función de válvula irreversible en particular es ventajosa para una transferencia de líquido completa y con la menor pérdida posible, de manera que por ejemplo el bote de centrifugado pueda vaciarse por completo y de forma rápida. Si está prevista tanto una función de válvula reversible como también una irreversible, la función de válvula irreversible preferentemente se activa a una fuerza centrípeta más elevada que la función de válvula reversible. De este modo, por ejemplo, la función de válvula reversible puede preverse para un lavado repetido del bote de centrifugado (por ejemplo en el caso de una velocidad de rotación de valor umbral de 10.000 U/min) y la función de válvula irreversible puede utilizarse en el caso de una velocidad de rotación muy elevada, por ejemplo en el caso de 30.000 o 35.000 U/min para un vaciado completo final del bote de centrifugado.

En otra configuración preferente de la unidad centrífuga, la superficie interna del bote de centrifugado, al menos parcialmente, está provista de estructuras de superficie para la adhesión de componentes de muestras. Mediante rugosidades de esa clase o nanoestructuras, o por ejemplo cavidades realizadas de forma específica en la pared interna del bote de centrifugado, puede favorecerse más una adhesión adicional de por ejemplo células o componentes de la muestra en la superficie interna del bote de centrifugado, de modo que puede mejorarse más la eficacia de separación de la etapa de centrifugación.

El bote de centrifugado, preferentemente junto con el dispositivo microfluídico o cartucho de laboratorio en un chip, durante el procesamiento, preferentemente está orientado con un ángulo de basculamiento determinado, por ejemplo en un ángulo de basculamiento de entre 10 y 50°, preferentemente de aproximadamente 30°. Un ángulo de basculamiento de esa clase simplifica el pasaje de líquido desde el bote de centrifugado hacia la red fluidica del cartucho de laboratorio en un chip. Para ello, el propio bote de centrifugado puede estar dispuesto con el ángulo de basculamiento con respecto al dispositivo microfluídico. En otras formas de ejecución especialmente preferentes, el propio dispositivo microfluídico dentro de un aparato de procesamiento se orienta con un ángulo de basculamiento correspondiente. Lo mencionado ofrece la ventaja de que también el otro transporte de líquido dentro del dispositivo microfluídico puede favorecerse mediante el efecto de gravedad actuante.

Si la unidad centrífuga está integrada en una cámara de entrada de muestras del dispositivo, la etapa de centrifugación puede realizarse como primera etapa en el procesamiento de la muestra. Dependiendo del desarrollo deseado del procesamiento que debe realizarse, sin embargo, también es completamente posible integrar la unidad centrífuga, de manera alternativa o adicional, en otro lugar en el dispositivo. La integración de la unidad centrífuga en el dispositivo y la otra configuración de la red fluidica del dispositivo está configurada de manera que el líquido obtenido debido a la centrifugación, desde el bote de centrifugado, puede acoplarse en la red fluidica del dispositivo del modo deseado y requerido. Además, preferentemente se prevé que la posición de integración de la unidad centrífuga, por tanto, por ejemplo la cámara de entrada de muestras, presente un acceso fluidico, mediante el cual puedan introducirse líquidos en el dispositivo, independientemente de la unidad centrífuga, por tanto, sin pasar por el bote de centrifugado. De este modo, por ejemplo, puede efectuarse un proceso de lavado de la unidad centrífuga. Además, preferentemente se prevé que la unidad centrífuga, por ejemplo después de una centrifugación, se lave con otro líquido y, con ello, el bote de centrifugado pueda llenarse nuevamente, por ejemplo para poder efectuar varias etapas de lavado de la propia unidad centrífuga.

También la unidad centrífuga está dimensionada de forma correspondiente, adaptada a las dimensiones del dispositivo microfluídico. Para dispositivos microfluídicos comunes en el mercado, por ejemplo, pueden utilizarse unidades centrífugas cuyo bote de centrifugado presenta un diámetro y/o una altura de unos 5 a 20 mm, preferentemente de unos 5 a 15 mm, por ejemplo un diámetro externo de unos 10 mm y un diámetro interno de unos 8 mm. Dependiendo de la clase y del dimensionamiento del propio dispositivo microfluídico y del caso de aplicación son posibles adaptaciones de las dimensiones de la unidad centrífuga.

La invención comprende además un procedimiento para operar las unidades centrífugas descritas dentro de un dispositivo microfluídico, donde después de una introducción de la muestra en el bote de centrifugado de la unidad centrífuga, en una primera fase, el bote de centrifugado se rota con una primera velocidad de rotación. En una segunda fase subsiguiente, el bote de centrifugado se rota con una segunda velocidad de rotación aumentada, donde mediante la velocidad de rotación aumentada se acciona al menos una función de válvula que depende de la fuerza centrípeta, de la unidad centrífuga. Las fases pueden repetirse, por ejemplo para efectuar procesos de lavado. Además, puede preverse que estén proporcionadas otras funciones de válvula en la unidad centrífuga, que por ejemplo pueden activarse en el caso de una velocidad de rotación más aumentada. Por ejemplo, al procedimiento se puede agregar una tercera fase en la que se rota con una tercera velocidad más aumentada, que conduce a la activación de por ejemplo una función de válvula irreversible, con la que el bote de centrifugado puede vaciarse de forma rápida y completa.

