



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 326 109**

② Número de solicitud: 200703248

⑤ Int. Cl.:
B01D 43/00 (2006.01)
B01J 8/16 (2006.01)
A61M 1/34 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **05.12.2007**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **30.09.2009**

Fecha de la concesión: **15.06.2010**

⑭ Fecha de anuncio de la concesión: **25.06.2010**

⑮ Fecha de publicación del folleto de la patente:
25.06.2010

⑰ Titular/es:
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas
c/ Serrano, nº 117
28006 Madrid, ES
IKERLAN,
Universidad Miguel Hernández y
Hospital General Universitario de Elche**

⑱ Inventor/es: **González Gómez, María Iciar;
Gómez Álvarez-Arenas, Tomás;
Fernández Ledesma, Luis José;
Carrato Mena, Alfredo;
Soto Martínez, José Luis y
Berganzo Ruiz, Javier**

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

① Título: **Microdispositivo de separación y extracción selectiva y no invasiva de partículas en suspensiones polidispersas, procedimiento de fabricación y sus aplicaciones.**

② Resumen:

Microdispositivo de separación y extracción selectiva y no invasiva de partículas en suspensiones polidispersas, procedimiento de fabricación y sus aplicaciones.

La presente invención describe un microdispositivo de separación y extracción no invasiva y selectiva de partículas en suspensiones polidispersas mediante el uso estratégico de ultrasonidos, flujo laminar y efectos de onda estacionaria establecidos en un canal realizado en microtecnología en un chip. Este dispositivo tipo lamda cuartos modificado permite canalizar y separar las partículas en un flujo interior del canal del sustrato sin tocar las paredes del dispositivo, por lo que son menos dañadas. Este microdispositivo puede utilizarse en el campo de la biomedicina y/o biotecnología para la separación y concentración de células, preferentemente humanas, útiles para procedimientos de investigación y médicos de diagnóstico y tratamiento.

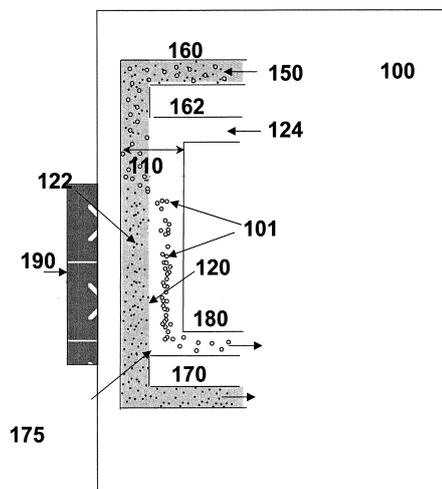


Figura 1

ES 2 326 109 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Microdispositivo de separación y extracción selectiva y no invasiva de partículas en suspensiones polidispersas, procedimiento de fabricación y sus aplicaciones.

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un dispositivo en el que se combinan microtecnología y ondas ultrasónicas como método no invasivo para realizar separación selectiva y extracción de partículas en suspensiones polidispersas, conteniendo microelementos con diferentes características físicas (tamaño, densidad o compresibilidad) y para cualquier nivel de concentración, siendo sus aplicaciones principales en el campo biomédico y biotecnológico.

Estado de la técnica

15 Durante la última década se han propuesto diversas técnicas para manipulación o separación de partículas en suspensión en diversos campos de aplicación tecnológica, entre los cuales se destaca la biotecnología y la medicina. La separación de partículas es de especial interés en la actualidad médica para aplicaciones relacionadas con donaciones de sangre, procesos de diálisis y análisis de laboratorio, así como reciclado y/o lavado de sangre tras operaciones quirúrgicas.

20 La aplicación de ondas acústicas estacionarias sobre suspensiones produce efectos de conducción de las partículas hacia determinadas zonas de equilibrio relacionadas con la distribución de nodos y máximos de presión acústica que establece la onda estacionaria generada en el medio. Sobre cada partícula se ejerce una fuerza de radiación primaria inducida acústicamente, cuya magnitud varía proporcionalmente a la frecuencia de operación. El camino que debe recorrer una partícula sometida a esta fuerza para alcanzar la posición de equilibrio acústico más próxima es menor cuanto menor sea la distancia entre nodos y máximos de presión acústica. Estos están definidos por la longitud de onda, que es inversamente proporcional a la frecuencia acústica. Por ello, es más sencillo desde el punto de vista teórico concentrar partículas a frecuencias más elevadas.

30 Este mecanismo de conducción no invasiva es ampliamente conocido en la disciplina de los ultrasonidos y ha dado lugar durante la última década al desarrollo de un número de intentos para manipulación y/o separación de partículas. Se han propuesto diversas técnicas usando este fenómeno para separar partículas de un líquido u otro fluido. Típicamente el fluido circula a través de un conducto o canal en el que se establece una onda acústica estacionaria transversal a la longitud del canal. De acuerdo a ello, las partículas se desplazan para formar bandas de concentración a lo largo de las posiciones de equilibrio de la onda dentro de estos conductos.

35 ■ En la reciente patente WO 2007/044642 A2, “DEVICE AND METHOD FOR COMBINED MICROFLUIDIC-MICROMAGNETIC SEPARATION OF MATERIAL IN CONTINUOUS FLOW” (Ingber Donald, Xia Shannon, Tom Hunt, Peter Westervelt), se presenta un dispositivo de separación celular en flujo continuo basado en la aplicación de campos magnéticos. El principio de operación es completamente diferente al de la presente invención, ya que no se basa en la aplicación de energía mecánica sino electromagnética y, a diferencia de la presente invención, es una tecnología invasiva que requiere la inserción de micropartículas inorgánicas ajenas a la suspensión a tratar. Estas, susceptibles al campo magnético, se adhieren y arrastran a determinadas células de la suspensión, conduciéndolas magnéticamente hacia los lugares de equilibrio pre-seleccionados. Por tratarse de un método invasivo, la viabilidad de las células separadas se ve parcialmente alterada para la realización de estudios posteriores, una vez extraídas del medio. Estas dos características del dispositivo hacen la patente fuertemente diferente al de la presente invención, aunque ambas coincidan en la utilización de doble lecho de flujo en régimen laminar con una interfase.

50 ■ En la publicación J. Statis. Mech.: “THEORY AND EXPERIMENTS”, 2006, “CONTINUOUS PARTICLE SIZE SEPARATION AND SE SIZE SORTING USING ULTRASOUND IN A MICROCHANNEL” (Sergey Kapishnikov, Vasily Kantsler, Victor Steingberg) se presentan dos dispositivos para la separación y clasificación de partículas y células en suspensión mediante ultrasonidos. El primero de ellos es un resonador conocido como “lamda medios” (siendo lamda la longitud de onda acústica), en el que se establece una onda estacionaria con un nodo de presión en el centro del canal, hacia donde las partículas son conducidas y concentradas durante la aplicación del campo acústico, y a lo largo del cual continúan su circulación hasta alcanzar la salida. De este modo, la suspensión enriquecida de partículas concentradas ultrasónicamente abandona el dispositivo a través de un canal central de salida, mientras el resto de la suspensión lo hace mayoritariamente por otros dos canales laterales de salida dispuestos simétricamente respecto al central. En el dispositivo no es posible realizar una separación absoluta de las partículas colectadas acústicamente respecto al resto de elementos presentes en la suspensión, los cuales circulan distribuidos uniformemente en todo el espacio que permite el canal. Al no estar afectados por el campo ultrasónico su disposición espacial no se ve alterada durante la aplicación acústica, de manera que abandonan el dispositivo por los tres canales de salida, aunque mayoritariamente lo hagan a través de los canales laterales. Esto se debe a que por el canal central se produce una salida masiva de las células concentradas ultrasónicamente. Para lograr una separación selectiva, denominada por los autores como “clasificación celular”, el artículo presenta también el desarrollo de un resonador “lamda cuartos” en el que el ancho del canal es aproximadamente un cuarto de la longitud de onda y el nodo de presión se establece junto a una de las paredes laterales del canal, hacia donde son conducidas y colectadas las células seleccionadas. A diferencia de la presente invención, este dispositivo requiere la utilización de dos transductores ultrasónicos colocados a ambos lados de la sección del canal de tratamiento, externos al mismo, paralelos y enfrentados, emitiendo trenes de

onda temporales con un desfase variable. Este dispositivo, siendo el más parecido al de la presente invención, muestra importantes diferencias que, en su caso, provocan ciertas restricciones de actuación, tales como la imposibilidad de aplicación de onda continua, así como limitaciones físicas sobre la zona de actuación, determinadas por el espacio contenido entre las dos fuentes de emisión ultrasónica y por la disposición geoméricamente simétrica de los canales de entrada y salida respecto al canal central de tratamiento, limitando fuertemente la zona de actuación ultrasónica. A diferencia de la presente invención, este dispositivo lamda cuartos trabaja en torno a $f=4$ MHz y presenta importantes restricciones tanto en el volumen de tratamiento, cuya sección es inversamente proporcional a la frecuencia (aproximadamente 4 veces inferiores a las de nuestra invención), como en la precisión exigida en las medidas del canal, como consecuencia de lo anterior.

■ En la patente WO/2002/072236) *PARTICLE SEPARATION* (ERYSAVE AB, JÖNSSON Henrik, LAURELL Thomas, ALLERS Mats, PERSSON Hans), se describe un dispositivo para separar materia particulada (especialmente para tratamientos de soluciones de sangre) en un dispositivo resonante con un número elevado de nodos de presión acústica para la formación de múltiples bandas de concentración de partículas. Se trata de un dispositivo muy diferente al de la presente invención en cuanto al diseño y actuación. El campo acústico se ejerce sobre una cámara de tratamiento bien diferente a los canales resonadores lamda medios o lamda cuartos, con dimensiones muy superiores a las de éstos para permitir el establecimiento de una onda estacionaria con distribución espacial de múltiples nodos y máximos de presión acústica.

■ En la patente europea EP1365849, también publicada como patente Americana U.S. Pat. US6929750, US 2004069717 y WO02072235, “DEVICE AND METHOD FOR SEPARATION”, (LAURELL Thomas, ALLERS Mats, JÖNSSON Henrik, PERSSON Hans), se describe un dispositivo de microfluídica para separación ultrasónica en resonadores de media longitud de onda dispuestos en paralelo formando una estructura de distribución espacial conocida como “array”. Cada uno de estos elementos contiene un canal resonador “lamda medios” en el que se procede a una conducción y colección acústica de ciertas células hacia el centro del mismo. Como en los demás resonadores de este tipo, al final del proceso se logra una suspensión enriquecida de las células afectadas acústicamente, pero no constituye un proceso de extracción de las mismas con respecto al resto de la suspensión, sino una recolección en alta concentración a través del canal central de salida. El dispositivo está realizado sobre un sustrato de Silicio, de elevado coste, habitual en este tipo de micro-dispositivos. La patente contempla un aumento del volumen de tratamiento acústico mediante la ubicación en paralelo de múltiples canales de actuación ultrasónica. Cada uno de estos elementos constituyentes del panel de dispositivos conformando lo que se conoce técnicamente como un “array” contiene una entrada única por la que se introduce la suspensión y tres canales de salida, uno central por el que desaloja la suspensión enriquecida de las partículas previamente colectadas (eritrocitos) y dos canales laterales dispuestos simétricamente, por los que circula el resto de la suspensión. Aquellos elementos no afectados por la fuerza de radiación permanecen distribuidos homogéneamente en la muestra y abandonan el dispositivo por cualquiera de los tres canales de salida, incluyendo (aunque de forma minoritaria) el canal central por el que desalojan los eritrocitos de forma masiva.

■ En la patente WO 00/04978 *CONCENTRATION OF PARTICLES IN A FLUID WITHIN AN ACOUSTIC STANDING WAVE FIELD*, (CEFAI Joseph BARROW; David Anthony; COAKLEY William Terence; HAWKES Jeremy John, se describe un dispositivo para manipulación de partículas suspendidas en un fluido. Contiene un conducto a lo largo del cual circula la suspensión, así como un transductor ultrasónico y un reflector para el establecimiento de una onda estacionaria perpendicular a la dirección de flujo en el canal. El dispositivo es un resonador “lamda medios”, con la formación de una banda sencilla de partículas en el centro del conductor. La distancia entre el transductor y el reflector es inferior a 300 micras, correspondiendo a una frecuencia de resonancia de la cámara de tratamiento y no a la del transductor ultrasónico. El dispositivo contempla una variación para esta distancia, y con ella, de la frecuencia de tratamiento, de acuerdo a las tolerancias de construcción del dispositivo y de la naturaleza de la suspensión a tratar. Las partículas de la suspensión son colectadas y conducidas a través del nodo de presión acústica hacia una salida del dispositivo ubicada en un canal lateral, por donde la suspensión enriquecida de éstas abandona el dispositivo. Mientras tanto, el resto lo hace a través de otro canal de salida dispuesto con otra orientación.

