

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 042126

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.17

(51) Int. Cl. B01L 3/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
202090801

(22) Дата подачи заявки
2018.09.21

(54) СПОСОБ И УСТРОЙСТВО ДЛЯ УМЕНЬШЕНИЯ ОБЪЕМА ПРОБЫ

(31) 102017000105911

(56) WO-A1-2010038141

(32) 2017.09.21

US-A-5234667

(33) IT

WO-A1-2013098792

(43) 2020.08.31

WO-A1-2013003309

(86) PCT/IB2018/057303

(87) WO 2019/058321 2019.03.28

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕНАРИНИ СИЛИКОН
БАЙОСИСТЕМЗ С.П.А. (IT)

(72) Изобретатель:
Медоро Джанни, Каланка Алекс,
Альберти Фабрицио (IT)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Способ и устройство для сокращения объема пробы (2), где способ содержит этап ускорения, во время которого контейнер (6), содержащий пробу (2), ускоряется таким образом, что часть жидкого компонента (3) пробы (2) вытекает из отверстия (8') одного конца (8) контейнера (6), причем в соответствии с некоторыми вариантами воплощения контейнер (6) изготовлен для вращения вокруг оси (A) вращения, проходящей через контейнер (6), и контейнер (6) ориентирован радиально относительно оси (A) вращения с его отверстием (8'), обращенным наружу.

042126 B1

042126 B1

042126

B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка испрашивает приоритет по заявке на патент Италии № 102017000105911, поданной 21 сентября 2017 г., раскрытие которой включено посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к способу и устройству для уменьшения объема пробы.

Уровень техники

Известно, что биологические образцы следует обрабатывать по-разному, чтобы получать выделение микрочастиц определенных типов (обычно клеток).

Примерами в этом отношении являются устройства и способы, описанные в патентных заявках PCT/IB2010/000615, PCT/IB2010/000580 (относительно системы DEP Array TM).

Обычно в конце вышеуказанных обработок получают пробы, в которых микрочастицы введены в жидкий компонент. В связи с вышеизложенным следует отметить, что жидкий компонент обычно представляет собой буфер, который не может быть использован на последующих фазах анализа, и что объем проб обычно слишком велик. Например, пробы, полученные после использования системы DEP Array TM, имеют объемы приблизительно 13 μ л, в то время как последующие фазы (такие как WGA, Whole Genome Amplification - амплификация целого генома) требуют объемов в несколько микролитров, в частности менее 5 μ л, более того, менее 1,5 μ л.

Поэтому необходимо, чтобы пробы обрабатывались центрифугированием на высокой скорости и чтобы оператор вручную собирал избыточную жидкость с большой осторожностью и вниманием, используя пипетку (и наклоняя контрольную пробирку, содержащую пробу). Этот процесс влечет за собой множество проблем. К ним относятся следующие:

- успех операций в значительной степени зависит от способностей оператора, который должен быть надлежащим образом обучен и должен периодически практиковаться;

- существует риск, который может быть высоким, если оператор не работает правильно, удаления микрочастицы вместе с избыточной жидкостью;

- уровень успешности процедуры не является надежным и всегда воспроизводимым, а также зависит от типа используемого буфера;

- операции являются относительно медленными (для выделения 96 проб требуется приблизительно 3 ч);

- процедура требует особой осторожности, например, использования специально предусмотренных пипеток и двойных фильтрующих наконечников без загрязнения для снижения риска загрязнения пробы во время обработки оператором;

- существует относительно высокий риск повреждения микрочастицы/микрочастиц из-за центрифугирования, которое, как было сказано, осуществляется с относительно высокими скоростями (следовательно, давая относительно высокую нагрузку на микрочастицу/микрочастицы); и

- эта процедура не рекомендуется для применений в диагностике *in vitro* (IVD, ДИВ).

Аналогичные проблемы возникают, когда необходимо подготовить биологические пробы перед вышеуказанными обработками, чтобы получать изолирование определенных типов микрочастиц (обычно клеток). В этих случаях начальный и конечный объемы больше (как правило, приблизительно 200 и 12 μ л соответственно), но недостатками известных методов (центрифугирование при высокой скорости и последующие собирания вручную оператором) являются те, которые описаны выше, с добавлением того факта, что часто для получения желательного объема некоторые работы приходится проводить многократно.

Кроме того, практически идентичные проблемы встречаются и в других случаях, в которых объем пробы является малым (как например, окрашивание клеток, промывание клеток, смена буфера, фиксирование клеток, пермеабиллизация клеток и комбинация из них). Указанные проблемы усугубляются и тогда, если число микрочастиц (клеток) мало.

В более общем смысле до сих пор не были предложены способы, которые были бы удовлетворительными, достаточно точными и/или воспроизводимыми для уменьшения объема пробы с небольшими размерами.

Задачей настоящего изобретения является создание способа и устройства для уменьшения объема пробы, которые преодолевают, по меньшей мере, частично, недостатки известного уровня техники и, если возможно, одновременно просты и недороги для производства.

Сущность изобретения

Согласно настоящему изобретению предложены способ и устройство для уменьшения объема пробы, как заявлено в следующих независимых пунктах формулы изобретения и предпочтительно в любом из пунктов формулы изобретения, зависящих прямо или косвенно от независимых пунктов формулы изобретения.

Если явно не указано иное, в этом тексте следующие термины имеют значение, указанное ниже.

Под эквивалентным диаметром сечения мы подразумеваем диаметр круга, имеющего ту же площадь, что и сечение.

Под микрофлюидной системой мы подразумеваем систему, содержащую по меньшей мере один

микрофлюидный канал и/или по меньшей мере одну микрофлюидную камеру. Преимущественно, но не обязательно микрофлюидная система содержит по меньшей мере один насос (более конкретно, множество насосов), по меньшей мере один клапан (более конкретно, множество клапанов) и, если необходимо, по меньшей мере одну прокладку (более конкретно, множество прокладок).

В частности, под микрофлюидным каналом мы подразумеваем канал, имеющий сечение с эквивалентным диаметром меньше 0,5 мм.

В частности, микрофлюидная камера имеет высоту менее 0,5 мм. Более конкретно, микрофлюидная камера имеет ширину и длину, превышающие высоту (точнее по меньшей мере в пять раз больше высоты).

В настоящем тексте под микрочастицей мы подразумеваем наибольший размер клетки, составляющий меньше 500 $\mu\text{м}$ (преимущественно менее 150 $\mu\text{м}$). Согласно некоторым неограничивающим примерам микрочастицу выбирают из клеток, клеточного дебриса (в частности, клеточных фрагментов, например ДНК и/или РНК), клеточных агрегатов (таких как, например, небольшие скопления клеток, происходящих из стволовых клеток, таких как нейросферы или маммосферы), бактерий, липо-бус, микрошариков (в полистироле и/или магнитах), наношариков (например, наношариков размером до 100 нм), комплексов, образованных из микрошариков (в частности, магнитных; в частности, с наибольшим размером меньше 500 $\mu\text{м}$), связанных с клетками, циркулирующими опухолевыми клетками, связанными с феррофлюидом, экзосомами, коллоидной суспензией (например, феррофлюидом), липосомами, ядрами, спорами, а также комбинации из них. Преимущественно, но не обязательно микрочастицы представляют собой клетки.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения наибольший размер микрочастиц (преимущественно клеток и/или клеточного дебриса) составляет меньше 60 $\mu\text{м}$.