- En el procedimiento preferentemente se prevé que el bote de centrifugado se lave una o varias veces con líquido nuevo. Mediante la nueva introducción específica de líquido(s) pueden efectuarse distintos procesos en el bote de centrifugado, de forma automatizada. Por ejemplo, pueden tener lugar procesos de lavado simples o múltiples. Además, mediante una selección correspondiente del medio que debe introducirse, así como del líquido, por ejemplo pueden iniciarse procesos de lisis u otros procesos en el bote de centrifugado, por ejemplo para desintegrar células y/o iniciar procesos enzimáticos determinados. A continuación, los componentes de la muestra dentro del bote de centrifugado pueden separarse mediante centrifugación y el líquido sobrenadante, de manera controlada por la velocidad de rotación, puede separarse desde el bote de centrifugado y desecharse o acoplarse al sistema de canales del dispositivo para un procesamiento posterior.
- Por último, la invención comprende la utilización del dispositivo microfluídico descrito en el que está integrado al menos una unidad centrífuga según la descripción anterior, donde el dispositivo se utiliza para la separación de componentes celulares de una muestra y/o para la lisis de componentes celulares y/o para el aislamiento selectivo de componentes celulares determinados y/o de sus lisados. Por ejemplo, con la ayuda del dispositivo descrito puede separarse material celular desde una muestra de sangre completa y puede obtenerse el plasma sanguíneo libre de células y utilizarse de forma posterior. Además, el dispositivo puede utilizarse para separar por ejemplo eritrocitos desde una muestra de sangre completa, para a continuación aislar las células restantes, por ejemplo leucocitos, y eventualmente procesarlas de forma posterior. A continuación, por ejemplo, los leucocitos pueden lisarse y pueden extraerse sus ácidos nucleicos.
- Otras características y ventajas de la invención resultan de la siguiente descripción de ejemplos de ejecución preferentes, en combinación con los dibujos. De este modo, las características individuales pueden realizarse respectivamente en sí mismas o en combinación de unas con otras.

En los dibujos muestran:

- Figura 1 una representación en sección esquemática de una parte de un dispositivo microfluídico con unidad centrífuga integrada, según una primera forma de ejecución;
- Figura 2 una representación en sección esquemática de la forma de ejecución de la Figura 1 para ilustrar un proceso de lavado;
- Figura 3 una representación en sección esquemática de otra forma de ejecución de una unidad centrífuga;
- Figura 4 una vista superior esquemática de una unidad centrífuga en otra forma de ejecución preferente, y
- Figura 5 una representación en sección esquemática de otra forma de ejecución preferente de una unidad centrífuga con funciones de válvula reversibles e irreversibles.

Descripción de ejemplos de ejecución

- La Figura 1, de manera esquemática, muestra la integración de la unidad centrífuga con el bote de centrifugado 10 dentro de una cámara de entrada de muestras 101 de un dispositivo microfluídico 100. El bote de centrifugado 10, mediante un husillo 11, que preferentemente puede estar fabricado de metal o por ejemplo también de plástico, está montado de forma giratoria entre una capa de sellado inferior 102 y una capa fluidica 103, que otorga estructura, del dispositivo. La capa de sellado 102 y la capa fluidica 103, por ejemplo, están realizadas de policarbonato. El husillo 11 se introduce en cavidades correspondientes o contra-apoyos de las capas 102 y 103. En esta forma de ejecución, el bote de centrifugado 10, en el área superior, está cerrado en el interior por un anillo de sellado (junta tórica) 12. Ese anillo de sellado 12 realiza una función de válvula que depende de la fuerza centrípeta. El líquido 1 dentro del bote de centrifugado 10 rota junto con el bote de centrifugado 10. El líquido 1, por ejemplo, puede ser una muestra de sangre que previamente, mediante la abertura de entrada de muestras 104, ha sido introducida en la dirección de la flecha, directamente en el bote de centrifugado 10. El accionamiento propiamente dicho para la rotación del bote de centrifugado 10 puede tener lugar de distintas formas, por ejemplo mediante un enganche mecánico directo de un motor de accionamiento, por medio de "elementos de arrastre" mecánicos, mediante un acoplamiento magnético, un campo de rotación magnético o de forma neumática.
- Durante el funcionamiento, el bote de centrifugado 10, de manera preferente, está dispuesto con un ángulo de basculamiento determinado, preferentemente con un ángulo de basculamiento de aproximadamente 30°. Ese ángulo de basculamiento, por ejemplo, puede realizarse de manera que todo el dispositivo microfluídico 100, en un aparato de procesamiento, esté posicionado en un ángulo correspondiente. La rotación del bote de centrifugado 10 provoca fuerzas centrípetas, de manera que a la muestra líquida 1, en la pared del bote de