■ En WO 98/50133 (WO 1998/050133) *PARTICLE MANIPULATION*, (COAKLEY William Terence; HAWKES Jeremy John, BARROW David Anthony CEFAI Joseph) se describe un dispositivo para llevar a cabo la manipulación de partículas en suspensión, consistente en un conducto con dimensiones equivalentes a un número determinado de semi-longitudes de onda, por el que circula la suspensión y en el que se establece una onda estacionaria perpendicular a la dirección del flujo. En esta cámara de tratamiento se establece una onda estacionaria con múltiples nodos y máximos de presión acústica para la formación de bandas de células colectadas acústicamente, paralelas, separadas media longitud de onda y perpendiculares a la dirección de circulación.

■ En IBM, technical disclosure bulletin vol. 25, No. 1, June 1982, page 192/193, se describe un separador de flujo continuo por ultrasonidos para plasmaféresis. El dispositivo consta de dos transductores montados ortogonalmente, cada uno con un reflector y un volumen de tratamiento entre ambos donde someter una suspensión diluida a una onda acústica estacionaria. Se trata de una cámara de tratamiento bien diferente a la de la presente invención, tanto en la forma de la transducción como en la cámara de tratamiento.

■ En JP 06241977 A se describe un dispositivo para medición de partículas finas en base a la actuación de una onda ultrasónica estacionaria, inducida acústicamente mediante un haz ultrasónico en combinación con una fuerza electrostática para proceder a la concentración y separación de partículas de diferentes tamaños. En el centro de la cámara de tratamiento se genera un nodo de presión, hacia donde las partículas son conducidas y concentradas.

ES 2 326 109 B1

■ En EP0773055A2 (1996) (YASUDA K, SAITAMA H G, UMEMURA S, HUDRIOHI S) se describe un dispositivo y método para manipulación acústica de partículas basado en la interacción de varios haces ultrasónicos generados por diversos transductores ubicados estratégicamente. En una cámara se somete la suspensión a un proceso de levitación acústica mediante un campo ultrasónico generado por la interacción de varios haces generados por múltiples fuentes ultrasónicas dispuestas en contacto directo y/o indirecto con el medio.

■ En WO 93/19367A2 se describe un método y dispositivo de aglomeración acústica consistente en un tubo conteniendo una muestra líquida y un transductor ultrasónico acoplado para generar una onda estacionaria perpendicular al tubo, concentrando así las partículas en múltiples bandas transversales a lo largo de las cuales sedimentan tras la aplicación ultrasónica. El documento se basa en la patente Americana U.S. Pat. Nos. 5,665,605 y 5,912,182.

■ En JP 07 047259A se describe un aparato para transportar pequeñas partículas en suspensión. El dispositivo contiene múltiples elementos generadores de ondas ultrasónicas dispuestos en un panel bidimensional de transductores sobre dos superficies planas, entre las cuales se deposita la solución a ser tratada.

Descripción de la invención

Breve descripción

Un aspecto de la invención lo constituye un microdispositivo de separación y extracción no invasiva y selectiva de partículas en suspensiones polidispersas, en adelante microdispositivo de la invención, caracterizado porque comprende, integrados en un chip-sustrato de material acústicamente blando, los siguientes componentes:

a) un sistema de microcanales de flujo de distribución espacial asimétrica de las ramas de canalización de salida desde el canal central de tratamiento (110) que comprende (ver Figura 1):

i. un camino o lecho por el que fluye la suspensión de partida (150), que incluye un canal de entrada (160) para el suministro y otro de salida (170) por donde abandona el dispositivo, en paralelo con

ii. un camino o lecho por el que fluye el fluido puro (124) al que se extraerán las partículas seleccionadas (al que se denomina lecho del fluido colector), incluyendo un canal de entrada o suministro (162) y otro de salida (180), que forman

iii. un canal central de tratamiento (110) donde la suspensión de partida y el fluido puro están separados por una interfase frontera de líneas de corriente en régimen laminar definida por las dimensiones transversales del canal y que se bifurca al final de su recorrido (175) en dos canales de salida mencionados (170) y (180), donde el ancho del canal resonador presenta una relación con la longitud de onda inversamente proporcional a la frecuencia acústica, y donde la profundidad del canal de tratamiento (250 μm) - que conforma junto al ancho su sección transversal - es sensiblemente inferior a un cuarto de la longitud de onda acústica,

y,

b) un actuador o transductor ultrasónico en una de sus paredes laterales (190)

- externo y paralelo al canal central de tratamiento (110), que transmite la energía acústica al microcanal de tratamiento a través del sustrato y del material en el que está desarrollada la canalización, capaz de establecer una onda estacionaria en el interior del canal de tratamiento entre sus paredes laterales, produciendo un nodo de presión a una distancia de la pared reflectora de aproximadamente $1/3$ y $2/3$ del ancho del canal, respectivamente, y de producir un gradiente de presiones generado acústicamente en el interior del canal central con un efecto de conducción de ciertas partículas dentro del mismo hacia la región de equilibrio acústico definida en el nodo, donde la fuerza de radiación se anula, y

- cuya actuación incluye no sólo el canal central de tratamiento sino también la zona de bifurcación hacia los dos microcanales de salida con el objeto de aumentar al máximo la eficiencia de separación selectiva y extracción.

Una realización particular de la invención lo constituye el microdispositivo de la invención, en el que los materiales constituyentes del chip-sustrato, preferentemente un epoxy de resina SU-8 sobre el que se realiza el canal y el sustrato acrílico PMMA "Polimetacrilato de Metilo", presentan una impedancia acústica de 3.3 MRayls, y donde el transductor ultrasónico b) consiste en una pequeña cerámica piezoeléctrica, preferentemente, un dispositivo de la marca PZT26.

Otro aspecto de la invención lo constituye el proceso de fabricación del microdispositivo de la invención, en adelante proceso de fabricación del microdispositivo de la invención, basado en la técnica de fotolitografía de acuerdo al diseño descrito en la Figura 1 y que comprende las siguientes etapas (ver Figura 10):

a) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible, sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 1),

ES 2 326 109 B1

- b) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible SU-8 sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 2) recubierto con un material antiadherente,
- c) Sellado de la oblea 1 y la oblea 2 enfrentado dichas obleas por la cara que contiene el material polimérico fotodefinible, y
- d) Retirada de la oblea recubierta con material antiadherente.

Así, otro aspecto de la invención lo constituye el uso del microdispositivo de la invención, en adelante uso de la invención, en un procedimiento, de separación no invasiva selectiva, lavado y/o clasificación de partículas en suspensiones polidispersas.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de la invención en el que las partículas consisten en células pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: virus, priones, células procariotas (bacterias, levaduras, hongos, algas, etc.) y eucariotas.

Una realización más particular de la invención lo constituye el uso del microdispositivo de la invención para la separación y aislamiento selectivo de células eucariotas, preferentemente células humanas, y más preferentemente células tumorales, células sanguíneas (hematíes, plaquetas, macrófagos y linfocitos), células troncales o células madre, ya sean somáticas o embrionarias, u de otro tipo presentes en fluidos corporales, como por ejemplo: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o presentes en otros tipos de muestras biológicas provenientes de biopsias.

Descripción detallada

Se ha desarrollado un microdispositivo para separación y extracción ultrasónica de partículas y células en suspensión mediante un resonador ultrasónico de tipo "lamda cuartos modificado" con características singulares. En concreto, presenta una configuración geométrica peculiar, tanto en cuanto a las dimensiones del canal central de tratamiento, como a la distribución espacial asimétrica de los canales de flujo de entrada y de salida de las muestras con respecto al canal central de tratamiento. Los inventores también han encontrado la importancia de esta última característica, que refuerza la efectividad de separación, como se describirá más adelante.

La presente invención se basa en que los inventores han observado que la aplicación de una onda de activación generada por un transductor en paralelo con respecto a un canal central de tratamiento produce en el mismo una onda estacionaria perpendicular a la dirección del flujo, con un nodo de presión ubicado en una posición intermedia entre el centro del canal y la pared reflectora, en la zona ocupada por el lecho del fluido puro y que ocupa la longitud del canal de tratamiento afectada acústicamente.

El dispositivo es activado mediante un actuador o transductor ultrasónico, por ejemplo, una pequeña cerámica piezoeléctrica de área rectangular (190 de la Figura 1). Una de las características de la invención es que la fuente de ultrasonidos está dispuesta en contacto perpendicular con el chip, transmitiendo la energía ultrasónica en una dirección perpendicular a éste. El elemento piezoeléctrico es pegado parcialmente en una de sus superficies metalizadas a uno de los cantos exteriores del chip del microdispositivo, en particular al canto más próximo al canal central de tratamiento realizado en el chip, y paralelo al mismo (110 de la Figura 1). De esta manera transmite la energía acústica a través del chip hacia el canal, en cuyo interior se establece una onda estacionaria perpendicular a la dirección del flujo.

Entre las paredes laterales del canal se genera un gradiente de presión acústica, con el establecimiento de un nodo ubicado en una posición intermedia entre el centro del canal de tratamiento y la pared reflectora, en la zona ocupada por el lecho del fluido puro a lo largo de toda la longitud del canal afectada acústicamente. Este nodo de presión se produce a una distancia de la pared reflectora de aproximadamente 1/3 del ancho del canal y a 2/3 de la pared opuesta, respectivamente. Así, la distribución de presiones establecida en esta dirección perpendicular al flujo de las muestras a lo largo del canal origina una fuerza de radiación que actúa de forma específica sobre cada partícula en suspensión, perpendicularmente a la dirección de flujo. Sin embargo, su efecto de conducción queda limitado solamente a aquellas partículas con cierto tamaño, densidad o compresibilidad que, susceptibles a las condiciones acústicas aplicadas y seleccionadas en cada caso según el tipo de aplicación concreta, son aceleradas por acción de dicha fuerza.

La ubicación estratégica de esta zona de equilibrio acústico que constituye el nodo de presión, en el lecho del fluido puro, obliga a las partículas arrastradas acústicamente a atravesar la interfase de separación entre los dos medios fluyentes, abandonando así la suspensión para ser colectadas en el fluido puro, también denominado a partir de ahora fluido colector, desde donde son extraídas a través de uno de los canales de salida.

Los inventores también destacan la gran importancia de esta ubicación estratégica del nodo, relativamente alejada de la pared reflectora, pues representa una innovación respecto a los resonadores "lamda cuartos", en los que dicho nodo se ubica junto a la pared reflectora (Figura 2). De esta forma se evitan problemas de adherencia de las partículas a dicha pared y se favorece su circulación concentrada hacia la salida del canal, evitando así problemas de atasco. Además, este nodo de presión ocupa una longitud a lo largo del canal similar a la del actuador ultrasónico (longitud ocupada por la cerámica piezoeléctrica).

ES 2 326 109 B1

Otra novedad que presenta la presente invención se refiere a la disposición asimétrica de los canales de entrada y salida desde el canal central de tratamiento, permitiendo al sistema de transducción ultrasónica ejercer su influencia a través del chip sobre una zona del canal más amplia de la habitualmente afectada en este tipo de separadores. Esta ordenación espacial estratégica amplía las posibilidades de ubicación de la fuente de ultrasonidos (área de pegado de la cerámica piezoeléctrica) sobre el chip-sustrato, y con ella la zona de actuación en el canal de tratamiento, incluyendo la zona de bifurcación hacia las dos ramas de salida. En esta región, de geometría diferente al resto del canal, la fuerza de radiación resultante está dirigida hacia la salida del canal por donde el fluido colector de partículas abandona el dispositivo, aumentando notablemente la eficiencia de separación selectiva.

Esta ampliación del área de actuación acústica asegura la salida de las partículas seleccionadas por el canal deseado, optimizando la eficacia de separación y extracción de las mismas desde su medio inicial, la suspensión.