Размеры микрочастиц могут быть измерены стандартным способом с помощью микроскопов с градуированной шкалой или обычных микроскопов, используемых с предметными стеклами (на которые нанесены микрочастицы), имеющих градуированную шкалу.

В настоящем тексте под размерами микрочастицы мы подразумеваем длину, ширину и толщину микрочастицы.

Краткое описание фигур

Ниже описано изобретение со ссылкой на прилагающиеся чертежи, которые иллюстрируют несколько его неограничивающих вариантов воплощения, в которых

фиг. 1 и 2 представляют собой виды схематический и в перспективе устройства в соответствии с настоящим изобретением на последовательных рабочих фазах;

фиг. 3 представляет собой боковой разрез части устройства из фиг. 1;

фиг. 4 представляет собой вид спереди устройства из фиг. 1;

фиг. 5 представляет собой схематический вид спереди с некоторыми деталями, показанными прозрачно, из дополнительного варианта воплощения устройства в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 6 представляет собой вид в перспективе детали устройства из фиг. 5;

фиг. 7 представляет собой поперечное сечение детали из фиг. 6;

фиг. 8 представляет собой вид в перспективе детали из фиг. 6 с удаленными для ясности некоторыми компонентами;

фиг. 9 представляет собой схематический боковой разрез детали из дополнительного варианта воплощения устройства в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 10 представляет собой схематический вид детали из дополнительного варианта воплощения устройства в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 11 представляет собой схематический вид детали из дополнительного варианта воплощения устройства в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 12 представляет собой схематический боковой разрез компонента устройства из одной из предшествующих фигур;

фиг. 13-16 иллюстрируют схематически и в разрезе дополнительный вариант воплощения компонента из фиг. 12 в последовательных рабочих фазах;

фиг. 17 и 18 иллюстрируют схематически и в разрезе дополнительный вариант воплощения компонента из фиг. 12 в последовательных рабочих фазах;

фиг. 19 иллюстрирует деталь компонента из фиг. 17 в увеличенном масштабе;

фиг. 20-22 иллюстрируют сечения из альтернативных вариантов воплощения контейнеров, используемых в соответствии с настоящим изобретением;

фиг. 23, 24, 26 и 27 схематически иллюстрируют некоторые из сил, присутствующих во время реализации настоящего изобретения, ось X показывает расстояние от оси вращения, ось Y показывает силы;

фиг. 25 схематически иллюстрирует некоторые из сил, присутствующих во время реализации настоящего изобретения, ось X показывает расстояние относительно конца контейнера, ось Y показывает силы;

фиг. 28 и 29 схематически иллюстрируют некоторые из сил, присутствующих во время реализации

настоящего изобретения;

фиг. 30 является графическим представлением экспериментальных результатов, полученных с использованием способа из известного уровня техники; ось X показывает идентификацию оператора, который выполнял испытания; ось Y показывает объемы (в $\mu\text{л}$) полученных проб;

фиг. 31 является графическим представлением экспериментальных результатов, полученных с использованием способа из известного уровня техники; ось X показывает объемы (в $\mu\text{л}$) полученных проб; ось Y указывает повторяемость (число раз), с которой указанный объем был получен;

фиг. 32 является графическим представлением экспериментальных результатов, полученных путем апробации способа по настоящему изобретению со структурой, аналогичной той, которая показана на фиг. 27; ось Y показывает полученный объем (в $\mu\text{л}$); ось X показывает угловую скорость, использованную для эксперимента (об/мин); и

на фиг. 33 представлена блок-схема, относящаяся к возможным использованиям способа согласно настоящему изобретению.

Подробное описание

На фиг. 1 номер 1 обозначает все целиком устройство для уменьшения объема пробы 2 (фиг. 9, 10 и 23-29), содержащей по меньшей мере один (по меньшей мере, частично) жидкий компонент 3.

Устройство 1 (в частности, фиг. 1-11) содержит блок обработки 4, снабженный по меньшей мере одним гнездом 5 для поддержания (по меньшей мере, частично), по меньшей мере одного контейнера 6 (фиг. 7, 12 и 20-22), имеющего внутреннее пространство, закрытый конец 7, конец 8, снабженный отверстием 8', которое устанавливает контакт между внутренним и наружным пространством, а также (по меньшей мере) одной боковой стенкой 9 (которая проходит между концами 7 и 8). В частности, внутреннее пространство ограничено (по меньшей мере, частично) боковой стенкой 9 и закрытым концом 7.

В частности, контейнер 6 может быть вставлен и извлечен из блока обработки 4 (точнее может быть вставлен в гнездо 5 и удален из него). Более конкретно, устройство 1 содержит контейнер 6.

Блок обработки 4 содержит собирающее устройство 10 (в частности, фиг. 3, 4, 6, 7 и 12-19), которое приспособлено для сбора первой части указанного (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3, и располагается снаружи к гнезду 5 и близко (в зоне) указанного гнезда 5.

Блок обработки 4 приспособлен перемещать гнездо 5 таким образом, чтобы подвергать его воздействию ускорения (имеющего по меньшей мере один компонент), ориентированному собирающим устройством 10 по направлению к гнезду 5, в частности, таким образом, что первая часть указанного (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 вытекает из контейнера 6 (проходя через отверстие 8') и достигает собирающего устройства 10, а вторая часть (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 (в частности, по существу с определенным объемом) остается в контейнере 6, в частности в закрытом конце 7.

Следует отметить, что ускорение является векторной величиной (вектором), поэтому имеет модуль (интенсивность - абсолютное значение вектора) и направление. В частности, следует отметить, что ускорение (в отличие от замедления) понимается как положительное (следовательно, с положительным модулем) и, следовательно, влечет за собой увеличение скорости (в своем собственном направлении).

Более конкретно, используемое ускорение определяет по меньшей мере одну первую силу инерции на первой части пробы 2 и по меньшей мере одну вторую силу инерции на второй части пробы 2. Первая и вторая силы инерции ориентированы от первого закрытого конца 7 по направлению ко второму концу 8 в поперечном направлении (в частности, перпендикулярно) к указанному отверстию 8'. Блок обработки 4 приспособлен регулировать ускорение таким образом, чтобы первая инерционная сила была больше, чем первая удерживающая сила, действующая между первой частью пробы и контейнером 6, а вторая инерционная сила была меньше, чем вторая удерживающая сила, действующая между второй частью пробы и контейнером 6.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения (см., в частности, фиг. 9 и 25) блок обработки 4 содержит перемещающее устройство 11, которое приспособлено вынуждать контейнер 6 совершать по существу линейное перемещение, ускоренное в заданном направлении, таким образом, что гнездо 5 обращено вперед относительно заданного направления, а собирающее устройство 10 обращено назад относительно заданного направления (или точнее закрытый конец 7 обращен вперед, а конец 8 обращен назад). Другими словами, собирающее устройство 10 располагается ниже гнезда 5 в обозначенном заданном направлении.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения (см., в частности, фиг. 1-11, 23, 24, 26 и 27), блок обработки 4 содержит перемещающее устройство 11, которое приспособлено вращать гнездо 5 вокруг оси A вращения таким образом, что центробежная сила перемещает указанную первую часть указанного (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 (из контейнера 6) в собирающее устройство 10.