centrifugado 10, se aplica una cierta presión. Hasta un cierto valor umbral, la superficie de sellado entre el anillo de sellado 12 y la pared del bote de centrifugado 10 resiste la presión que se aplica, de manera que durante un cierto tiempo puede centrifugarse con la velocidad de rotación correspondiente, por ejemplo hasta que los componentes celulares se hayan depositado contra la pared del bote de centrifugado 10. Si se alcanza ese estado, se aumenta la velocidad de rotación del bote de centrifugado 10, de modo que se supera la presión umbral en la superficie de sellado y el líquido liberado de componentes celulares (por ejemplo plasma sanguíneo después de la centrifugación de una muestra de sangre completa), se presiona mediante la superficie de sellado, entre el anillo de sellado 12 y la pared interna del bote de centrifugado 10. El líquido obtenido debido a la centrifugación, por tanto, por ejemplo el plasma, se expulsa hacia la cámara de entrada de muestras 101 y, mediante una salida de la cámara de muestras 105, puede acoplarse a la red fluidica del dispositivo microfluidico 100. Eventualmente puede preverse una acumulación del líquido delante de la salida 105.

Por debajo del bote de centrifugado 10, en la cámara de entrada de muestras 101 desemboca otro acceso fluidico 106, por ejemplo con el área en la que se expulsa el líquido obtenido debido a la centrifugación, y/o la salida de la cámara de muestras 105 y/o el propio bote de centrifugado 10 se lava con un medio adecuado y/o se limpian como se ilustra en la Figura 2. Mediante el acceso fluidico 106, otro líquido 2 se introduce desde abajo en la cámara de entrada de muestras 101. El nivel de líquido, del líquido 2, en la cámara de entrada de muestras 101 puede superar el borde del bote de centrifugado 10 que se sitúa más bajo, de manera que el líquido 2 penetra en el bote de centrifugado 10 y se llena nuevamente. El grado del llenado del bote de centrifugado 10 puede controlarse mediante la cantidad de líquido 2 suministrada. La inclinación en 30° del bote de centrifugado 10, en este caso, es especialmente conveniente, ya que mediante esa inclinación el líquido 2 pasa a un punto definido en el bote de centrifugado 10, de manera que por ejemplo puede evitarse que el bote de centrifugado 10 se llene con demasiado líquido. El líquido 2, a continuación, puede centrifugarse nuevamente desde el bote de centrifugado 10 para un proceso de lavado. El ciclo de llenado y centrifugado (lavado) puede repetirse varias veces de forma consecutiva, donde en función del caso de aplicación los líquidos separados por centrifugación respectivamente por completo o de forma parcial pueden procesarse posteriormente en el dispositivo microfluidico o, sin embargo, pueden desecharse.

La Figura 3 muestra otra forma de ejecución especialmente preferente de una función de válvula que depende de la fuerza centrípeta. En este caso está proporcionado un anillo de sellado 22 circunferencial externo en el área superior del bote de centrifugado 20, que cierra aberturas en la pared del bote de centrifugado 20. El bote de centrifugado 20, hacia arriba, está provisto de un reborde 23 que se proyecta hacia el interior, para evitar que el líquido 1 escape desde el bote de centrifugado 20 en el caso de una velocidad de rotación reducida. Esa forma de ejecución con anillo de sellado 22 situado en el exterior ofrece la ventaja de que las fuerzas centrípetas F_z que actúan sobre el anillo de sellado 22 estiran el mismo apartándolo de la superficie de sellado, así como reducen su fuerza de sellado hacia la superficie externa del bote de centrifugado 20. De este modo, una gran parte del líquido 1 puede separarse por centrifugación desde el bote de centrifugado 20, ya que en comparación con la forma de ejecución en las Figuras 1 y 2 ya no sólo la masa de líquido es determinante para las relaciones de presión en la junta. De manera especialmente preferente, el anillo de sellado 22 y las fuerzas de rotación está adaptados uno con respecto a otro, de manera que las fuerzas centrípetas solas son suficientes para abrir la válvula formada por el anillo de sellado 22 y la pared externa del bote de centrifugado 20. Esto ofrece la ventaja especial de que puede separarse por centrifugación toda la cantidad de líquido sin que en el bote de centrifugado 20 queden cantidades residuales. Para ello, de manera conveniente, se utiliza un material relativamente blando (por ejemplo un anillo de goma blando) para el anillo de sellado 22, que puede estirarse fácilmente debido al efecto de la fuerza centrípeta. La forma de ejecución con un anillo de sellado 22 situado en el exterior, en comparación con un anillo de sellado situado en el interior según la forma de ejecución en las Figuras 1 y 2, presenta la ventaja de que también en el caso de velocidades de rotación elevadas y poco líquido en el bote de centrifugado 20 es posible aún un paso de líquido por la superficie de sellado entre el anillo de sellado 22 y la pared del bote de centrifugado 20.