Otra característica de esta invención es la frecuencia de tratamiento ultrasónico, de 1 MHz, inferior a las habituales en este tipo de microdispositivos (normalmente trabajan a partir de 2 MHz, la mayoría por encima de este valor). Sin embargo, esta frecuencia puede variar, escalando oportunamente las dimensiones transversales del canal central de tratamiento, las cuales han de variar proporcionalmente a los cambios producidos en la longitud de onda (inversamente a la frecuencia acústica). De esta forma, frecuencias bajas permiten manejar mayores volúmenes de tratamiento. Sin embargo, para frecuencias inferiores a 500 kHz el umbral de cavitación acústica (consistente en la generación en el medio de microburbujas con fuertes y rápidos efectos de implosión) es también inferior al de frecuencias más elevadas. Por ello, el rango de variabilidad de la energía acústica para generar conducción ultrasónica sin provocar daños en los micro-elementos en suspensión está más restringido. Además, debe tenerse en cuenta que la fuerza de radiación aumenta linealmente con la frecuencia acústica, por lo que los beneficios de volumen que reporta la utilización de dispositivos resonantes a bajas frecuencias tienen como contrapartida un mayor gasto energético. Con el microdispositivo de esta invención se ha realizado una aplicación de ultrasonidos a una frecuencia inferior a las habituales, en concreto a 1 MHz, para la que, sin embargo, el umbral de cavitación acústica es elevado, poniendo de manifiesto su viabilidad y permitiendo un volumen de tratamiento al menos dos veces mayor que en los dispositivos pensados para resonar a 2 MHz. Así, la invención aporta dos ventajas relacionadas con este parámetro acústico respecto a los micro-dispositivos existentes resonantes a frecuencias más elevadas; éstas se refieren a un aumento del volumen de tratamiento, recién mencionado y, en consecuencia, a una disminución en las restricciones asociadas a la precisión en el ajuste de las medidas (paredes de canalización fundamentalmente).

Otra novedad del microdispositivo de la invención es el material sobre el que está realizado, un chip integrado integrado por dos materiales acoplados en paralelo: PMMA (Polimetacrilato de Metilo) utilizado como sustrato base constituyente del fondo de los canales (con un espesor de aproximadamente 900 μm) y una lámina de epoxy fotodefinible SU-8, dispuesta sobre el sustrato anterior (con un espesor de 330 μm), en el que se realiza la canalización. En este sentido, no se han usado especiales reflectores o similares para las paredes del canal central de tratamiento y, por el contrario se ha confirmado un buen comportamiento del material SU-8, que en el microdispositivo constituye las paredes laterales del canal de tratamiento, actuando como reflector acústico y validando su utilización sin requerimientos especiales de reflectores o similares. Así pues, se ha validado experimentalmente el material polimérico SU-8 como elemento reflector para el establecimiento de la onda estacionaria en el interior del canal y la aplicabilidad ventajosa de estos materiales *acrílicos acústicamente blandos*. Además, se ha encontrado un buen comportamiento acústico del material que constituye la base de los canales, PMMA, como transmisor de la energía ultrasónica con características acústicas parecidas a las del SU-8 y buen acoplamiento mecánico-acústico al mismo. Se trata de dos materiales poliméricos de fácil manipulación y bajo coste. Ambos materiales presentan una impedancia acústica baja (no superior a tres veces la del agua y al menos 5 veces inferior a la de los metales) y permiten una fácil manipulación de los mismos para la elaboración de los canales, además de la evidente ventaja de abaratamiento frente a otros sustratos habituales en este tipo de microdispositivos, como es el Silicio, mucho más rígidos desde el punto de vista acústico y más caros. En conjunto, aportan interesante ventajas económicas.

El modelo utilizado para la experimentación en el Ejemplo 1.2 es un modelo de micropartículas de poliestireno de tamaños y densidades que mimetizan las características físico-acústicas de dos tipos de células: eritrocitos y células tumorales exfoliadas en sangre periférica, fluyendo inicialmente juntas en un fluido asimilable al plasma sanguíneo.

Se destaca la elevada eficacia de separación selectiva y extracción de las partículas de mayor diámetro obtenida en la experimentación realizada con el dispositivo de la invención (Ejemplo 1). Este comportamiento repetitivo se debe a la actuación individual de la fuerza de radiación acústica sobre cada partícula, independiente de su concentración en la suspensión. La eficacia de actuación es válida tanto para concentraciones elevadas como para el caso de suspensiones extremadamente diluidas, para las que otras técnicas de separación presentan fuertes caídas de sensibilidad y eficacia de actuación.

En resumen, de todas las novedades descritas, se destaca la sencillez y efectividad que presenta el microdispositivo: sencillez tanto por la fuente de ultrasonidos (consistente en una cerámica piezoeléctrica), como por la geometría del canal de tratamiento y sus bifurcaciones de entrada y salida, así como los materiales en los que se realiza el chip del dispositivo: un sustrato de PMMA que constituye la base de los canales y el epoxy SU-8, en el que se realiza la canalización, así como por la eficacia de resultados.

ES 2 326 109 B1

Por lo tanto, un aspecto de la invención lo constituye un microdispositivo de separación y extracción no invasiva y selectiva de partículas en suspensiones polidispersas, en adelante microdispositivo de la invención, caracterizado porque comprende, integrados en un chip-sustrato de material acústicamente blando, los siguientes componentes:

- 5 a) un sistema de microcanales de flujo de distribución espacial asimétrica de las ramas de canalización de salida desde el canal central de tratamiento (110) que comprende (ver Figura 1):
- 10 i. un camino o lecho por el que fluye la suspensión de partida (150), que incluye un canal de entrada (160) para el suministro y otro de salida (170) por donde abandona el dispositivo, en paralelo con
 - 15 ii. un camino o lecho por el que fluye el fluido puro (124) al que se extraerán las partículas seleccionadas (al que se denomina lecho del fluido colector), incluyendo un canal de entrada o suministro (162) y otro de salida (180), que forman
 - 20 iii. un canal central de tratamiento (110) donde la suspensión de partida y el fluido puro están separados por una interfase frontera de líneas de corriente en régimen laminar definida por las dimensiones transversales del canal y que se bifurca al final de su recorrido (175) en dos canales de salida mencionados (170) y (180), donde el ancho del canal resonador presenta una relación con la longitud de onda inversamente proporcional a la frecuencia acústica, y donde la profundidad del canal de tratamiento (*por ejemplo, 250 μm*)- que conforma junto al ancho su sección transversal- es sensiblemente inferior a un cuarto de la longitud de onda acústica,
- 25 y,
- b) un actuador o transductor ultrasónico en una de sus paredes laterales (190)

- externo y paralelo al canal central de tratamiento (110), que transmite la energía acústica al microcanal de tratamiento a través del sustrato y del material en el que está desarrollada la canalización, capaz de establecer una onda estacionaria en el interior del canal de tratamiento entre sus paredes laterales, produciendo un nodo de presión a una distancia de la pared reflectora de aproximadamente $1/3$ y $2/3$ del ancho del canal respectivamente, y de producir un gradiente de presiones generado acústicamente en el interior del canal central con un efecto de conducción de ciertas partículas dentro del mismo hacia la región de equilibrio acústico definida en el nodo, donde la fuerza de radiación se anula, y

35 - cuya actuación incluye no sólo el canal central de tratamiento sino también la zona de bifurcación hacia los dos microcanales de salida con el objeto de aumentar al máximo la eficiencia de separación selectiva y extracción.

Tal como se utiliza en la presente invención el término partícula en “suspensiones polidispersas” se refiere a una suspensión con partículas de diferentes características físicas (tamaño, densidad o compresibilidad, entre otras), comprendiendo microelementos inorgánicos u orgánicos, tales como células, preferentemente células eucariotas, más preferentemente humanas, microorganismos u otro tipo de microelementos presentes en fluidos biológicos con parámetros del mismo orden.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “chip de materiales acústicamente blandos” se refiere a materiales cuya impedancia es mucho menor a las que presentan otros materiales o medios como los metales o cristal (al menos, 5 veces inferior), y, fundamentalmente, que no supera en tres veces la impedancia de los medios líquidos (habitualmente delimitada en un rango de variabilidad oscilante generalmente, salvo excepciones, entre 0.8 MRayls y 2.6 MRayls). El concepto “blando” queda, pues, referido a la relación de impedancias entre el material que constituye las paredes del canal de tratamiento y los fluidos circulantes por el interior del mismo, pero con suficiente capacidad de producir reflexiones de la onda acústica para el establecimiento de ondas estacionarias.

Así, cualquier material blando, preferentemente un material acrílico, con propiedades acústicas parecidas al SU-8 o similar a otros elementos plásticos, puede ser utilizado como material para la elaboración del chip- sustrato del microdispositivo de la invención en el que realizar la canalización, por su similitud en la transmisión de energía acústica a través del mismo y respuestas análogas de reflexión en las paredes del canal.

Una realización particular de la invención lo constituye el microdispositivo de la invención, en el que los materiales constituyentes del chip-sustrato, preferentemente un epoxy de resina SU-8 sobre el que se realiza el canal y el sustrato acrílico PMMA “Polimetacrilato de Metilo”, presentan una impedancia acústica de 3.3 MRayls, y donde el transductor ultrasónico b) consiste en una pequeña cerámica piezoeléctrica, preferentemente, un dispositivo de la marca PZT26.

Otro aspecto de la invención lo constituye el proceso de fabricación del microdispositivo de la invención, en adelante proceso de fabricación del microdispositivo de la invención, basado en la técnica de fotolitografía de acuerdo al diseño descrito en la Figura 1 y que comprende las siguientes etapas (ver Figura 10):

- 65 a) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible, sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 1),

ES 2 326 109 B1

- b) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible SU-8 sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 2) recubierto con un material antiadherente,
- c) Sellado de la oblea 1 y la oblea 2 enfrentado dichas obleas por la cara que contiene el material polimérico fotodefinible, y
- d) Retirada de la oblea recubierta con material antiadherente.

La elaboración del presente microdispositivo es fácilmente ejecutable por un experto en la materia con el conocimiento y diseños indicados en la presente invención y con el estado de la técnica actual (véase documentos citados). Adicionalmente, es posible mejorar el diseño del microdispositivo de la invención con la introducción de canales vacíos adicionales ubicados estratégicamente en torno al canal central para minimizar las pérdidas de la energía acústica transmitiéndose a través del sustrato PMMA del chip y del material SU-8. Estos elementos adicionales podrán ser fácilmente incorporados al diseño del dispositivo de la invención repitiendo los pasos b), c) y d) del procedimiento de elaboración del dispositivo y añadiendo dos canales cerrados con aire debajo del canal central y paralelo al mismo (ver más adelante). La Figura 11 muestra un diseño donde un canal relleno de aire es colocado tanto debajo como al lado del canal fluido de tratamiento donde se produce la separación. De esta manera la señal de ultrasonidos utilizada para la separación queda confinada en el lugar deseado, minimizando las pérdidas.

Por otro lado, el microdispositivo de la invención también puede ser fabricado mediante técnicas de estampación en caliente combinadas con un proceso de pegado posterior, de la forma siguiente (ver Figura 12):

- a) Preparación de un molde en el que se incluyen los diseños de canales deseados,
- b) Moldeado del sustrato a utilizar usando el molde obtenido en a), mediante la acción de presión y/o temperatura, y
- c) Sellado del sustrato mediante el pegado con otro material plástico bajo la acción de presión y/o temperatura y/o activación superficial por plasma de oxígeno.

Por otro lado, el rango de frecuencia aplicable al microdispositivo de la invención tanto para suspensiones orgánicas como inorgánicas es amplio, aunque deben tenerse en cuenta ciertas consideraciones para las suspensiones orgánicas, como se explica a continuación. Una variación en la frecuencia ultrasónica implica un proceso de escalamiento en las dimensiones del dispositivo. Dado que el funcionamiento del microdispositivo se basa en el modelo de resonador acústico en la dirección del ancho del canal, las características espaciales asociadas a esta dimensión lateral del microcanal de tratamiento han de ser variadas inversamente proporcional a la variación de la frecuencia acústica. Aunque la fuerza de radiación inducida sobre cada microelemento de la suspensión es directamente proporcional a la frecuencia, debe tenerse en cuenta la disminución del umbral energético de cavitación acústica en el caso de suspensiones orgánicas a bajas frecuencias (del orden de los kHz), con el fin de evitar daños celulares. Este fenómeno no deseado se ve favorecido a frecuencias bajas, por lo que habría limitaciones de aplicación de la invención por debajo de los 500 kHz. Por el contrario, el incremento de la frecuencia aumenta linealmente la magnitud de la fuerza de radiación y permite una disminución de los niveles de energía acústica necesarios para generar conducción selectiva por ultrasonidos. Por esta razón, casi todos los dispositivos desarrollados hasta el momento trabajan entre 2 MHz y 5 MHz. Como contrapartida, el aumento hasta estas frecuencias implica una disminución escalada de las dimensiones laterales del canal de tratamiento, que ha de variar proporcionalmente a los cambios inducidos en la longitud de onda acústica, encareciendo los procesos de realización de estos dispositivos por el compromiso con la precisión de los mismos.