В некоторых случаях (гнездо 5 имеет такую форму, что) ось A вращения проходит через контейнер 6 между закрытым концом 7 и концом 8 (в частности, фиг. 7, 11, 24 и 27).

В качестве альтернативы (гнездо 5 имеет такую форму, что) закрытый конец 7 располагается между

осью вращения А и концом 8 (в частности, фиг. 10, 23 и 26).

В некоторых неограничивающих случаях собирающее устройство 10 содержит зону сбора, в которой (по меньшей мере, фракция) первой части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 собирается (для любых дополнительных последующих применений). В этих случаях собирающее устройство 10 может представлять собой, например, контрольную пробирку.

Преимущественно, но не обязательно (см., в частности, фиг. 12-19) собирающее устройство 10 содержит удерживающую систему 12 для удерживания (по меньшей мере, фракции) первой части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3.

Таким образом, исключается риск утечки порции первой части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 обратно в контейнер 6.

В частности, используемое собирающее устройство 10 (точнее удерживающая система 12) обращено к отверстию 8'.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения удерживающая система 12 содержит элемент, выбранный из группы, состоящей из поглощающего материала 13 (фиг. 12), капиллярной ловушки (фиг. 17-19), ловушки для жидкости (фиг. 13-16) (и комбинации из них).

Капиллярная ловушка (фиг. 17-19) содержит множество канавок 14, имеющих ширину меньше 2,0 мм, в частности меньше 0,9 мм (более конкретно, больше чем 0,5 мм). В этом случае жидкость поступает в канавки 14 благодаря силе (в частности, центробежной), воздействию которой она подвергается в то время как контейнер 6 ускоряется, и остается в указанных канавках 14 за счет капиллярности (поскольку сила поверхностного натяжения больше, чем сила тяжести). В частности, каждая канавка 14 имеет глубину по меньшей мере 2 мм (обычно вплоть до 7 мм).

Ловушка для жидкости содержит собирающую камеру 15 (фиг. 13-16), снабженную впуском 16, по меньшей мере одну подвижную стенку 17 (в данном случае две подвижных стенки 17), перемещающуюся между положением закрытия (фиг. 13 и 16), в котором она предотвращает (выпуск жидкости из сборной камеры 14 и выпуск из нее) прохождение жидкости через выпуск 16, и положение открытия (фиг. 14 и 15), в котором жидкость может проходить через выпуск. Стенка 17 приспособлена перемещаться в положение открытия, когда применяется используемое указанное ускорение. В частности, когда ускорение не применяется к стенке 17 (в более общем случае, когда к стенке 17 не прикладывается сила), стенка 17 находится в положении закрытия. Точнее, когда ускорение больше не применяется к гнезду 5, стенка 17 возвращается в положение закрытия. В частности, используемое собирающее устройство 10 обращено к отверстию 8'.

Точнее используемое ускорение переводит подвижную стенку 17 в положение открытия. Еще точнее используемое ускорение переводит подвижную стенку 17 в положение открытия, воздействуя прямо и/или косвенно на подвижную стенку. В частности, в некоторых случаях ускорение действует на, по меньшей мере, частично жидкий компонент 3, который толкает подвижную стенку 17.

В соответствии с некоторыми неограничивающими примерами стенка 17 является подвижной в том смысле, что она является (упругой) и/или деформируемой (упруго) шарнирной.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения поглощающий материал 13 представляет собой впитывающую бумагу (фиг. 12).

Преимущественно, но не обязательно блок обработки 4 содержит множество гнезд 5 (в частности, фиг. 8-10), каждое из которых приспособлено для размещения соответствующего контейнера 6. В частности, в этих случаях блок обработки 4 содержит перемещающее устройство 11, которое приспособлено вынуждать все гнезда 5 совершать одинаковое перемещение.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения (см., например, фиг. 8), гнезда 5 расположены согласно (по меньшей мере) одному ряду, по существу параллельному оси А вращения.

В некоторых случаях гнезда 5 располагаются в соответствии с множеством рядов, по существу параллельных оси А вращения. В этих случаях фиг. 10 показывает слой перемещающего устройства 11, который повторяется несколько раз. Другими словами, каждое гнездо 5 (из фиг. 10) является гнездом, принадлежащим ряду гнезд 5 (каждое из которых располагается вместе с другими гнездами 5 других рядов вокруг оси А).

Один или несколько гибких луночных планшетов могут быть установлены непосредственно на перемещающем устройстве 11 (точнее на роторе перемещающего устройства 11), в частности (изогнуты) вокруг оси А.

Следует отметить, что в соответствии с некоторыми предпочтительными, но неограничивающими вариантами воплощения проба содержит по меньшей мере одну микрочастицу 18 (в частности, множество микрочастиц 18).

С конкретной ссылкой на фиг. 11 в соответствии с некоторыми предпочтительными, но неограничивающими вариантами воплощения блок обработки 4 содержит множество дополнительных периферийных гнезд 19, которые располагаются вокруг оси А вращения и приспособлены размещать дополнительные контейнеры 6, содержащие (по меньшей мере, частично) жидкий компонент 3 и должны вращаться перемещающим устройством 11 вокруг оси А вращения так, чтобы центробежная сила прикла-

дывалась к (по меньшей мере, частично) жидкому компоненту 3, содержащемуся в дополнительных контейнерах 6, по направлению к закрытому концу 7 других контейнеров 6.

Таким образом, перемещающее устройство 11 за одно перемещение (вращение вокруг оси А) может одновременно уменьшать объем пробы 2, содержащейся в контейнере 6, расположенном в гнезде 5, и подготавливать пробы 2, содержащиеся в других контейнерах 6, расположенных в периферийных гнездах 19 (перемещающая микрочастицы 18 в закрытых концах 7).

В частности, дополнительные периферийные гнезда 19 располагаются вокруг гнезда 5, которое, в частности, располагается (в центральном положении) на оси А (точнее таким образом, чтобы ось А проходила через контейнер 6, расположенный в гнезде 5).

Преимущественно, но не обязательно блок обработки 4 содержит перемещающее устройство 20 (в частности, с кулачковым приводным механизмом, показанным только частично и схематично), которое приспособлено перемещать периферийное гнездо 8 (на практике становящееся гнездом 5) из его периферийного положения в положение, вокруг которого располагаются другие периферийные гнезда 8, и наоборот. На фиг. 11 это перемещение показано стрелкой Т.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения перемещающее устройство 20 приспособлено перемещать ряд (по существу параллельный оси А) периферийных гнезд 19. В этих случаях то, что показано на фиг. 11, представляет собой слой конструкции, которая предусматривает множество рядов периферийных гнезд 19 (полученных, например, в той же самой опоре 21).