La Figura 4 muestra un ejemplo de ejecución especialmente preferente de una función de válvula 35, que depende de la fuerza centrípeta, para una unidad centrífuga. En la vista superior se muestran tres dispositivos de válvula 35 que están integrados en la pared del bote de centrifugado 30. Las válvulas 35 distribuidas en la circunferencia del bote de centrifugado 30 están formadas por un perno 36 que atraviesa la pared del bote de centrifugado 30. Las aberturas proporcionadas para ello en el bote de centrifugado 30 son un poco más grandes que el diámetro del respectivo perno 36, para que el perno 36 pueda moverse libremente dentro de la abertura. En el lado interno del bote de centrifugado 30, el perno 36 está provisto de un resorte de compresión (resorte de recuperación) 37 y de una tuerca de retención 38 o de otro aseguramiento. En el lado externo de la válvula 35 se encuentra una cabeza del perno 39 en el perno 36. Entre la cabeza del perno 39 y la pared del bote de centrifugado 30 está proporcionado un anillo de sellado 32 circunferencial que sella la abertura hacia el exterior. Mediante el resorte de compresión 37 que presiona en dirección de la tuerca de retención 38, la cabeza del perno 39 se arrastra en el anillo de sellado 32 del lado externo y es presionada contra la pared externa del bote de centrifugado 30. Debido a esto, la abertura

de paso de cierra de forma estanca. Durante una rotación del bote de centrifugado 30, la fuerza centrípeta F_z actúa en contra de la fuerza de resorte del resorte de compresión 37. En el caso de una velocidad de rotación determinada, la fuerza centrípeta F_z es suficiente para liberar las aberturas para el pasaje de líquido, de manera que el líquido centrifugado en el bote de centrifugado 30 sale desde el bote de centrifugado 30 y puede pasar a la red microfluídica del dispositivo, no mostrada aquí en detalle.

El umbral de velocidad de rotación que debe alcanzarse para un accionamiento de esa clase de la función de válvula 35 se determina mediante la masa de cada perno 36, con la contratuerca 38 que se encuentra allí, así como mediante la fuerza de resorte, del resorte de compresión 37, que se opone al mismo. Además, juega un rol la posición de la contratuerca 38 con respecto al perno 36. Si el perno 36 está provisto de un roscado, la contratuerca 38 puede modificarse en su posición de manera sencilla, debido a lo cual puede regularse la pretensión del resorte de compresión 37 y, con ello, su fuerza de retención. Como materiales para los componentes individuales de la construcción de válvula 35 son adecuados ante todo materiales biocompatibles. Por ejemplo, pueden utilizarse tornillos Allen de acero inoxidable M4 x 12 con tuercas M4, junto con una junta tórica de silicona (por ejemplo de 4 x 2 mm) y resortes de acero. Esas dimensiones a modo de ejemplo son adecuadas para unidades centrifugas en las que el bote de centrifugado presenta por ejemplo un diámetro de 3 - 4 cm. Para unidades centrifugas de menor tamaño, que en particular son adecuadas para dispositivos microfluídicos habituales en el mercado y que preferentemente presentan un diámetro del bote de centrifugado de unos 5 a 20 mm, en particular de 5 a 15 mm, por ejemplo 10 mm, las dimensiones de los componentes para la función de válvula deben seleccionarse de forma correspondientemente reducida. De manera alternativa con respecto a tornillos pueden utilizarse pernos sin roscado y, de forma alternativa con respecto a tuercas pueden utilizarse por ejemplo anillos de pivote o de retención, o anillos de apriete con auto-sustento que pueden colocarse y/o colocarse por presión.

La función de válvula, por ejemplo, mediante la selección de componentes y materiales adecuados, puede configurarse de manera que en el caso de una velocidad de rotación de 10.000 U/min las válvulas se abren y puede tener lugar un pasaje de líquido. Como diámetro para las aberturas dentro de la pared del bote de centrifugado puede seleccionarse por ejemplo 1 mm. Por ejemplo, pueden utilizarse tres aberturas en la circunferencia del bote de centrifugado, de respectivamente 1 mm. Para distintas aplicaciones puede ser ventajoso mantener relativamente reducidas las aberturas para el pasaje de líquido, eventualmente más reducidas que 1 mm en el diámetro, para evitar un pasaje de células. En particular esto puede ser conveniente cuando con la unidad centrífuga debe obtenerse plasma libre de células desde sangre completa. También mediante aberturas relativamente reducidas puede lograrse que no tenga lugar una separación por centrifugación no deseada de células, por ejemplo en aquellos casos de aplicación en los que primero se lisan de forma selectiva eritrocitos en sangre completa, se separan por centrifugación y se desechan, antes de que se lisen otras células de la sangre que fueron retenidas en el bote de centrifugado, por ejemplo leucocitos, y, por ejemplo, se extraen y procesan posteriormente sus ácidos nucleicos.