Los resultados obtenidos con este modelo permiten aplicar el dispositivo en el ámbito de la separación y aislamiento de partículas, con importante aplicaciones en la separación y aislamiento de células, preferentemente humanas, en procedimientos de diagnóstico y tratamiento, por ejemplo, tratamiento celular o de terapia génica, de enfermedades en mamíferos, preferentemente seres humanos.

Así, otro aspecto de la invención lo constituye el uso del microdispositivo de la invención, en adelante uso de la invención, en un procedimiento, de separación no invasiva selectiva, lavado y/o clasificación de partículas en suspensiones polidispersas.

Otro aspecto más particular de la invención lo constituye el uso de la invención en el que las partículas consisten en células pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: virus, priones, células procariotas (bacterias, levaduras, hongos, algas, etc.) y eucariotas.

Una realización más particular de la invención lo constituye el uso del microdispositivo de la invención para la separación y aislamiento selectivo de células eucariotas, preferentemente células humanas, y más preferentemente células tumorales, células sanguíneas, células troncales o células madre, ya sean somáticas o embrionarias, u de otro tipo presentes en fluidos corporales, como por ejemplo: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o presentes en otros tipos de muestras biológicas provenientes de biopsias.

Procedimientos o aplicaciones concretas biomédicas, ya sean en su vertiente de diagnóstico o de tratamiento, donde se puede utilizar el microdispositivo de la invención se relaciona con donaciones de sangre, plasmaféresis, procesos de diálisis y análisis de laboratorio, así como reciclado y/o lavado de sangre tras operaciones quirúrgicas, donde se precisan la separación y concentración de determinados tipos de células, por ejemplo hematíes y plaquetas.

Otro ejemplo lo constituye el uso del microdispositivo de la invención en un procedimiento de diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades humanas para la separación selectiva y extracción de células dañadas o alteradas de pacientes, las cuales pueden ser reparadas *ex vivo* y administradas de nuevo al paciente.

Un campo concreto de aplicación biomédica es la oncología, donde se puede utilizar como una herramienta de valor diagnóstico y pronóstico para reproducir la separación selectiva y extracción de células tumorales circulantes en sangre periférica (CTC) de pacientes oncológicos con tumores sólidos con diferente origen tisular y en diferentes estadios de la enfermedad.

La utilidad clínica demostrada hasta la fecha de la cuantificación del número de células tumorales circulantes en sangre periférica se centra en los siguientes aspectos:

- Factor pronóstico independiente en cáncer de mama y de próstata metastático (*Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Millar MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW, Hayes DF. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer N Engl J Med 351:8, 2004*) (*Moreno JG, Milelr MC, Gross S, Allard WJ, Gomella LG, Terstappen LW. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. Urology; 65(4):713-718; 2005*).
- Seguimiento de la respuesta a los tratamientos quimioterápicos en pacientes oncológicos con enfermedad avanzada (*Cristofanilli M, Mendelsohn J, et al. Circulating tumor cells in breast cancer: advanced tools for tailored therapy. Proc Natl Acad Sci USA 103(46):17073-17074; 2006*).

Los sistemas de análisis utilizados en estos estudios se basan en la separación inmunomagnética positiva con anticuerpos monoclonales y posterior análisis por microscopia de fluorescencia. Estas aplicaciones han obtenido la aprobación de la Food and Drug Administration (FDA) para su uso en la práctica clínica en EEUU.

La generalización de ambas aplicaciones a otros tipos de tumores está actualmente en pleno desarrollo. Asimismo, existen estudios preliminares que indican la potencial utilidad del análisis del número de CTC como marcador temprano de recidivas en cáncer colorrectal (*Soto JL, Garrigos N, Gallego J, Guaraz P, Garcia-Bautista M, Castillejo A, Gomez A, Casado-Llavona C, Rodríguez-Lescure A, Carrato A. Toward a circulating tumor cell analysis as an early marker for relapse in stage II and III colorectal cancer patients. Eur J Cancer Supplements. 3(2):187; 2005*).

Una de las grandes ventajas que presenta el dispositivo motivo de la presente actuación, es la posibilidad real, no solo de separar eficazmente las CTC; lo cual permite su fácil conteo; sino el hecho de poder disponer de dicha población celular aislada y en estado viable para ulteriores análisis; tanto descriptivos a nivel genético y de perfiles de expresión génica; como de estudios de comportamiento funcional *ex vivo*. Hasta la fecha, este es el único dispositivo conocido capaz de ofrecer dicha posibilidad con tan elevada eficacia.

El concepto de las CTC como biopsia asequible y no invasiva del tumor, presenta aquí el valor añadido de la posibilidad de caracterizar funcionalmente el comportamiento de dichas células con respecto a su sensibilidad/resistencia al arsenal terapéutico disponible como sistema de selección personalizada de los tratamientos más eficaces para cada paciente.

La utilidad clínica real y potencial del dispositivo es por tanto de una gran trascendencia dentro de la práctica clínica ofreciendo una información muy valiosa para un mejor manejo de un paciente con distintas enfermedades.

Descripción de las figuras

Figura 1

Esquema en perspectiva (2D) de los elementos y forma de actuación-conducción sobre las partículas en suspensión del microdispositivo de la invención

El microdispositivo comprende un chip que incluye un sustrato base sobre el que se asienta un material polimérico (100) que contiene un sistema integrado de 4 microcanales (160, 162, 170 y 180), centrados en torno a un canal central de tratamiento (110), dos de ellos en cada extremo del mismo, situados de forma no simétrica o asimétrica, tanto para la entrada como para la salida de dos medios que circulan en paralelo en régimen laminar a lo largo del canal central de tratamiento (110). Uno de estos medios es la suspensión (150) de la que se van a extraer ciertas partículas (101) y el otro es un líquido puro (124) que se introduce por su canal de entrada (162) que actuará como colector ultrasónico de las partículas (101). El dispositivo lleva integrado un transductor ultrasónico (190) en una de sus paredes laterales, paralelo al canal de tratamiento acústico. El canal central (110) se bifurca al final de su recorrido (175) en dos canales de salida (170 y 180), donde se produce el proceso de separación final, saliendo las partículas seleccionadas (101) por el canal de salida (180), mientras que el resto de la suspensión con las partículas restantes (122) sale por el canal (170).

Figura 2

Esquema de la actuación del campo acústico en el interior del canal de tratamiento

5 Un transductor ultrasónico (190) pegado un una de sus superficies metalizadas al canto del chip, que incluye dos materiales poliméricos (uno con la canalización y otro que constituye el sustrato sobre el que se asienta acoplado mecánicamente) genera una onda de ultrasonidos y la transmite a través del chip acrílico al canal central de tratamiento. El ancho del canal “w” es algo mayor que un cuarto de la longitud de onda acústica y permite el establecimiento de una onda estacionaria en dicha dirección dentro del canal con un nodo de presión ubicado a una distancia de
10 aproximadamente $w/3$ respecto a una de sus paredes laterales, la cual actúa como reflector.

Figura 3

15 *Fotografía del prototipo dispositivo con el chip y la cerámica piezoeléctrica transductora integrados en una pieza de montaje para la inserción-extracción de los fluidos*

La fotografía 3.a muestra el dispositivo desde arriba y la figura 3.b muestra de canto la estructura del chip, con los dos materiales poliméricos acoplados mecánicamente.
20

Figura 4

Fotografía y esquema del chip de PMMA

25 La fotografía 4.a muestra los micro-canales realizados y la ubicación de la cerámica piezoeléctrica pegada en el canto del chip. La figura 4.b muestra un esquema de la sección transversal del chip, constituido por dos materiales poliméricos SU-8 y PMMA.

30

Figura 5

Fotografías microscópicas del interior del canal

35 En el interior del canal se aprecia la ocupación de los dos medios en el mismo, la suspensión circulando por la sección izquierda del canal y agua en la mitad derecha, en ausencia de la aplicación ultrasónica. La suspensión está constituida mayoritariamente por pequeñas partículas de poliestireno con diámetros de 6 micras en alta concentración y algunas más grandes con diámetros de 20 micras circulando en muy baja concentración ($C_v < 1\%$). En la fotografía de la Figura 5.a) se observa la distribución transversal de los medios para bajas velocidades de circulación, permitiendo
40 la visualización parcial de partículas de 6 μm . La resolución de las imágenes es de 1.17 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Por el contrario, la imagen de la Figura 5b), correspondiente a una velocidad de circulación mayor, no permite dicha distinción, pero muestra una diferencia de tonalidad en el contraste luminoso de ambos medios.

Figura 6

Fotografía microscópica del comportamiento de conducción individual de cada partícula de 20 μm hacia el nodo de presión acústica en el interior del canal

50 La partícula situada en la parte superior del canal se encuentra en el principio de la zona del canal afectada por el actuador ultrasónico y experimenta un desplazamiento lateral, perpendicular a la dirección del flujo, menos intenso que la partícula ubicada en la parte inferior de la fotografía, plenamente afectada por el campo acústico y, por ello, arrastrada más intensamente. Por esta razón, dicha partícula se encuentra ubicada en la posición del nodo de presión mientras que la partícula superior todavía no lo ha alcanzado en el tiempo de adquisición del fotograma.
55

Figura 7

Fotograma de partículas de 20 μm

60

Imagen correspondiente a un fotograma de dos partículas de 20 μm circulando muy lentamente a lo largo del canal central en el nodo de presión, posicionadas en el nodo de presión acústica, separado de la pared reflectora.

65

Figura 8

Filmación de la separación-extracción de las partículas

5 Resultados experimentales en una filmación del proceso de separación-extracción de las partículas seleccionadas a través de las canalizaciones de salida. El primer fotograma (8.a) muestra en ausencia de ultrasonidos la salida natural de las partículas de 20 μm junto al resto de la suspensión por el ramal izquierdo a partir del canal central, siguiendo el lecho de flujo por el que circulaba. Los fotogramas de (8.b), (8.c) y (8.d) muestran la salida selectiva de estas partículas, separadas de la suspensión, por el canal de salida del fluido puro-agua, una vez conducidas y colectadas
10 acústicamente en el nodo de presión, ubicado en el lecho del fluido puro (semi-sección derecha), a lo largo del cual continúan su circulación hasta abandonar el canal central de tratamiento. Todos estos fotogramas corresponden a una misma película. La velocidad de circulación de las partículas en estas secuencias es de 2.4 mm/s a lo largo del canal.

15 Figura 9

Proceso de extracción de las partículas de 20 μm a través del canal de salida

20 Se observa la extracción de las partículas por el canal de salida de la derecha tras la conducción ultrasónica individual para una velocidad de circulación extremadamente baja, de aproximadamente 0.06 mm/s, que permite una visualización clara y cuantificación de su comportamiento acústico. En los fotogramas consecutivos (9.a) a (9.d) se aprecia claramente la eficacia del tratamiento ultrasónico de separación selectiva, en el que todas las partículas con diámetros de 20 μm abandonan el dispositivo a través del canal de salida del fluido puro colector, mientras que el resto de las suspensión, conteniendo las pequeñas partículas de 6 μm , circulando por su "cauce" izquierdo, sale a través del
25 canal correspondiente.

Figura 10

30 *Esquema del proceso de fabricación del microdispositivo de la invención usando un material fotodefinible como material estructural*

a) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible sobre la superficie de un sustrato independiente,
b) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible sobre la superficie de un sustrato independiente recubierto con un material antiadherente, c) Sellado de la oblea 1 y la oblea 2, y d) Retirada de la oblea recubierta con material antiadherente.
35

Figura 11

40 *Diseño microdispositivo de la invención donde canales cerrados en sus extremos y rellenos de aire son dispuestos estratégicamente respecto al canal central para minimizar la pérdida de energía en el proceso de transmisión a través del sustrato. a) Chip visto desde arriba, b) Sección transversal del chip.*

Figura 12

Esquema del proceso de fabricación de microdispositivo de la invención usando la técnica de estampación caliente

50 a) Preparación de un molde en el que se incluyen los diseños de canales deseados, b) Moldeado del sustrato a utilizar usando el molde obtenido en a), mediante la acción de presión y/o temperatura, y c) Sellado del sustrato mediante el pegado con otro material plástico bajo la acción de presión y/o temperatura y/o activación superficial por plasma de oxígeno.