Следует отметить, что гнездо 5 (в частности, опора 21) и собирающее устройство 10 составляют вместе картридж 22, который можно вынимать из блока обработки 4 и вставлять в него (в частности, вставлять и вынимать из перемещающего устройства 11).

Преимущественно, но не обязательно блок обработки 4 (в частности, перемещающее устройство 11) содержит датчик (типа, известного *per se* и не показанного) для обнаружения присутствия (и/или правильного расположения) картриджа 22 (в перемещающем устройстве 11).

Преимущественно, но не обязательно картридж 22 содержит перезаписываемую память (типа, известного *per se* и не показанного, например RFID (Radio Frequency IDentification, технологии радиочастотной идентификации)) и блок обработки 4 содержит считывающее и/или записывающее устройство (типа, известного *per se* и не показанного) перезаписываемой памяти. В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения информация может быть записана в перезаписываемую память относительно картриджа 22, например идентификация картриджа 22, параметры для использования картриджа и/или количество раз, в которых картридж 22 использовался. В частности, используемое устройство чтения и/или записи записывает в вышеуказанную память, когда соответствующий картридж 22 используется впервые и всякий раз, когда указанный картридж 22 устанавливают в перемещающем устройстве 11, она определяет, что это не первое использование и испускает сигнал ошибки. Это исключает неоднократное использование картриджа 22 и загрязнение проб 2.

Преимущественно, но не обязательно блок обработки 4 содержит опору 21, на которой имеется множество гнезд 5. В этих случаях картридж 22 содержит опору 21 и собирающее устройство 10.

С конкретной ссылкой на фиг. 8 согласно некоторым неограничивающим вариантам воплощения опора 21 имеет множество посадочных мест 5, расположенных в ряд.

В частности (фиг. 6 и 7), собирающее устройство 10 располагается над гнездами 5, более конкретно, чтобы закрывать отверстия 8' контейнеров 6. Более конкретно, собирающее устройство 10 располагается над опорой 21.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения, которые не показаны, блок обработки 4 содержит магнит (постоянный магнит и/или электромагнит), расположенный в гнезде 5.

В некоторых случаях магнит располагается в одном конце гнезда 5 напротив собирающего устройства 10. В частности, магнит располагается в закрытом конце 7. В некоторых случаях магнит приспособлен для снижения риска вытекания микрочастицы/микрочастиц 18 (которая содержит/которые содержат по меньшей мере одну магнитную функционализацию) из контейнера 6, в то время как используемый контейнер 6 ускоряется с помощью блока обработки 4 (в частности, с помощью перемещающего устройства 11).

Дополнительно или альтернативно блок обработки 4 содержит (дополнительный) магнит (постоянный магнит и/или электромагнит), расположенный в гнезде 5, расположенном в собирающем устройстве 10, в частности в одном конце гнезда 5, расположенного в собирающем устройстве 10. Более конкретно, магнит располагается в конце 8, более конкретно в отверстии 8'. В этих случаях магнит улучшает удаление нежелательных (магнитных) компонентов из пробы 2.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения блок обработки 4 также содержит подающее устройство F (например, показанное на фиг. 11), которое приспособлено подавать в контейнер 6 вещество (в частности, жидкость), такое как, например, реагент и/или буферный раствор. Подающее устройство F особенно полезно, когда желательно проведение дополнительных обработок (помимо простого уменьшения объема) в пробе 2 (например, окрашивания и/или пермеабиллизации, и/или промывания, и/или фиксации микрочастицы/микрочастиц 18).

Применительно к фиг. 5, в частности, перемещающее устройство 11 содержит двигатель 23 и ис-

полнительный механизм 24 (линейный или вращающийся). В вариантах воплощения по фиг. 1-8 исполнительный механизм 24 представляет собой ротор и имеет корпус Н для картриджа 22.

Предпочтительно, но не обязательно перемещающее устройство 11 также содержит тормоз 25, который приспособлен для блокирования перемещения гнезда 5 (в частности, исполнительного механизма 24).

В частности, блок обработки 4 также содержит управляющий блок 26 (фиг. 5), который приспособлен регулировать двигатель 23 (и при необходимости тормоз 25). Точнее управляющий блок 26 приспособлен управлять работой двигателя (и при необходимости тормозом 25) на основании получаемого конечного объема пробы 2 (и/или характеристик контрольных пробирок и/или жидкости).

Предпочтительно, но не обязательно управляющий блок 26 соединяется с вышеуказанным датчиком для обнаружения присутствия (и/или правильного расположения) картриджа 22 и приспособлен для обработки двигателем 23 (и при необходимости тормозом 25) на основе данных, обнаруженных датчиком. Точнее, если датчик не обнаруживает присутствие картриджа 22 или он обнаруживает неправильное расположение картриджа 22, то двигатель 23 не приводится в действие (управляющим блоком 26). Предпочтительно, но не обязательно управляющий блок 26 также управляет работой питающего устройства F.

Предпочтительно, но не обязательно управляющий блок 26 соединен с вышеуказанным считывающим и/или записывающим устройством и приспособлен для обработки двигателем 23 (и при необходимости тормозом 25) на основе данных, обнаруженных считывающим и/или записывающим устройством. Точнее, если считывающее и/или записывающее устройство обнаруживает, что картридж 22 не используется в первый раз, то управляющий блок 26 не приводит в действие двигатель 23.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения блок обработки 4 содержит интерфейс 27 оператора (HMI, Human Machine Interface - автоматизированное рабочее место), снабженный, например, сенсорным экраном и/или механическими кнопками.

Предпочтительно, но не обязательно блок обработки 4 также содержит крышку 28, которая перемещается между положением открытия и положением закрытия.

Когда крышка 28 находится в положении открытия, контейнер 6 (точнее картридж 22) может быть вставлен в перемещающее устройство 11 и извлечен из него. Другими словами, когда крышка 28 находится в положении открытия, вышеуказанный корпус Н доступен снаружи.

Когда крышка 28 находится в положении закрытия, невозможно вставить и/или извлечь контейнер 6 (в частности, картридж 22). Другими словами, корпус Н не доступен снаружи.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения (например, показанным на фиг. 1-4) подвижный блок содержит корпус Н, который скользит между наружным положением (фиг. 1) и внутренним положением (фиг. 2 и 3).

В этих случаях используемый контейнер 6 (точнее картридж 22) вставляется в корпус Н, расположенный в наружном положении. В этот момент корпус Н перемещается (с контейнером 6, точнее картриджем 22) во внутреннее положение. Во внутреннем положении используемый корпус вращается вокруг оси А.

Вариант воплощения фиг. 1-4 отличается от варианта осуществления фиг. 5-8, так как двигатель 3 и тормоз 25 находятся на одной стороне с исполнительным механизмом 24 (который также в этом случае является ротором; см., в частности, фиг. 3).

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения (фиг. 20) контейнер 6 представляет собой контрольную пробирку обычного типа (например, ПЦР-пробирки).