Las aberturas relativamente reducidas, sin embargo, presentan la desventaja de que también en el caso de velocidades de rotación elevadas, un pasaje completo del líquido desde el bote de centrifugado hacia el exterior puede requerir un cierto intervalo de tiempo, por ejemplo 1 -2 minutos. Esto puede ser ventajoso en aquellos casos en los que durante ese intervalo de tiempo un material celular nuevamente suspendido deba ser centrifugado nuevamente en las paredes internas del bote de centrifugado. En particular para aquellos casos, pero también para aquellos casos en los que por otras razones debe efectuarse un pasaje de líquido rápido, pueden ser ventajosas aberturas relativamente grandes para el pasaje de líquido. Por ejemplo, puede preverse que adicionalmente con respecto a las funciones de válvula reversibles descritas, con aberturas relativamente reducidas, de manera adicional, estén proporcionadas aberturas relativamente grandes en el bote de centrifugado, que se abren de forma irreversible sólo a partir de una velocidad de rotación muy elevada, así como sólo a partir de una fuerza centrípeta actuante muy elevada, permitiendo un pasaje de líquido muy rápido.

La Figura 5, en una representación en sección esquemática, ilustra un bote de centrifugado 40 con una función de válvula reversible que se realiza mediante un anillo de sellado 22 externamente circunferencial que, de forma comparable a la forma de ejecución en la Figura 3, cierra aberturas dentro de la pared del bote de centrifugado 40, en función de las fuerzas centrípetas. Adicionalmente, en la pared del bote de centrifugado 40 se encuentran presentes otras aberturas, preferentemente más grandes en cuanto al diámetro, que en este ejemplo de ejecución son cerradas por tapones 45. De manera alternativa, esas aberturas, por ejemplo, pueden estar cerradas con cinta adhesiva. Las aberturas relativamente grandes, cerradas por tapones 45 o por otras posibilidades de cierre, se abren de forma irreversible en el caso de una velocidad de rotación correspondientemente elevada, y liberan muy rápido el líquido 1 desde el bote de centrifugado 40. Por ejemplo, para el caso de aplicación de la obtención de células lavadas desde el bote de centrifugado 40, con esta forma de ejecución se logra que, durante el intervalo de tiempo sólo muy corto, de la transferencia de las células separadas desde el bote de centrifugado 40, no se produzca otra vez una adhesión de las células nuevamente suspendidas en la pared interna del bote de centrifugado 40, como sucedería en el caso de una expulsión más prolongada. La apertura irreversible de la función de válvula 45, por ejemplo mediante una

cinta adhesiva que está pegada externamente en el bote de centrifugado 40 en el área de la función de válvula 45, puede alcanzarse de manera que a partir de una cierta magnitud de la fuerza centrípeta, así como a partir de un umbral de velocidad de rotación determinado, la fuerza de adhesión cede y las aberturas se liberan de forma irreversible. Por ejemplo, el cierre también puede estar diseñado mediante una lámina metálica, de modo que la lámina metálica se rompa de modo irreversible por encima del umbral de la velocidad de rotación mencionada. En otra forma de ejecución, las aberturas pueden cerrarse con tapones, por ejemplo tapones plásticos o metálicos que salen despedidos a partir de una cierta magnitud de la fuerza centrípeta o, en caso de superarse el umbral de velocidad de rotación, liberando las aberturas de forma repentina. En particular mediante una combinación de funciones de válvula irreversibles de esa clase, con funciones de válvula reversibles, se brindan diversas posibilidades de utilización para la unidad centrífuga integrada en un dispositivo microfluídico. La combinación mostrada en la Figura 5, de la función de válvula reversible de la Figura 3 y de la función de válvula irreversible 45, se trata sólo de un ejemplo. En otras formas de ejecución, por ejemplo, puede preverse combinar la función de válvula 35 de la Figura 4 con una función de válvula irreversible.

Mediante el accionamiento específico de las funciones de válvula que dependen de la fuerza centrípeta, mediante la regulación de las velocidades de rotación requeridas y eventualmente también mediante la utilización de medios de lisis y/o de extracción selectivos, con la ayuda de la unidad centrífuga integrada, pueden realizarse procesos específicos en el procesamiento de la muestra, por ejemplo una lisis selectiva de células determinadas y/o por ejemplo una extracción de ácidos nucleicos o similares.

Un dispositivo microfluídico con integración de una unidad centrífuga de esa clase puede utilizarse por ejemplo para separar material celular de sangre completa y para obtener el plasma sanguíneo libre de células resultante. Desde el plasma sanguíneo libre de células pueden aislarse y analizarse por ejemplo ADN tumoral libre de células circulante, contenido dentro, u otros ácidos nucleicos. Para realizar ese procesamiento primero una muestra de sangre (completa) se ingresa directamente en el bote de centrifugado a través de una entrada de muestras, por ejemplo mediante una pipeta. En primer lugar, en el caso de una velocidad de rotación centrífuga media, el material celular (leucocitos, eritrocitos, células tumorales circulantes, etc.), durante un intervalo de tiempo suficientemente reducido, se centrifuga en la pared interna del bote de centrifugado. En este caso, rugosidades, nanoestructuras o cavidades realizadas de forma específica en la pared interna del bote de centrifugado pueden favorecer aún más una adhesión de las células a la pared. A continuación, la velocidad de rotación centrífuga se eleva por encima de un valor umbral predeterminable, debido a lo cual se activa la función de válvula en la forma descrita y el plasma sanguíneo libre de células se expulsa fuera del bote de centrifugado y puede acoplarse a la red fluidica del dispositivo microfluídico.