Ejemplos de la invención

Ejemplo 1

60 *Fabricación y uso del microdispositivo de separación y extracción de partículas*

1.1.- Fabricación de un prototipo del microdispositivo de la invención

65 En el prototipo presentado en la Figura 4, el material estructural utilizado para la realización de los canales fluidicos ha sido el polímero fotodefinible SU-8, acoplado mecánicamente a un sustrato de PMMA, que constituye el fondo de los canales del dispositivo. Este material presenta propiedades muy convenientes para la fabricación de dispositivos debido a su alta definición (dentro del orden del micrometro), verticalidad en las paredes reveladas [ref2], biocompatibilidad [ref3], ancho rango de espesores [ref1] y posibilidad de pegado de varias capas consecutivas [ref4].

ES 2 326 109 B1

El procedimiento de fabricación de este prototipo del dispositivo de la invención utilizado y de acuerdo con el diseño de la Figura 1 es el siguiente (ver Figura 10):

- 5 a) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible, sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 1),
- b) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible SU-8 sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 2) recubierto con un material antiadherente,
- 10 c) Sellado de la oblea 1 y la oblea 2 enfrentado dichas obleas por la cara que contiene el material polimérico fotodefinible, y
- d) Retirada de la oblea recubierta con material antiadherente.

15 El prototipo del microdispositivo se ha diseñado y fabricado de tal forma que comprende un chip (100) con un sistema integrado de 4 microcanales (160, 162, 170 y 180), centrados en torno a un canal central de tratamiento (110), dos de ellos en cada extremo del mismo, situados de forma no simétrica, tanto para la entrada como para la salida de dos medios que circulan en paralelo en régimen laminar a lo largo del canal (110) (ver Figuras 1, 2, y 3). Uno de estos medios es la suspensión (150) de la que se van a extraer ciertas partículas (101) y el otro es un líquido puro (124) que
20 actuará como colector ultrasónico de las partículas (101).

Como se observa en la fotografía de la Figura 4, el dispositivo lleva integrado en uno de sus laterales un actuador o transductor ultrasónico (190), consistente en una pequeña cerámica piezoeléctrica de área rectangular de PZ26 resonante en su modo "thickness" (espesor) a 1 MHz, parcialmente pegada en una de sus superficies metalizadas al
25 espesor del chip constituido por SU-8 y el sustrato PMMA en uno de sus bordes laterales y ocupando parcialmente su espesor y dispuesta paralelo al canal de tratamiento. La fuente de ultrasonidos está dispuesta en contacto perpendicular con el chip, transmitiendo la energía ultrasónica en una dirección perpendicular al mismo, de manera que la transmisión de la energía acústica al medio dentro del canal se produce perpendicularmente a la dirección del flujo.

30 Más concretamente, el ancho del canal es de $390 \pm 4,6 \mu\text{m}$ (1,06 veces el cuarto de la longitud de onda para 1 MHz). El nodo de presión se encuentra localizado a una distancia de $117 \pm 4,6 \mu\text{m}$ de la pared reflectora, en la zona ocupada por el lecho del fluido puro, ajeno a la suspensión. Así, el canal tiene una sección transversal de $0,0975 \text{ mm}^2$ y una longitud que puede variar libremente, aunque en el ejemplo concreto de la invención es de 1 cm. De esta forma, el volumen del canal es de $0,975 \text{ mm}^3$.

35

1.2.- *Uso del microdispositivo de la invención para la separación de micropartículas que mimetizan células*

Para el control microfluídico del microdispositivo de la invención se usó una bomba de inyección de presión constante con capacidad de aplicación simultánea sobre tres jeringuillas de diferentes volúmenes (entre $10 \mu\text{L}$ y 110 mL) para controlar el flujo de ambos medios en cada una de las entradas (160 y 162). La suspensión (150) y el fluido colector (124) fueron inyectados simultáneamente con la misma presión mediante jeringuillas del mismo volumen (5 mL cada una) a través de estas entradas (160 y 162), respectivamente.

45 La separación ultrasónica de las partículas seleccionadas y su conducción al nodo de presión, en el lecho del fluido colector (124), fueron monitorizadas en tiempo real usando filmaciones de resolución microscópica con una cámara CCD acoplada a un conjunto de lentes ópticas con una resolución de $1,17 \mu\text{m}$ por pixel digital. El ancho del lecho de flujo ocupado por la suspensión se mantuvo en torno a $1/2$ del ancho del canal (110).

50 El modelo utilizado para la experimentación en este ejemplo es un modelo de micropartículas de poliestireno de tamaños y densidades que mimetizan las características físico-acústicas de dos tipos de células: eritrocitos y células tumorales exfoliadas en sangre periférica, fluyendo inicialmente juntas en un fluido asimilable al plasma sanguíneo.

Las características físico-acústicas de este fluido, tales como su densidad y velocidad de propagación acústica, son descritas en la literatura (Cousins CM, Holownia P, Hawkes JJ, Limaye MS, Price CP, Keay P, Coakley WT, Plasma preparation from whole blood using ultrasound. *Ultrasound Med Biol* 26:881-888, 2000), así como las de los eritrocitos (Duck F A, *Physical properties of tissue: a comprehensive referent book*, Academia London, 1990, Haider L, Snabre P, Boynard M, *Rheology and ultrasound scattering from aggregated red cell suspensions in shear flow*, *Biophysical Journal*, Vol. 87, 2322-2334, 2004). Por el contrario, la inexistencia de referencias bibliográficas sobre estas propiedades para las células tumorales circulantes en sangre periférica, obligó a determinar dichos datos de forma indirecta mediante el desarrollo de un modelo experimental de inducción. Para ello, se recurrió a la caracterización acústica de dos medios líquidos utilizados habitualmente en laboratorios oncológicos para separación celular por centrifugación y gradiente de densidad: Ficoll® y otro medio líquido no definido técnicamente pero utilizado en un dispositivo experimental denominado Oncoquick®, muy eficaz en la separación de células tumorales por su densidad,
65 sobre el cual las células tumorales exfoliadas en sangre periférica permanecen flotando [Rosenberg R, Gertler R, Friedrichs J, Fuehrer K, Dahm M, Phelps R, Trovan S, Nekarda H, Siewert JR. Comparison of two density gradient centrifugation systems for the enrichment of disseminated tumor cells in blood. *Cytometry* 49; 150-158. 2002].

ES 2 326 109 B1

A partir de las medidas de densidad y velocidad de propagación del sonido en ambos medios líquidos se derivó el margen de variabilidad posible para la densidad de las células tumorales: $1,030 \text{ gr/cm}^3 < \rho(\text{células tumorales}) < 1,055 \text{ gr/cm}^3$, con un grado de incertidumbre inferior a un 5% del valor mínimo. A partir de estos datos, y teniendo en cuenta la dependencia aproximadamente lineal para microelementos biológicos, se pudo realizar una estimación de su compresibilidad, seleccionando, para este ejemplo, partículas con una densidad de $1,05 \text{ gr/cm}^3$, como representativas de las células tumorales.

Una vez caracterizadas las células tumorales con este modelo experimental, fueron mimetizadas por partículas de poliestireno con diámetros seleccionados de $20 \mu\text{m}$. Aunque el rango de variabilidad de estas células es muy amplio (se puede definir entre 10 y $40 \mu\text{m}$) se eligió este tamaño como un valor standard.

Así, se procedió a la introducción y análisis de suspensiones acuosas “bi-dispersas”, es decir, conteniendo dos poblaciones de partículas, de 6 y 20 micras de diámetro respectivamente en diferentes concentraciones y sometidas a los ultrasonidos en el dispositivo. Los resultados de separación selectiva y extracción de las partículas grandes pueden verse claramente en la Figuras 6, 7, 8 y 9.

Los resultados de separación selectiva de las partículas de $20 \mu\text{m}$ fueron positivos para todas las pruebas realizadas, para diversas velocidades de flujo de las muestras inyectadas a través del canal central de tratamiento (en un rango de variabilidad entre y $0,06 \text{ mm/s}$ y $1,4 \text{ mm/s}$), siempre dentro del régimen laminar requerido en la microfluídica. Se usaron suspensiones acuosas bidispersas: con diferentes concentraciones volumétricas de partículas pequeñas ($6 \mu\text{m}$), no cuantificadas, de partículas grandes con diámetros de $20 \mu\text{m}$ en muy baja concentración, siempre inferior al 1%. Todos los experimentos se realizaron a la frecuencia determinada por el ancho del canal, estratégicamente determinado en función de la frecuencia resonante de la cerámica piezoeléctrica PZ26, de 1 MHz. Como fluido puro se utilizó siempre agua desionizada.

Más concretamente, en el canal central se introdujeron en paralelo los dos medios: una suspensión (150) de la que extraer partículas de ciertas características (101) (concretamente, partículas de diámetro de $20 \mu\text{m}$ y densidad de $1,05 \text{ gr/cm}^3$) y un fluido líquido (agua desionizada) (124), a través de dos canales (160 y 162), ambos con la misma sección ($0,049 \text{ mm}^2$) e integrados en el chip de la invención, cada uno de los cuales ocupa la mitad de la sección del canal central (110). Los dos medios fluyen a lo largo del canal (110) en paralelo y en régimen laminar en sus lechos correspondientes: el fluido puro que coleccionará las partículas (101) en un lecho de flujo (124) y la suspensión en el lecho (122) que ocupa la otra parte de la sección del canal (110), manteniendo estable la interfase que los separa (120). Este comportamiento se observa en las imágenes de la Figura 5 para dos velocidades de flujo continuo ($0,06 \text{ mm/s}$ y $1,4 \text{ mm/s}$ respectivamente). Tras recorrer la longitud del canal (110) ambos medios se separan en el punto de bifurcación (175) hacia dos canales de salida (170 y 180), por los que abandonan el dispositivo. Cuando la suspensión (150) fluye por su lecho (122) dentro del canal (110), aquellas partículas de un determinado tamaño y densidad (101) contenidas en la misma experimentan una fuerza de radiación debido al establecimiento de una onda estacionaria generada en el canal (110) por el transductor piezoeléctrico (190) ubicado externamente.

Para voltajes de alimentación 15 volts aplicados al transductor ultrasónico desde un generador de señal continua, las partículas de $20 \mu\text{m}$ (101) experimentan una fuerza de radiación y son rápidamente conducidas perpendicular al flujo continuo de la suspensión a lo largo del canal (110) por la acción del los ultrasonidos hacia el nodo de presión, ubicado en la zona ocupada por el fluido puro (agua) (124) (Figura 6), a lo largo del cual continuaron su circulación hacia el final del canal (Figura 7), abandonando de forma diferenciada el dispositivo por el canal de salida (180) inmersas en dicho fluido (124) y separadas del resto de la suspensión en la que se encontraban antes de la aplicación ultrasónica.

Por el contrario, las partículas pequeñas de $6 \mu\text{m}$ contenidas en la suspensión (107) en alta concentración, no son afectadas por el campo acústico y no experimentan ningún arrastre acústico, dado que la fuerza de radiación ejercida sobre ellas es mucho menor por ser proporcional a la potencia cúbica del radio, tres veces inferior al de las grandes (101). De esta manera, las partículas se mantienen circulando en la suspensión por su lecho inicial de flujo sin desviar sus trayectorias. Finalmente, abandonan el dispositivo por el canal de salida de la suspensión.

Las Figuras 8 y 9 presentan dos colecciones de fotogramas consecutivos en los que se aprecia claramente la circulación de las partículas de $20 \mu\text{m}$ una vez extraídas ultrasónicamente de su suspensión y arrastradas y colectadas en el fluido colector hacia el punto de bifurcación del canal central, desde donde abandonan el dispositivo a través del canal (180), separadas de su medio inicial. Dada la anchura del canal (110), algo mayor a un cuarto de la longitud de la onda acústica establecida en su interior, la formación del nodo de presión acústica se produce en una posición intermedia entre la pared del reflector y la interfase (120), aproximadamente en una posición correspondiente a $1/3 - 2/3$ de la anchura del canal (110) respectivamente. Las partículas (101) tenderán a concentrarse en la posición nodal de la onda estacionaria desde el momento en que durante su circulación a lo largo del canal (110) entran en la zona activa del campo acústico.