Предпочтительно, но не обязательно (фиг. 21) контейнер 6 имеет часть, расположенную на закрытом конце 7 с уменьшенным внутренним сечением (относительно обычной контрольной пробирки, в частности, указанное сечение имеет радиус менее 0,8 мм; точнее радиус составляет приблизительно 0,5 мм) и имеет по существу цилиндрическую форму. Этот тип геометрии обладает различными преимуществами, включающими возможность получения меньшего конечного объема пробы 2; и дополнительное увеличение воспроизводимости уменьшения объема.

Предпочтительно, но не обязательно (фиг. 22) контейнер 6 имеет внутреннее сужение 29 вблизи закрытого конца 7. В частности, внутренний объем части контейнера 6, расположенной между сужением 29 и закрытым концом 7, меньше начального объема пробы 2 и больше конечного объема, получаемого из пробы 2.

Этот тип геометрии уменьшает риск вытекания микрочастицы 18 из контейнера 6.

В соответствии с аспектом настоящего изобретения предусмотрен способ уменьшения объема пробы 2, содержащей по меньшей мере один (по меньшей мере, частично) жидкий компонент 3 и имеющей объем до 10 мл (в частности, вплоть до 2 мл).

Способ предусматривает использование по меньшей мере одного контейнера 6, как определено выше.

Способ содержит этап ускорения, во время которого блок обработки 4 перемещает контейнер 6, содержащий пробу 2, таким образом, чтобы подвергнуть контейнер воздействию ускорения (имеющему по меньшей мере один компонент), ориентированному от конца 8 по направлению к закрытому концу 7 и поперечному (в частности, перпендикулярному) отверстию 8' таким образом, что первая часть (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 вытекает из контейнера 6, проходя через указанное отверстие

8', и вторая часть (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 (в частности, с по существу определенным объемом) остается в контейнере 6, в частности в закрытом конце 7.

Предпочтительно, но не обязательно способ реализуют с помощью описанного выше устройства 1.

Предпочтительно, но не обязательно проба 2 содержит по меньшей мере одну микрочастицу 18 (в частности, множество микрочастиц 18). Во время этапа ускорения блок обработки 4 подвергает контейнер 6 воздействию ускорения таким образом, что микрочастица 18 остается в контейнере 6, в частности в закрытом конце 7.

Предпочтительно, но не обязательно способ содержит этап предварительной обработки, которая предшествует этапу ускорения, и во время которой контейнер 6, содержащий пробу 2, подвергается воздействию дополнительного ускорения (имеющему по меньшей мере один компонент), ориентированному от закрытого конца 7 по направлению к концу 8 (и поперечному, в частности перпендикулярному, к указанному отверстию 8') таким образом, чтобы микрочастица 18 располагалась в закрытом конце 7, в частности, в контакте с внутренней поверхностью 30 контейнера 6. В частности, этап предварительной обработки включает центрифугирование контейнера 6, содержащего пробу 2.

Экспериментально наблюдали, что таким способом риск вытекания микрочастицы 18 из контейнера 6 во время этапа ускорения еще больше снижается.

В этой связи следует отметить, что между микрочастицей 18 и внутренней поверхностью 30 создается адгезионная сила F_a , которая противостоит инерционной силе F_{ic} , которая прикладывается к микрочастице 18 во время этапа ускорения.

Вышеприведенное иллюстрировано на фиг. 28 и 29, которые показывают попытку объяснить то, что наблюдалось экспериментально. На фиг. 28 показан контейнер 6 и проба 2 в начале этапа ускорения. На фиг. 29 показан контейнер 6 и проба 2 в конце этапа ускорения.

На этих фигурах инерционная сила, приложенная к пробе 2, основана на количестве пробы 2 и обозначается как F_c , и удерживающая сила, которая поддерживает поверхность пробы без повреждений (и связана с поверхностными натяжениями в действии), обозначается как F_γ .

В частности, согласно некоторым вариантам воплощения на этапе ускорения как следствие ускорения, приложенного к контейнеру 6, на первую часть пробы 2 воздействует по меньшей мере одна первая инерционная сила, а на вторую часть пробы 2 - по меньшей мере одна вторая инерционная сила. Первая и вторая инерционные силы ориентированы от закрытого конца 7 по направлению к концу 8 (поперечно, в частности перпендикулярно) к отверстию 8'. Во время этапа ускорения первая инерционная сила больше первой удерживающей силы, действующей между первой частью пробы и контейнером 6, а вторая инерционная сила меньше второй удерживающей силы, действующей между второй частью пробы и контейнером 6. В частности, первая и вторая удерживающие силы определяются (главным образом) поверхностным натяжением пробы 2 и контейнером 6 (точнее боковой стенкой 9 контейнера 6).

В более подробном описании ниже и на фиг. 23-29 удерживающая сила указана как F_γ .

Предпочтительно, но не обязательно блок обработки 4 во время этапа ускорения подвергает одновременно множество контейнеров 6 (каждый из которых содержит соответствующую пробу 2) воздействию вышеуказанного ускорения. В частности, блок обработки 4 содержит множество гнезд 5, в каждом из которых размещается соответствующий контейнер 6.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения блок обработки 4 содержит перемещающее устройство 11, которое во время этапа ускорения придает контейнеру 6 по существу линейное перемещение в заданном направлении таким образом, что закрытый конец 7 обращен вперед относительно заданного направления, а конец 8 обращен назад относительно заданного направления (фиг. 9 и 25).

В соответствии с альтернативными вариантами воплощения блок обработки 4 содержит перемещающее устройство 11, которое во время этапа ускорения вращает контейнер 6 вокруг оси А вращения таким образом, что центробежная сила перемещает первую часть (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 из контейнера 6, проходящую через отверстие 8'.

В частности, во время этапа ускорения контейнер 6 ориентирован по существу радиально относительно оси А таким образом, что конец 8 обращен наружу.

Предпочтительно, но не обязательно ось А вращения проходит через контейнер 6 между закрытым концом 7 и концом 8. Таким образом, во время этапа ускорения контейнер по существу не может быть опорожнен сверх предела, определяемого положением оси А (другими словами, ниже оси А). В этих случаях путем выбора положения, в котором ось А проходит через контейнер 6, можно регулировать объем той части (по крайней мере частично) жидкого компонента 3, которая остается в контейнере 6.

В соответствии с альтернативными неограничивающими вариантами воплощения во время этапа ускорения закрытый конец 7 располагается между осью А вращения и концом 8. Таким образом (как будет объяснено более подробно ниже), объем второй части жидкого компонента 3 базируется на угловой скорости контейнера 6 во время этапа ускорения.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения микрочастицы 18 вытирают из группы, состоящей из клеток, клеточного дебриса (в частности, клеточных фрагментов, на-

пример ДНК и/или РНК), клеточных агрегатов (таких как, например, небольшие скопления клеток, происходящих из стволовых клеток, таких как нейросферы или маммосферы), бактерий, липошариков, микрошариков (изготовленных из полистирола и/или магнитных), наночастиц (например, наночастиц размером вплоть до 100 нм), комплексов, образованных из микрошариков (в частности, магнитных; в частности, с наибольшим размером меньше 500 мкм), связанных с клетками, циркулирующими опухолевыми клетками, связанными с феррофлюидом, экзосомами, коллоидными суспензиями (например, феррофлюидом), липосомами, ядрами, спорами, а также комбинации из них.