Otro ejemplo de aplicación para un dispositivo microfluídico de esa clase es una separación de eritrocitos y un lavado y una lisis de las células restantes, así como una extracción de los ácidos nucleicos obtenidos de ello. En este ejemplo de ejecución, después de una introducción, por ejemplo de la muestra de sangre completa, en el bote de centrifugado, se agrega en el bote de centrifugado un medio selectivo para una lisis de eritrocitos (por ejemplo una solución de cloruro de amonio) en la cantidad requerida. Ese medio de lisis de eritrocitos hace que los corpúsculos sanguíneos se revienten. Después de un tiempo de espera suficientemente prolongado, comienza el proceso de centrifugación con una velocidad de rotación media, donde la función de válvula aún permanece cerrada. Los leucocitos y eventualmente células tumorales circulantes (CTC) se sedimentan contra la pared del bote de centrifugado, donde estructuras en la superficie en la pared interna del bote de centrifugado pueden intensificar la adhesión en la pared. Después de un periodo de centrifugación suficientemente prolongado se aumenta la velocidad de rotación, de manera que se abre la función de válvula y el líquido "excedente", incluyendo el lisado de eritrocitos, se expulsa desde el bote de centrifugado y se desecha. A continuación, la cámara de entrada de muestras y/o el bote de centrifugado pueden lavarse una o varias veces, y por ejemplo se eliminan los restos de eritrocitos. Durante el lavado, las células, en particular los leucocitos, permanecen adheridas en la superficie de pared interna del bote de centrifugado, de manera que mediante las etapas de lavado el material celular en la pared del bote de centrifugado se limpia y se eliminan impurezas. Por último, se agrega una solución tampón para la lisis del material celular en la pared del bote de centrifugado, liberando así los ácidos nucleicos. En la etapa de centrifugación final, a la velocidad de rotación elevada, el medio de lisis con los ácidos nucleicos contenidos, desde el bote de centrifugado, se transfieren a la cámara de entrada de muestras y se incorporan a la red fluidica del dispositivo microfluídico. Los medios utilizados pueden templarse según la necesidad, en particular pueden calentarse o enfriarse, donde por ejemplo, mediante un medio de lisis calentado, puede favorecerse la lisis de las células.

En otro ejemplo de aplicación pueden separarse eritrocitos desde una muestra de sangre completa y las células restantes pueden acoplarse a la red fluidica del dispositivo microfluídico y utilizarse allí de forma posterior. Después del ingreso a el bote de centrifugado, por ejemplo de una muestra de sangre completa, al inicio del lavado, se agrega primero un medio de lisis selectivo para una lisis de eritrocitos, por ejemplo solución de cloruro de amonio, en la cantidad deseada, en el bote de centrifugado, por ejemplo mediante un lavado superior. Después de efectuada la lisis de los eritrocitos comienza el proceso de centrifugación con

una velocidad de rotación media, donde leucocitos y eventualmente células tumorales circulantes se sedimentan en la pared del bote de centrifugado, eventualmente con la ayuda de estructuras en la superficie interna de la pared del bote de centrifugado. Después de un periodo de centrifugación suficientemente prolongado se aumenta la velocidad de rotación, de manera que se abre la función de válvula y el líquido "excedente" se expulsa desde el bote de centrifugado y se desecha. A continuación, la cámara de entrada de muestras y/o el bote de centrifugado se lavan una o varias veces, en particular se eliminan los restos de eritrocitos. Los componentes celulares restantes de la muestra, libres de eritrocitos, se encuentran en el interior del bote de centrifugado y pueden lavarse mediante las etapas de lavado opcionales. Por último, otro medio, en la cantidad deseada, se introduce en el bote de centrifugado, para separar las células que se encuentran en la pared del bote de centrifugado. Para ello, por ejemplo, puede utilizarse un medio que contenga EDTA. La separación de las células de la pared puede tener lugar dejándolas reposar o, por ejemplo, puede propiciarse mediante una rotación lenta del bote de centrifugado con un cambio periódico de la dirección de rotación. De manera conveniente, la velocidad de rotación se selecciona tan reducida que las fuerzas centrípetas no juegan ningún rol en el sentido de una sedimentación de células, pero la columna de líquido mantiene cubierta toda la pared interna del bote de centrifugado, donde al mismo tiempo se produce una circulación transitoria en el bote de centrifugado. Preferentemente, los remolinos provocados debido a un cambio de la dirección de rotación facilitan la separación de las células desde la pared interna del bote de centrifugado, facilitando con ello el pasaje de las células hacia el líquido. En una última etapa de centrifugación, con una velocidad de rotación elevada que preferentemente comienza de forma abrupta, las células separadas, dentro del medio, se expulsan a través de las válvulas abiertas, hacia la cámara de entrada de muestras, y se transfieren al sistema de canales del dispositivo microfluídico. En este caso puede preverse que mediante una conexión correspondiente de los canales del dispositivo microfluídico primero tenga lugar una recolección del material de muestras, antes de que el material entre en el sistema de canales propiamente dicho. También en este ejemplo de aplicación la temperatura de los medios utilizados puede regularse mediante un calentamiento previo o un enfriamiento previo, para favorecer los procesos.