El resto de componentes de la suspensión (150) no son afectados por el campo acústico, no cruzarán la interfase (120) entre los dos medios (150 y 130) y mantienen su circulación fluyendo en su lecho correspondiente (122) a lo largo del canal microfluídico (110), hasta alcanzar el punto de bifurcación (175), a partir del cual abandonan el dispositivo a través del canal-ramal de salida (170).

ES 2 326 109 B1

Se destaca la elevada eficacia de separación selectiva y extracción de las partículas grandes de $20\ \mu\text{m}$ obtenida en la experimentación realizada con el dispositivo de la invención.

5 Como ejemplo, en experimentos en los que las muestras eran inyectadas en el canal de tratamiento mediante jeringuillas de 5 mL y una velocidad de circulación de las mismas en el canal de 1,4 mm/s (12 minutos para el vaciado de 1 mL) no se encontraron resultados negativos de actuación, en los que partículas grandes de $20\ \mu\text{m}$ desalojasen el dispositivo por el canal de salida de la suspensión, sino que eran continuamente conducidas hacia el fluido colector, por cuyo canal de salida desalojaban.

10 Un análisis cualitativo de visualización de las muestras recogidas a la salida de los dos canales (170) y (180) confirma la eficacia de separación selectiva y extracción de las partículas de $20\ \mu\text{m}$ de la suspensión en la que se hallaban inmersas antes del tratamiento ultrasónico. El líquido recogido durante 1 minuto del canal por el que desaloja la suspensión (170) sometida a la onda acústica no contiene partículas de $20\ \mu\text{m}$ y, sin embargo, presenta una presencia muy elevada de partículas más pequeñas, con diámetros de $6\ \mu\text{m}$. Por el contrario, el líquido recogido a la salida del canal (180) contiene partículas de poliestireno de $20\ \mu\text{m}$ que, como se observa previamente en el canal central (110) y en la zona de bifurcación (175) son separadas acústicamente de su suspensión inicial y extraídas al fluido colector (124), abandonando el dispositivo por el canal (180).

20 Estos experimentos se realizaron en condiciones de muy baja concentración para las partículas de $20\ \mu\text{m}$, muy inferior al 1% de su concentración volumétrica, simulando situaciones reales de células tumorales exfoliadas en sangre. Este comportamiento repetitivo encontrado en esta población de partículas para diferentes concentraciones (siempre por debajo del 10%) se debe y se explica por la actuación individual de la fuerza de radiación acústica sobre cada partícula, independiente de su concentración en la suspensión. La eficacia de actuación es válida tanto para concentraciones elevadas como para el caso de suspensiones extremadamente diluidas, para las que otras técnicas de separación
25 presentan fuertes caídas de sensibilidad y eficacia de actuación.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Microdispositivo de separación y extracción no invasiva y selectiva de partículas en suspensiones polidispersas **caracterizado** porque comprende, integrados en un chip-sustrato de material acústicamente blando, los siguientes componentes:

a) un sistema de microcanales de flujo de distribución espacial asimétrica de las ramas de canalización de salida desde el canal central de tratamiento (110) que comprende (ver Figura 1):

- i. un camino o lecho por el que fluye la suspensión de partida (150), que incluye un canal de entrada (160) para el suministro y otro de salida (170) por donde abandona el dispositivo, en paralelo con
- ii. un camino o lecho por el que fluye el fluido puro (124) al que se extraerán las partículas seleccionadas (al que se denomina lecho del fluido colector), incluyendo un canal de entrada o suministro (162) y otro de salida (180), que forman
- iii. un canal central de tratamiento (110) donde la suspensión de partida y el fluido puro están separados por una interfase frontera de líneas de corriente en régimen laminar definida por las dimensiones transversales del canal y que se bifurca al final de su recorrido (175) en dos canales de salida mencionados (170) y (180), donde el ancho del canal resonador presenta una relación con la longitud de onda inversamente proporcional a la frecuencia acústica, y donde *la profundidad del canal de tratamiento -que conforma junto al ancho su sección transversal- es sensiblemente inferior a un cuarto de la longitud de onda acústica,*

y,

b) un actuador o transductor ultrasónico en una de sus paredes laterales (190)

- externo y paralelo al canal central de tratamiento (110), que transmite la energía acústica al microcanal de tratamiento a través del sustrato y del material en el que está desarrollada la canalización, capaz de establecer una onda estacionaria en el interior del canal de tratamiento entre sus paredes laterales, produciendo un nodo de presión a una distancia de la pared reflectora de aproximadamente 1/3 y 2/3 del ancho del canal, respectivamente, y de producir un gradiente de presiones generado acústicamente en el interior del canal central con un efecto de conducción de ciertas partículas dentro del mismo hacia la región de equilibrio acústico definida en el nodo, donde la fuerza de radiación se anula, y

- cuya actuación incluye no sólo el canal central de tratamiento sino también la zona de bifurcación hacia los dos microcanales de salida con el objeto de aumentar al máximo la eficiencia de separación selectiva y extracción.

2. Microdispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el material acústicamente blando del chip-sustrato es un material cuya impedancia no supera en tres veces la impedancia de los medios líquidos, en un rango de variabilidad oscilante entre 0.8 MRayls y 2.6 MRayls.

3. Microdispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el material acústicamente blando del chip-sustrato es un material acrílico.

4. Microdispositivo según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el material acrílico es un epoxy de resina SU-8 sobre el que se realiza el canal y el sustrato acrílico es PMMA "Polimetacrilato de Metilo", presentan una impedancia acústica de 3.3 MRayls, y donde el transductor ultrasónico b) consiste en una pequeña cerámica piezoeléctrica, preferentemente, un dispositivo de la marca PZT26.

5. Procedimiento de fabricación del microdispositivo según las reivindicaciones 1 a 4 mediante técnica de XXXX de acuerdo al diseño descrito en la Figura 1 y que comprende las siguientes etapas (ver Figura 10):

- a) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible, sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 1),
- b) Deposición y definición de una capa polimérica fotodefinible SU-8 sobre la superficie de un sustrato independiente (oblea 2) recubierto con un material antiadherente,
- c) Sellado de la oblea 1 y la oblea 2 enfrentado dichas obleas por la cara que contiene el material polimérico fotodefinible, y
- d) Retirada de la oblea recubierta con material antiadherente.

ES 2 326 109 B1

6. Procedimiento de fabricación del microdispositivo según las reivindicaciones 1 a la 4 mediante la técnica de estampación en caliente combinadas con un proceso de pegado posterior, que comprende las siguientes etapas:

- a) Preparación de un molde en el que se incluyen los diseños de canales deseados,
- b) Moldeado del sustrato a utilizar usando el molde obtenido en a), mediante la acción de presión y/o temperatura, y
- c) Sellado del sustrato mediante el pegado con otro material plástico bajo la acción de presión y/o temperatura y/o activación superficial por plasma de oxígeno.

7. Uso del microdispositivo según las reivindicaciones 1 a la 4 en un procedimiento de separación no invasiva selectiva, lavado y/o clasificación de partículas en suspensiones polidispersas.

8. Uso del microdispositivo según la reivindicación 7 **caracterizado** porque las partículas consisten en células, preferentemente, virus, priones, células procariotas (por ejemplo, bacterias, levaduras, hongos y algas) y células eucariotas.

9. Uso del microdispositivo según la reivindicación 8 **caracterizado** porque las células eucariotas son, preferentemente células humanas, más preferentemente células tumorales, células sanguíneas, células troncales o células madre, ya sean somáticas o embrionarias, u de otro tipo presentes en fluidos corporales, como por ejemplo: sangre, orina, líquido cefalorraquídeo o presentes en otros tipos de muestras biológicas.

10. Uso del microdispositivo según la reivindicación 9 **caracterizado** porque dicho procedimiento de separación de células eucariotas tiene por objeto el tratamiento de enfermedades humanas pertenece al siguiente grupo: donaciones de sangre, plasmaféresis, procesos de diálisis y análisis de laboratorio, así como reciclado y/o lavado de sangre tras operaciones quirúrgicas.

11. Uso del microdispositivo según la reivindicación 9 **caracterizado** porque dicho procedimiento de separación de células eucariotas tiene por objeto el diagnóstico y pronóstico de cáncer en seres humanos para la separación selectiva y extracción de células tumorales circulantes en sangre periférica (CTC) de pacientes oncológicos.

12. Uso del microdispositivo según la reivindicación 9 **caracterizado** porque dicho procedimiento de separación de células eucariotas tiene por objeto el diagnóstico y/o tratamiento de enfermedades humanas para la separación selectiva y extracción de células dañadas o alteradas de pacientes, las cuales pueden ser reparadas *ex vivo* y administradas de nuevo al paciente.

13. Uso del microdispositivo según la reivindicación 9 **caracterizado** porque dicho procedimiento de separación de células eucariotas tiene por objeto el aislamiento de células madre humanas o animales provenientes de distintos tejidos o fluidos.

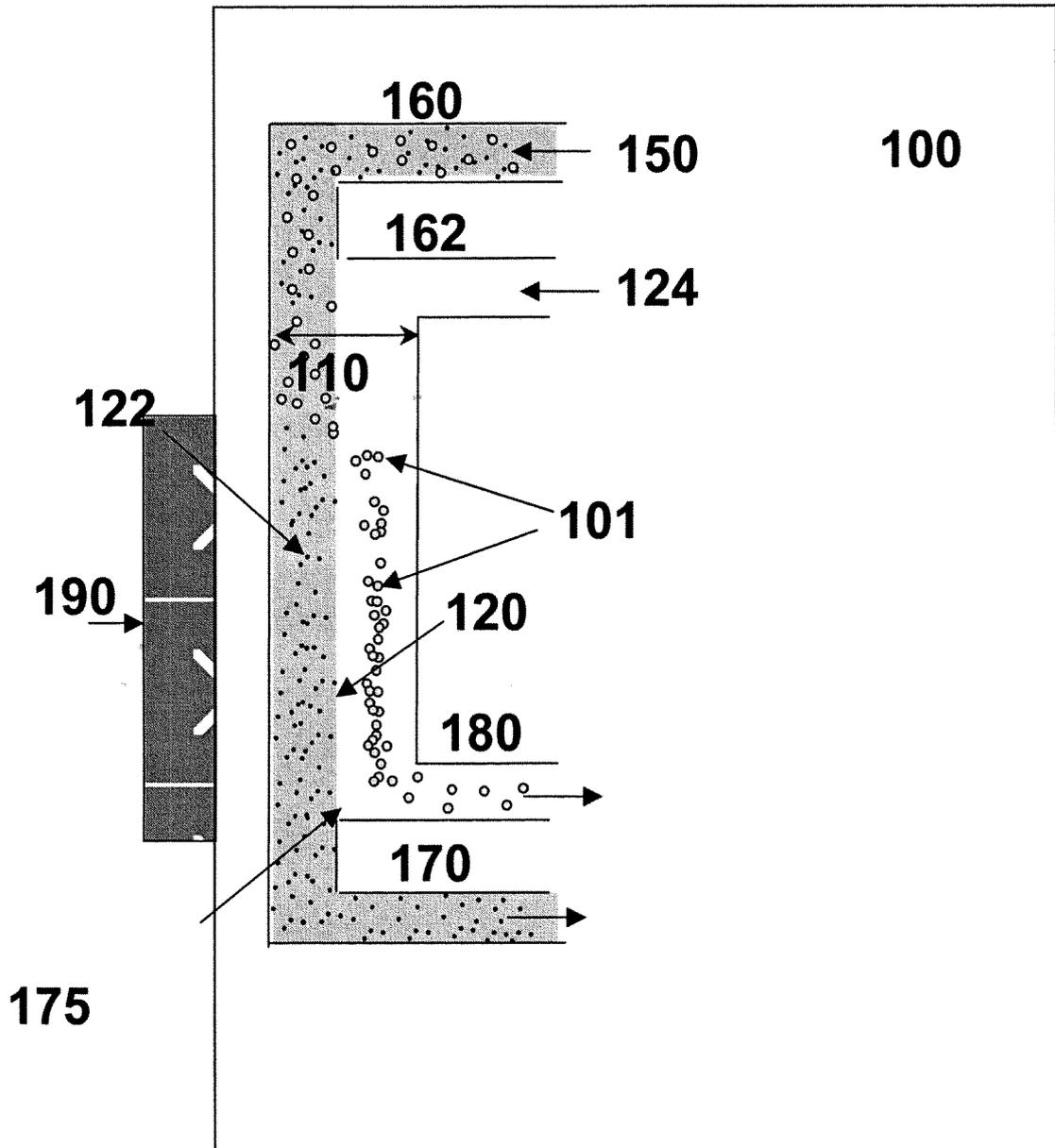
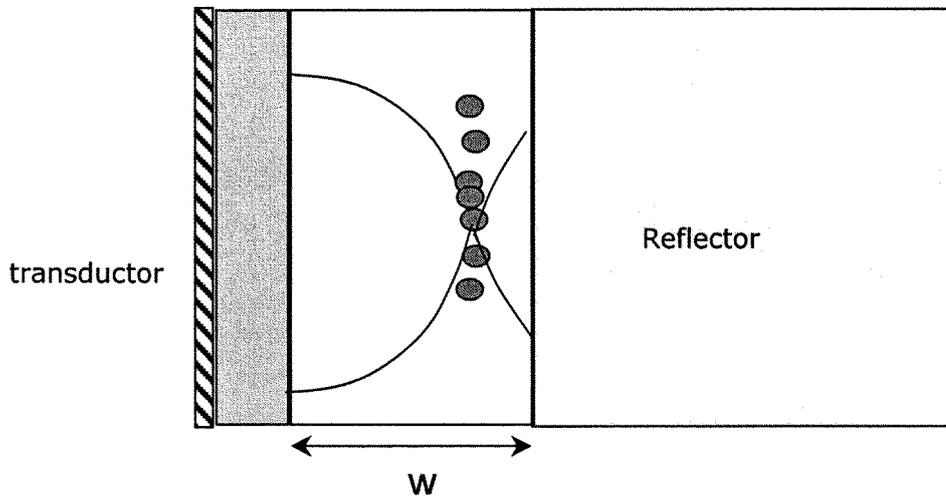