В частности, микрочастицы 18 выбирают из группы, состоящей из стволовых клеток, эритробластов, трофобластов, нейрональных клеток, эпителиальных клеток, опухолевых клеток, лейкоцитов (WBC), стромальных клеток, сперматозоидов, циркулирующих опухолевых клеток (CTC), эмбриональных клеток, микрошариков (в частности, с наибольшим размером меньше 500 мкм), коллоидной суспензии (например, феррофлюида), комплексов, образованных из микрошариков, связанных с клетками (например, стволовыми клетками, эритробластиками, трофобластиками, нейрональными клетками, эпителиальными клетками, опухолевыми клетками, лейкоцитами (WBC), стромальными клетками, сперматозоидами, циркулирующими опухолевыми клетками (CTC), фетальными клетками), эритроцитов, циркулирующих опухолевых клеток, связанных с феррофлюидом, и комбинации из них.

Предпочтительно, но не обязательно способ содержит этап регулировки, который предшествует этапу ускорения и во время которого расчетное ускорение (и/или расчетная угловая скорость) определяется (регулирующим блоком 6) на основе по существу определенного объема, который должен быть получен (и, в частности, геометрии контейнера и константы взаимодействия между материалом, составляющим указанную боковую стенку, и указанным жидким компонентом). Во время этапа ускорения воздействие ускорения, которому блок обработки 4 подвергает контейнер 6, является расчетным ускорением (и/или угловая скорость, с которой блок обработки 4 подвергает воздействию контейнер 6, является расчетной угловой скоростью).

Следует отметить, что в действительности угловая скорость и ускорение эквивалентны (для круговых движений), так как они связаны соотношением

$$a_c = \omega^2 \times d,$$

в котором a_c - центробежное ускорение,

ω - угловая скорость, и

d - расстояние от оси вращения.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения способ содержит этап вставки, во время которого пробу 2 вставляют в контейнер 6.

В частности, во время этапа вставки пробу 2 вставляют в контейнер 6 с помощью инструмента, выбранного из группы, состоящей из микрофлюидных устройств (например, содержащих струйную систему, в частности, полученную по струйной технологии), пипеточных инструментов, проточных цитометров, микроманипуляторов, оптических пинцетов. Согласно некоторым неограничивающим вариантам воплощения микрофлюидные устройства относятся к типам, описанным в патентных заявках с номерами публикаций WO 2010/106434 и WO 2012/085884.

Предпочтительно, но не обязательно пробу 2 выбирают таким образом, чтобы она содержала по меньшей мере одну микрочастицу 18, используя изображения, иммунофлуоресценцию, импеданс, размеры, геометрию, морфологические признаки и комбинацию из них.

В соответствии с конкретными неограничивающими вариантами воплощения используют микрофлюидное устройство, которое выбирает пробу, содержащую по меньшей мере одну микрочастицу 18 (заданного типа), используя изображения, иммунофлуоресценцию, импеданс, размеры, геометрию, морфологические признаки и комбинацию из них.

В некоторых случаях также можно предусмотреть этап обработки, который является последующим за этапом вставки и предшествующим этапу центрифугирования и во время которого проба обрабатывается, в частности, дополнительным веществом.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения дополнительное вещество представляет собой реагент (например, для окрашивания и/или придания проницаемости микрочастицам 18), который вставляется в контейнер. Альтернативно или дополнительно реагент является реагентом для фиксации микрочастиц 18.

Также можно предусмотреть стадию промывки, во время которой промывающая жидкость (моющий раствор - моющий буфер) вводится в контейнер 6 и затем удаляется во время стадии ускорения.

В частности, этап обработки содержит первый подэтап добавления, во время которого реагент (в частности, реагент для окрашивания и/или реагент для придания проницаемости микрочастицам 18) вводится в контейнер 6, содержащий пробу 2; и второй подэтап добавления, во время которого промывающая жидкость вводится в контейнер 6, содержащий пробу 2. В частности, который следует за первым подэтапом добавления.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения этап обработки включает подэтап выдерживания, который является последующим за первым подэтапом добавления и пред-

шествующим второму подэтапу добавления и во время которого реагент выдерживается в контейнере 6 вместе с пробой 2 (в частности, при регулируемой температуре между минимальной и максимальной температурой).

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения, подэтап выдерживания имеет продолжительность от 10 с до 24 ч.

Фиг. 33 иллюстрирует блок-схему процедур, которым можно следовать. В этих случаях способ содержит этап SA предварительной обработки (как описано выше) и этап ускорения SB, следующий за этапом предварительной обработки. Способ также предусматривает этап обработки, который является последующим за этапом ускорения SB и содержит подэтап SC добавления и обычно подэтап SD добавления, во время которого дополнительное вещество сохраняется в контейнере 6 в контакте с пробой 2; этап SE промывания, который является последующим за стадией обработки (точнее, последующим за подэтапом SD выдерживания) и во время которого промывающая жидкость вводится в контейнер 6.

Здесь (после этапа промывания) согласно первому варианту опять намечен этап предварительной обработки SA (и, следовательно, опять последовательно этапы SB, SC, SD). В соответствии со вторым вариантом этап ускорения (SB) запланирован опять (и, следовательно, опять последовательно этапы SC, SD). Процедура может быть выполнена несколько раз (и обычно заканчивается этапом SB).

Предпочтительно, но не обязательно во время этапа ускорения температура контейнеров 6 поддерживается в пределах заданного интервала. В частности, блок обработки 4 содержит систему поддержания температуры, приспособленную для поддержания температуры контейнеров 6 (точнее гнезд 2) в пределах желательного интервала. Согласно некоторым неограничивающим вариантам воплощения система поддержания температуры содержит датчик температуры и нагревательное и/или охлаждающее устройство, которое работает на основе данных, обнаруженных датчиком температуры.

Этап регулирования может быть реализован с использованием ранее полученных экспериментальных данных (которые, например, показывают, что с заданным контейнером 6 - заданной формы и заданного материала - с заданным компонентом 3 и с применением заданного ускорения - и/или угловой скорости - получается заданный конечный объем). Пример кривой, получившейся с помощью полученных экспериментальных данных, которая связывает угловую скорость с объемом второй части жидкого компонента 3 (которая остается в контейнере после этапа ускорения), показан на фиг. 32.

В частности (поэтому), этапу регулировки в некоторых случаях предшествует этап калибровки, во время которого измеряются различные величины конечных объемов, полученных для различных ускорений (и/или угловых скоростей). В частности, во время этапа калибровки создается калибровочная кривая (или калибровочная функция), которая затем используется во время этапа настройки для получения расчетного ускорения (и/или расчетной угловой скорости) на основе по существу определенного объема, который должен получиться.