Los ejemplos de aplicación de la unidad centrífuga integrada, explicados aquí mediante muestras de sangre completa, también pueden trasladarse a otros líquidos de muestras, donde la unidad centrífuga integrada en un dispositivo microfluídico en principio puede utilizarse para todos los procesos microfluídicos que, de manera conveniente, comprenden una etapa de centrifugación.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo microfluídico (100) para el procesamiento de muestras líquidas (10) en el que está integrada al menos una unidad centrífuga con un bote de centrifugado (10; 20; 30; 40) y al menos una función de válvula (12; 22; 35; 45) que depende de la fuerza centrípeta, caracterizado porque el bote de centrifugado está montada de forma giratoria entre dos capas del dispositivo (100).
2. Dispositivo microfluídico (100) según la reivindicación 1, caracterizado porque la función de válvula que depende de la fuerza centrípeta es una función de válvula reversible (12; 22; 35).
- 10 3. Dispositivo microfluídico (100) según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, caracterizado porque la función de válvula que depende de la fuerza centrípeta está realizada mediante al menos un anillo de sellado (12; 22; 32).
4. Dispositivo microfluídico (100) según la reivindicación 3, caracterizado porque el anillo de sellado (22; 32) rodea exteriormente el bote de centrifugado (20; 30) y cierra de forma reversible o libera aberturas en el bote de centrifugado en función de una fuerza centrípeta actuante.
- 15 5. Dispositivo microfluídico (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la función de válvula (35) se forma mediante al menos una abertura en la pared del bote de centrifugado (30), en la que está dispuesto de forma móvil un perno (36) que atraviesa la pared, donde el perno (36), por fuera del bote de centrifugado (30), presenta una cabeza del perno (39) y, por debajo de la cabeza del perno, presenta un anillo de sellado (32), donde el perno (36), dentro del bote de centrifugado (30), mediante un resorte de compresión (37) asegurado, por debajo de una fuerza centrípeta predeterminable, está sostenido
20 en una posición de sellado.
6. Dispositivo microfluídico (100) según la reivindicación 5, caracterizado porque el aseguramiento del resorte de compresión (37) está realizado mediante una contratuerca (38) que está colocada sobre un roscado del perno (36) en el interior del bote de centrifugado (30).
- 25 7. Dispositivo microfluídico (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la función de válvula es una función de válvula irreversible (45).
8. Dispositivo microfluídico (100) según la reivindicación 7, caracterizado porque la función de válvula irreversible (45), en el caso de una fuerza centrípeta más elevada, puede accionarse como una función de válvula reversible (12; 22; 35) proporcionada de forma adicional.
- 30 9. Dispositivo microfluídico (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el bote de centrifugado (10; 20; 30; 40), al menos parcialmente, está provisto de estructuras de superficie para la adhesión de componentes de muestras.
10. Dispositivo microfluídico (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque el bote de centrifugado (10; 20; 30; 40), durante el procesamiento, está dispuesto en un ángulo de basculamiento de entre 10 y 50°, preferentemente de 30°.
- 35 11. Dispositivo microfluídico (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque la posición de integración dentro del dispositivo microfluídico (100) para la unidad centrífuga presenta un acceso fluido (106) mediante el que líquidos, sin pasar por el bote de centrifugado (10; 20; 30; 40), pueden introducirse en el dispositivo (100).
- 40 12. Procedimiento para operar un dispositivo microfluídico (100) según una de las reivindicaciones precedentes, caracterizado porque después de una introducción de la muestra (1) en el bote de centrifugado (10; 20; 30; 40), en una primera fase, el bote de centrifugado se gira con una primera velocidad de rotación y, en una segunda fase subsiguiente, el bote de centrifugado se gira con una segunda velocidad de rotación aumentada, donde mediante la velocidad de rotación aumentada se acciona al menos una función de válvula (12; 22; 35; 45) que depende de la fuerza centrípeta, de la unidad centrífuga.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 12, caracterizado porque el bote de centrifugado (10; 20; 30; 40) puede llenarse nuevamente, de forma repetida, mediante el lavado con un líquido.
14. Utilización de un dispositivo (100) según una de las reivindicaciones 1 a 11, caracterizada porque el dispositivo se utiliza para la separación de componentes celulares de una muestra y/o para la lisis de

componentes celulares y/o para el aislamiento selectivo de determinados componentes celulares de una muestra.