Figura 1



[i1]

Figura 2

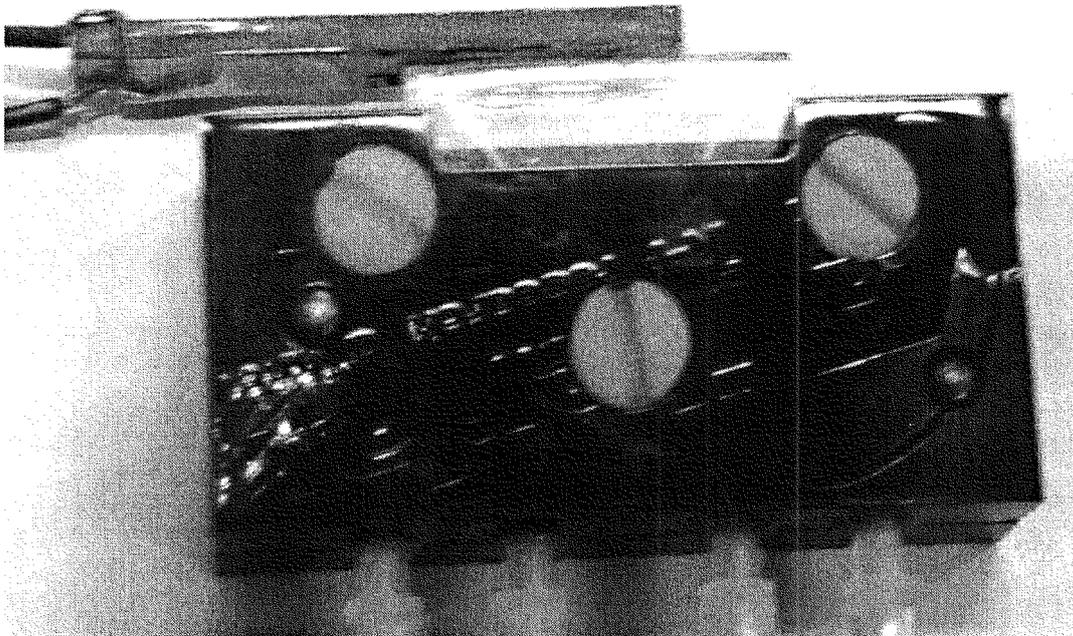
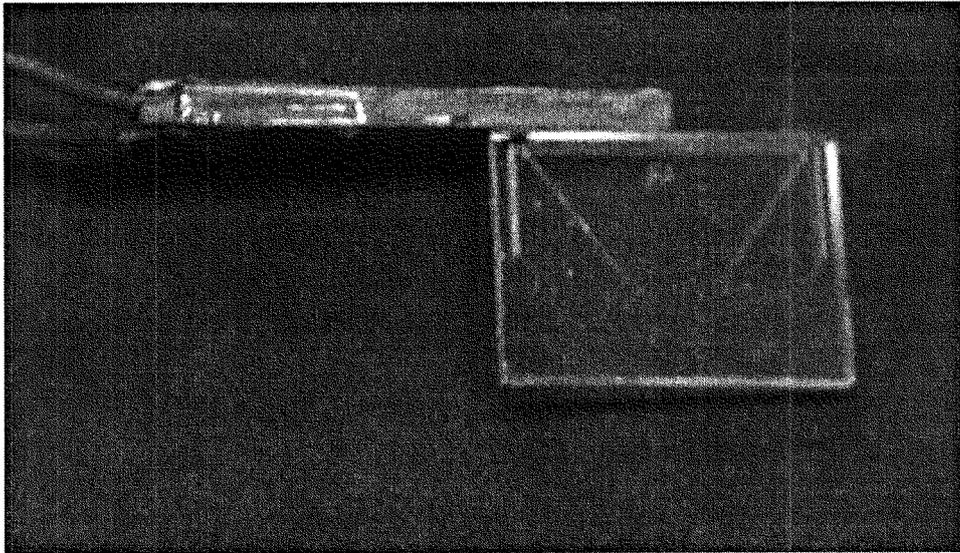
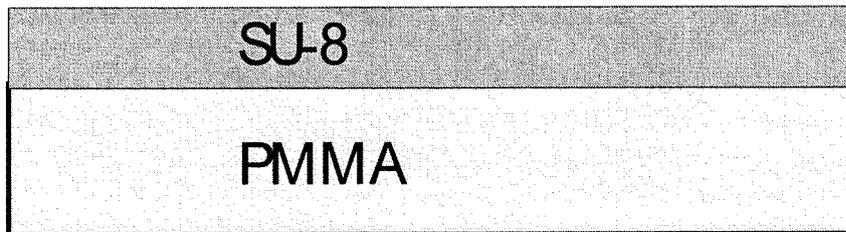


Figura 3

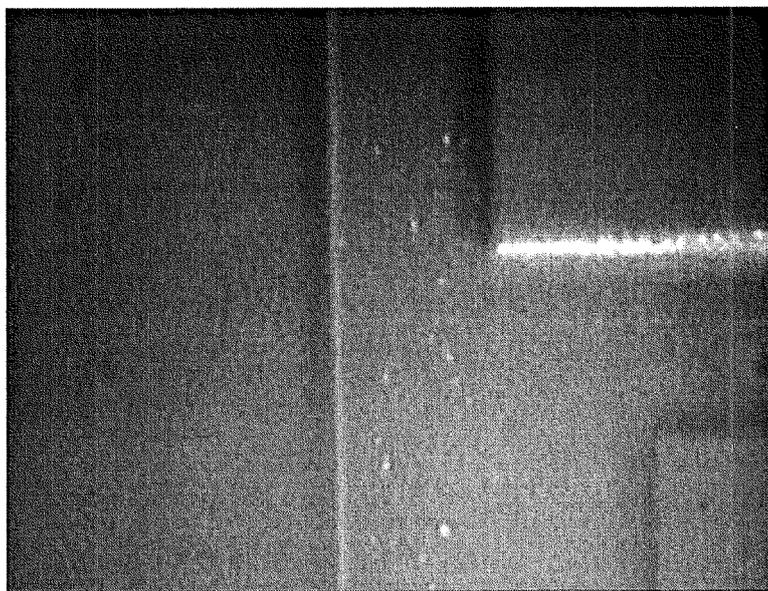


4.a

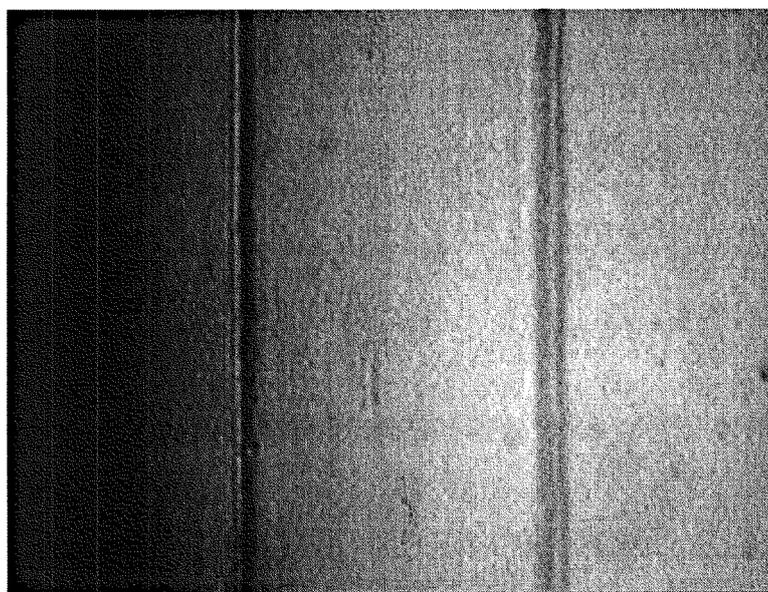


4.b

Figura 4



[12] (5.a)



[13] (5.b)

Figura 5

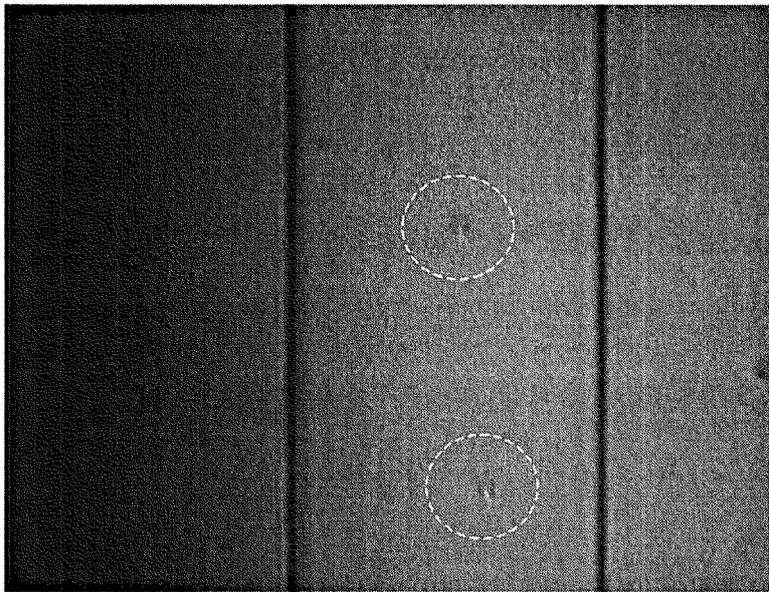
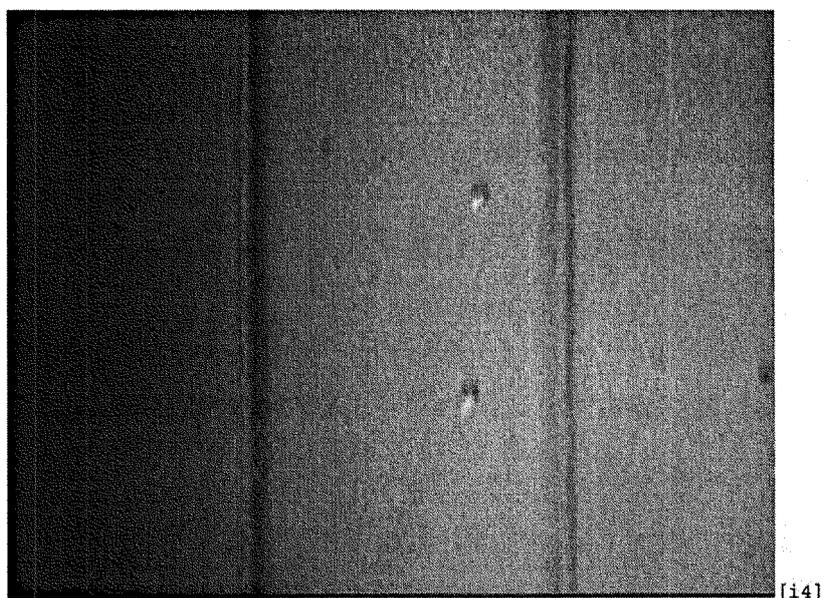