Альтернативно или дополнительно во время этапа регулирования первая функция, которая связывает инерционную силу с ускорением, пересекается со второй функцией силы, обусловленной поверхностными напряжениями, и оценивается (также графически), для какой величины ускорения (и/или угловой скорости) эти две силы эквивалентны для желательного объема второй части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3. Другими словами, на этапе регулирования после определения объема второй части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3, который должен быть оставлен в контейнере 6, оценивается, для какой величины ускорения (и/или угловой скорости) инерционная сила эквивалентна силе, обусловленной поверхностными напряжениями, на основе первой функции, которая связывает инерционную силу с ускорением (и/или угловой скоростью), и второй функции, которая связывает инерционную силу с расстоянием от закрытого конца 7 или от оси A.

Во время этапа ускорения блок обработки подвергает контейнер 6 воздействию ускорения с указанной величиной.

Если закрытый конец 7 располагается между осью A и концом 8, а сечение контейнера 6 является постоянным (как показано на фиг. 23), то первой функцией является

$$F_c(d) am\omega^2d \quad (1)$$

второй функцией является

$$F_\gamma a 2\pi R \Delta\gamma \quad (2)$$

в которой F_c - инерционная сила (точнее центробежная сила),

m - масса пробы,

ω - угловая скорость,

d - расстояние от оси A,

F_γ - удерживающая сила (обусловленная поверхностными напряжениями),

R - внутренний радиус контейнера 6, и

$\Delta\gamma$ - параметр, зависящий от типа пробы 2 (точнее от типа жидкого компонента 3) и от материала, из которого изготовлен контейнер 6.

Параметры $\Delta\gamma$ можно найти в табличном виде в справочниках или можно определить экспериментально.

В этом случае объем второй части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 (а именно той части, которая остается в контейнере после этапа ускорения) основан (при сохранении внутреннего периметра контейнера, массы и фиксированного поверхностного напряжения) на угловой скорости (и, следовательно, может быть модулирован путем изменения угловой скорости). Точнее, когда угловая скорость увеличивается, объем уменьшается.

В этом случае объем второй части (по меньшей мере, частично) жидкого компонента 3 (а именно той части, которая остается в контейнере после этапа ускорения) основан (при сохранении внутреннего периметра контейнера, массу и фиксированное поверхностное натяжение) на угловой скорости (и, следовательно, может быть модулирован путем изменения угловой скорости). Точнее, когда угловая скорость увеличивается, объем уменьшается.

Если ось А проходит через контейнер 6 и располагается между закрытым концом 7 и концом 8, а сечение контейнера 6 является постоянным (как показано на фиг. 24), то первой и второй функциями являются функции (1) и (2), описанные выше. В отличие от предыдущей ситуации в этом случае невозможно (путем увеличения угловой скорости) вынудить всю пробу 2 вытекать наружу, так как часть, расположенная между осью А и закрытым концом 7, остается (в любом случае) внутри контейнера 6.

Если контейнер 6 имеет переменный диаметр и перемещается линейным образом (как показано на фиг. 25), то второй функцией является функция (2) (заметим, однако, что в этом случае внутренний периметр контейнера 6, а следовательно, внутренний радиус R, изменяется по мере его перемещения вдоль продольного удлинения контейнера 6) и первой функцией является

$$F_c \alpha m a \beta \cdot d^2 \quad (3)$$

в которой F_c - инерционная сила,

m - масса пробы 2,

a - ускорение,

d - расстояние относительно закрытого конца 7,

β - коэффициент пропорциональности, зависящий от удельного веса пробы 2 (точнее жидкого компонента 3) и геометрии контейнера 6 (и поэтому может быть определен заранее).

Если закрытый конец 7 располагается между осью А и концом 8, а сечение контейнера 6 является переменным (как показано на фиг. 26), то второй функцией является функция (2) (заметим, однако, что в этом случае внутренний периметр контейнера 6, а следовательно, внутренний радиус R, изменяется по мере его перемещения вдоль продольного удлинения контейнера 6) и первой функцией является

$$F_c(d) \alpha \beta \cdot d^2 \omega^2 \quad (4)$$

в которой F_c - инерционная сила,

d - расстояние от оси А,

β - коэффициент пропорциональности, который зависит от удельного веса пробы 2 (точнее, жидкого компонента 3) и геометрии контейнера 6 (и поэтому может быть определен заранее).

В частности, функция (4) получается из

$$F_c(d) \alpha m \omega^2 d \rho \pi R^2 \omega^2 d \quad (5)$$

в которой ρ является удельным весом пробы.

Если закрытый конец 7 располагается между осью А и концом 8, а сечение контейнера 6 является переменным (как показано на фиг. 27), то второй функцией является функция (2) (заметим, однако, что в этом случае внутренний периметр контейнера 6, а следовательно, внутренний радиус, изменяется при его движении вдоль продольного расширения контейнера 6) и первой функцией является функция (4). В отличие от предыдущей ситуации, в этом случае невозможно (путем увеличения угловой скорости) вынудить всю пробу 2 вытекать наружу, так как часть, расположенная между осью А и закрытым концом 7, остается в контейнере 6.

С учетом вышесказанного, первой функцией является функция (1), или (3), или (4) и второй функцией является функция (2). Это особенно важно, когда закрытый конец 7 располагается между осью А и концом 8.

Следует отметить, что функции (1)-(5) и иллюстрации фиг. 23-27 были сформулированы (для обоснования того, что наблюдалось, и автоматизации некоторых вариантов воплощения), после того как настоящее изобретение экспериментально неожиданно продемонстрировало, что оно может получать чрезвычайно точным и воспроизводимым образом уменьшения объема пробы 2.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения пробу 2 получают из предварительной пробы, содержащей микрочастицу/микрочастицы 18 и дополнительные микрочастицы. В частности, пробу 2 получают путем селективного выделения микрочастицы/микрочастиц 18 относительно дополнительных микрочастиц. Это делается с помощью разделительного блока, содержащего систему, выбранную из группы, состоящей из диэлектрофореза, оптических пинцетов, магнитофореза, акустофореза, бегущих волн, теплового потока, локальных перемещений флюида, генерируемых электротермическим потоком, локальных перемещений флюида, генерируемых электрогидродинамическими силами, и комбинации из них.

В некоторых неограничивающих случаях разделительный блок содержит систему, выбранную из

группы, состоящей из диэлектрофореза, оптических пинцетов, магнитофореза, акустофореза и комбинации из них.

В частности, разделительный блок содержит систему, способную оказывать усилие непосредственно на микрочастицу/микрочастицы 18 (в частности, без прикладываемой силы к флюиду, который перемещает движение микрочастицы/микрочастицам 18).

В соответствии с конкретными вариантами воплощения разделительный блок содержит диэлектрофорезную установку (или систему), описанную, например, по меньшей мере в одной из патентных заявок WO-A-0069565, WO-A-2007010367, WO-A-2007049120. Более конкретно, разделительный блок функционирует в соответствии с тем, что описано в патентных заявках с номерами публикаций WO 2010/106434 и WO 2012/085884).

Предпочтительно, но не обязательно разделительный блок является частью одного из указанных выше микрофлюидных устройств, в частности, в соответствии с тем, что описано в патентных заявках с номерами публикаций WO 2010/106428 и WO 2010/106426. Указанная микрофлюидная система используется для получения пробы 2 из предварительной пробы.