DIBUJOS

Fig. 1

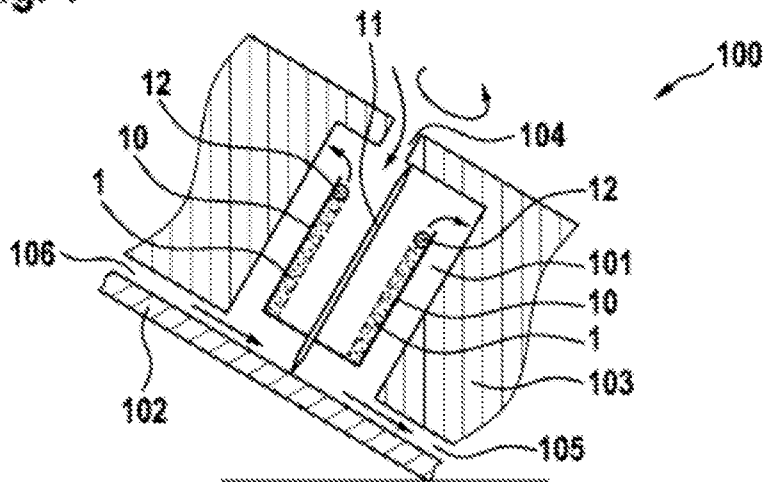


Fig. 2

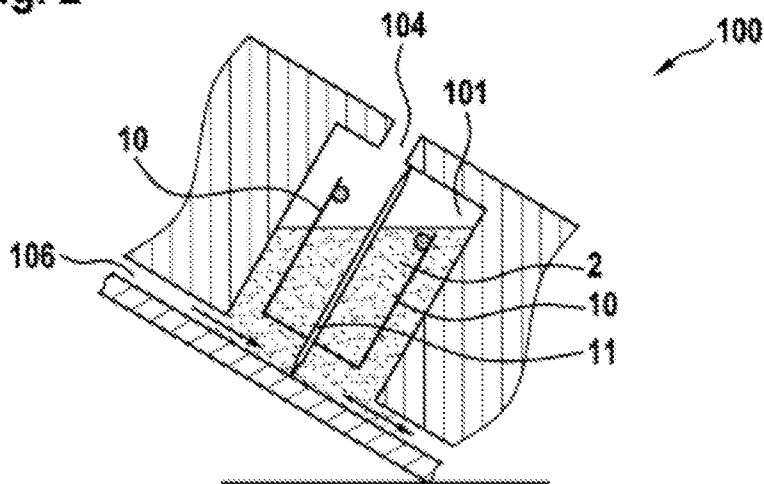


Fig. 3

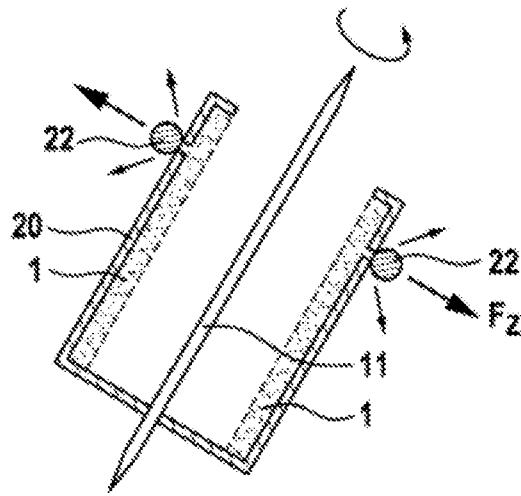


Fig. 4

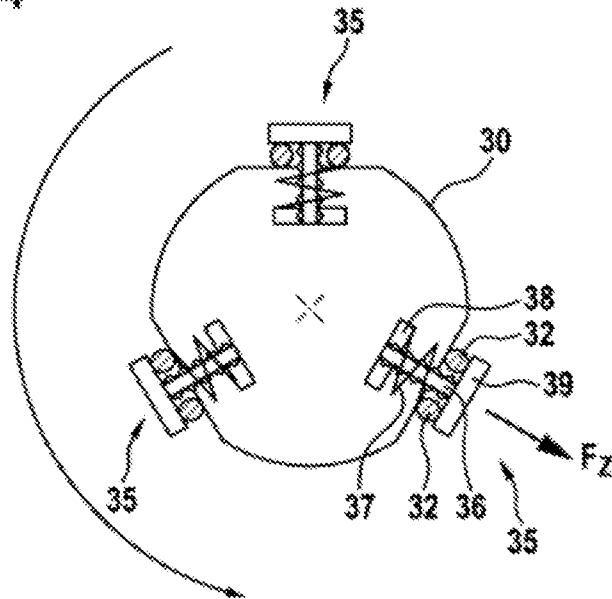


Fig. 5