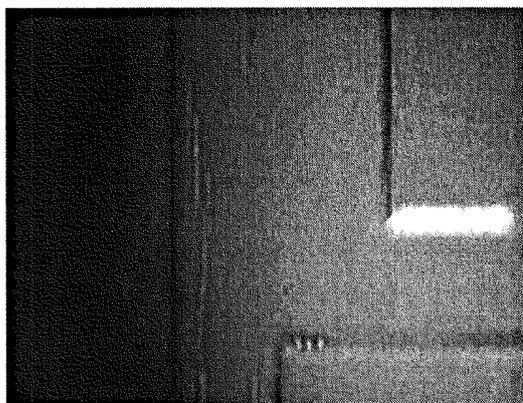
Figura 6



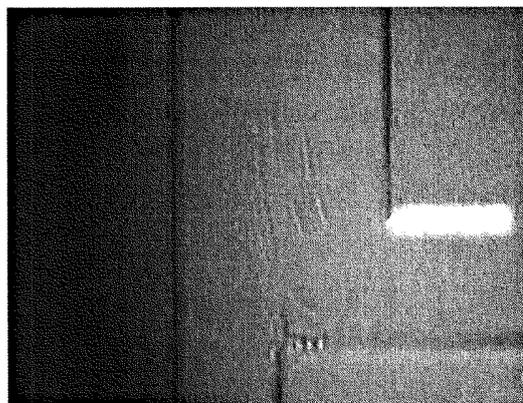
[i4]

[i5]

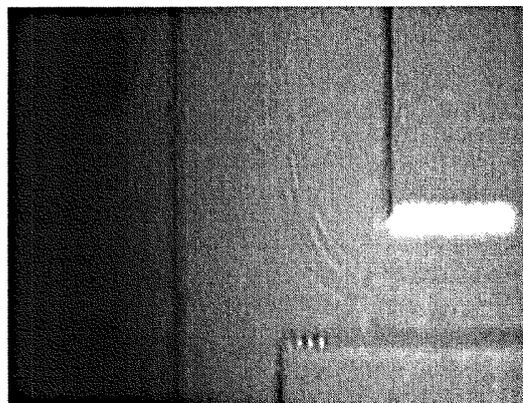
Figura 7



[16] (8.a)



[17] (8.b)

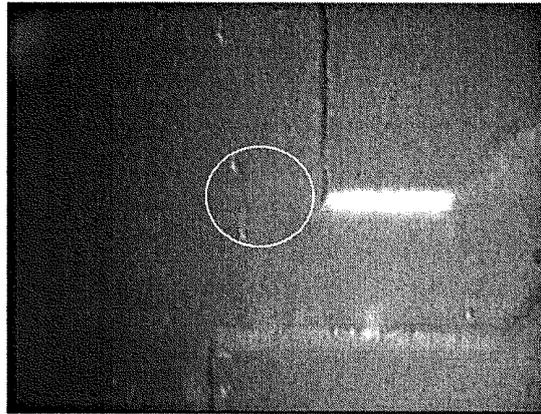


[18] (8.c)

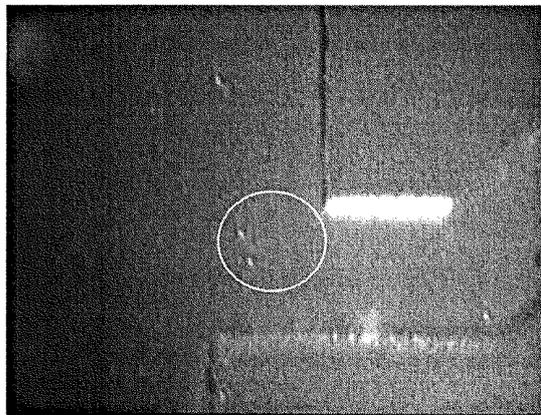


[19] (8.d)

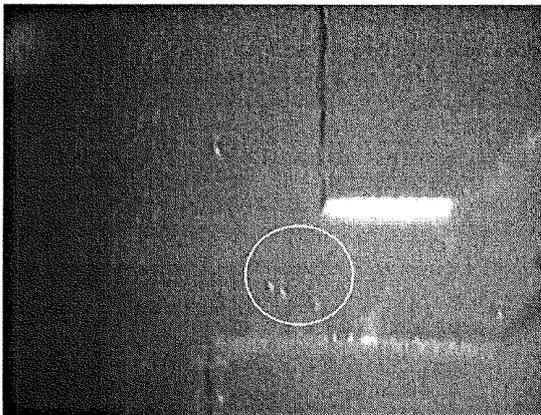
Figura 8



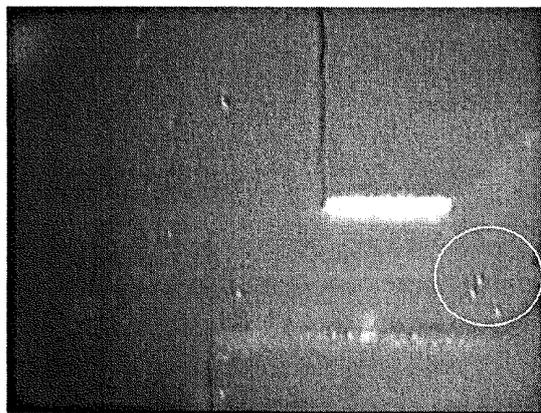
(9.a)



(9.b)



(9.c)



(9.d)

Figura 9

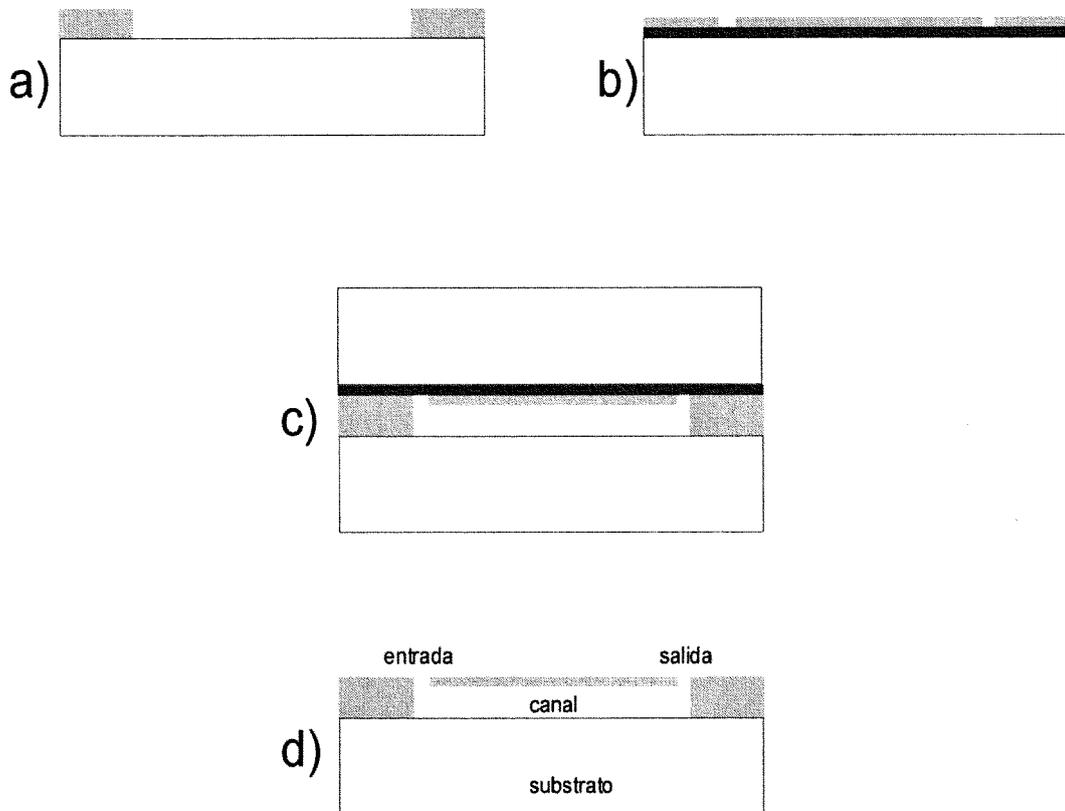


Figura 10

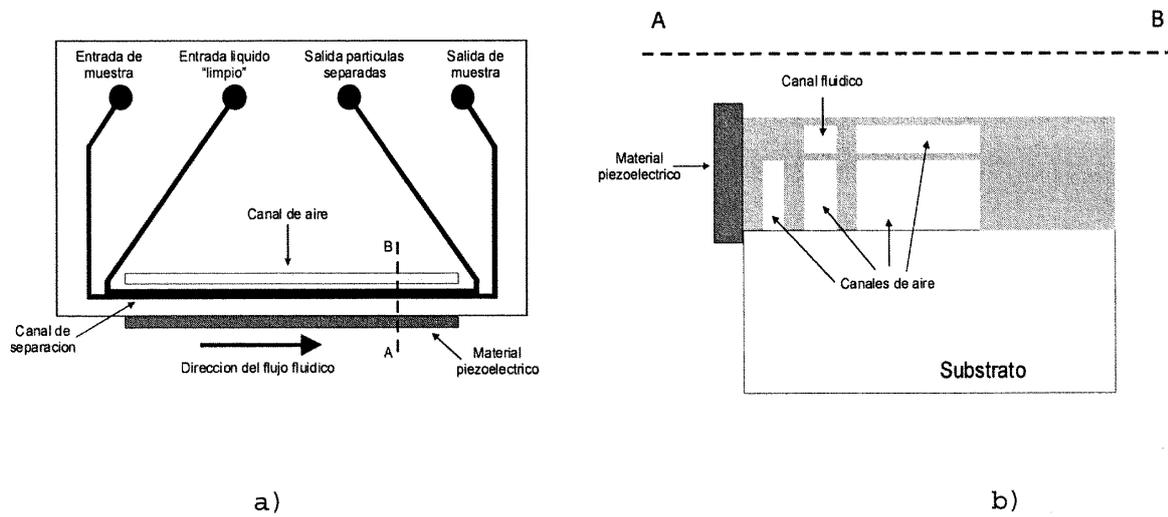
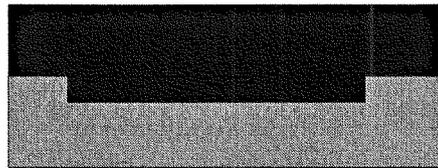


Figura 11

A



B



C



Figura 12



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 326 109

② N° de solicitud: 200703248

③ Fecha de presentación de la solicitud: 05.12.2007

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	LI H et al. "High speed particles separation using ultrasound for micro TAS and lab-on-a-chip application" Proceedings of the 26th. annual international conference of the IEEE. Engineering in Medicine and Biology Society. EMBS. San Francisco, 2004, Vol. 4, páginas 2631-2634.	1-13
A	YANG H at al. "P2E-2 Study of Particles Separation in the Ultrasonic Microdevice" Ultrasonics Symposium, 2007 IEEE. Piscataway, 2007, páginas 1594-1597.	1-13
A	HILL M et al. "An ultrasonic MEMS particle separator with thick film piezoelectric actuation" Ultrasonics Symposium, 2005 IEEE. Piscataway 2005, páginas 1160-1163.	1-13
A	TOWNSEND R J et al. "Investigation of two-dimensional acoustic resonant modes in a particle separator" Ultrasonics, Netherlands 2006, Vol. 44 Suppl. 1, páginas e467-e471.	1-13
A	WO 2006032703 A1 (SPECTRONIC AB) 30.03.2006, todo el documento.	1-13
A	WO 02072234 A1 (ALLERS M et al.) 19.09.2002, todo el documento.	1-13
A	WO 9817373 A1 (UNIV COLLEGE CARDIFF) 30.04.1998, todo el documento.	1-13

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.09.2009

Examinador

A. Cardenas Villar

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

B01D 43/00 (2006.01)

B01J 8/16 (2006.01)

A61M 1/34 (2006.01)