В соответствии с некоторыми неограничивающими вариантами воплощения во время этапа ускорения магнитная сила воздействует на микрочастицу 18, в частности, имеющую по меньшей мере один магнитный компонент, направленный к закрытому концу 7 (и/или боковой стенке 9).

Альтернативно (или дополнительно) во время этапа ускорения (дополнительная) магнитная сила прикладывается по направлению к отверстию 8'. В частности, указанная магнитная сила воздействует на коллоидную суспензию феррофлюида (таким образом, чтобы способствовать оттоку коллоидной суспензии из контейнера 6).

Способ и устройство в соответствии с настоящим изобретением также могут быть предпочтительно использованы для подготовки проб для генетического анализа, для подготовки проб для сортировки клеток, для окрашивания клеток и для промывания клеток.

Если прямо не указано иное, содержание ссылок (статей, книг, патентных заявок и т.д.), процитированных в этом тексте, полностью упоминается в этом документе. В частности, указанные ссылки включены в настоящий документ для справки.

Дальнейшие характеристики настоящего изобретения станут ясны из следующего описания чисто иллюстративных, неограничивающих примеров.

Пример 1.

Этот пример описывает испытания, проводившиеся традиционным способом уменьшения объема проб 6, включающих жидкий компонент 3 и по меньшей мере одну микрочастицу 18. Указанные образцы предварительно обрабатывали с помощью центрифуги, чтобы обеспечить расположение микрочастицы 18 в закрытом конце 7 контейнера 6 (контрольная пробирка, как показано на фиг. 20).

В частности, всего 260 испытаний были выполнены тремя разными операторами (А, В и С), которые начиная с проб 6 с начальным объемом приблизительно 113 μ л должны были получить объем 1 μ л.

Каждый оператор собирал избыток жидкости вручную, используя пипетку (и наклоняя контрольную пробирку, содержащую пробу).

Операторы А и В выполнили по 90 операций уменьшения каждый. Оператор С выполнил 80 операций уменьшения.

Для завершения операций потребовалось 10 ч работы (сложение рабочего времени каждого оператора). Все полученные результаты приведены в табл. 1 и на фиг. 31 (ось Х показывает объем пробы, полученный после уменьшения, а ось Y показывает количество раз, когда уменьшенная проба представляла этот объем), на которой более темный цвет демонстрирует те разы, когда микрочастица была потеряна, и ломаная линия определяет область, в которой (для каких конечных объемов) произошли указанные потери.

Таблица 1

Уменьшения проб вручную: 260 испытаний	
Значение	1,73 μ л
Максимальный интервал	4,3 μ л
Стандартное отклонение	1,03 μ л
Показатель эффективности	94,7%

Под максимальным интервалом мы понимаем разницу между максимальным объемом и минимальным объемом, полученным после операций уменьшения. Средним значением является среднее из объемов проб, полученных после уменьшения. Полученные результаты показывают, что традиционная процедура не является надежной (частота отказов относительно случаев, в которых была потеряна микрочастица 18, не является пренебрежимо малой) и средний объем значительно превышает целевой объем (1 μ л).

Полученные результаты в разбивке по операторам приведены в следующих табл. 2-4.

Таблица 2

Оператор А	
Значение	2,65 μ л
Максимальный интервал	3,35 μ л
Стандартное отклонение	0,79 μ л
Показатель эффективности	98,9%

Таблица 3

Оператор В	
Значение	1,16 μ л
Максимальный интервал	2,60 μ л
Стандартное отклонение	0,51 μ л
Показатель эффективности	94,7%

Таблица 4

Оператор С	
Значение	1,28 μ л
Максимальный интервал	4,06 μ л
Стандартное отклонение	0,96 μ л
Показатель эффективности	89,9%

Эти результаты показывают, что точность процедуры чрезвычайно зависит от оператора и его/ее способностей работать вручную.

Следует отметить, что каждый оператор выполнял уменьшения в трех отдельных сеансах работы. Результаты, полученные каждым оператором (обозначенные на оси X) для каждого сечения, графически показаны на фиг. 30 (ось Y показывает объем пробы, полученный после уменьшения).

Как видно, даже один-единственный оператор имеет тенденцию получать разные результаты в разные моменты времени.

Пример 2.

В данном примере описывается сравнение между испытаниями, выполненными традиционным способом уменьшения объема и (автоматическим) способом в соответствии с настоящим изобретением. Испытания проводили с начальным объемом приблизительно 113 μ л, и целевой объем составлял 1 μ л.

Традиционный способ был реализован так, как описано в примере 1.

Для осуществления способа в соответствии с настоящим изобретением использовали устройство 1 (изготовленное для работы со скоростью 4200 об/мин), изображенное на рисунках 5-8, и контейнер из фиг. 20 (точнее полоску контрольных ПЦР-пробирок объемом 0,2 мл каждая). Расстояние между осью А (которая проходила через контейнер) и закрытым концом 7 составляло 2,22 мм.

Полученные результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

	Вручную	Автоматически
Число уменьшенных проб	360	180
Значение	1,66 μ л	1,22 μ л
Максимальный интервал	4,34 μ л	1,05 μ л
IQR(interquartile range, межквартильный размах)	1,31 μ л	0,30 μ л
Стандартное отклонение	0,95 μ л	0,25 μ л
Показатель эффективности	92,8%	99,4%
	1 частица терялась каждые 10 проб	1 частица терялась каждые 180 проб

Исходя из указанных выше данных настоящее изобретение представляет собой значительное и неожиданное улучшение в каждом зарегистрированном аспекте.

В табл. 6 ниже сравнивается одинаковое количество испытаний, выполненных традиционным способом и способом в соответствии с настоящим изобретением.

Таблица 6

	Вручную	Автоматически
Число уменьшенных проб	96	96
Затраченное время	220 минут	15 минут
Значение	1,66 μ л	1,21 μ л
Стандартное отклонение	0,95 μ л	0,25 μ л
Показатель эффективности	92%	98%

Можно сразу же заметить, что время, необходимое для получения проб с уменьшенным объемом, резко снижается при реализации способа настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Устройство для уменьшения объема пробы (2), содержащей по меньшей мере один, по меньшей мере, частично жидкий компонент (3) и имеющей объем вплоть до 10 мл, причем устройство (1) содержит блок обработки (4), снабженный по меньшей мере одним гнездом (5) для, по меньшей мере, частичной поддержки по меньшей мере одного контейнера (6), имеющего внутреннее пространство, первый закрытый конец (7), второй конец (8), выполненный с отверстием (8'), обеспечивающим сообщение между внутренним пространством и наружной частью, и по меньшей мере одной боковой стенкой (9),

при этом блок обработки (4) содержит собирающее устройство (10), которое выполнено с возможностью сбора первой части указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) и расположено снаружи гнезда (5) и вблизи гнезда (5), причем блок обработки (4) выполнен с возможностью перемещения гнезда (5) таким образом, чтобы подвергать гнездо (5) воздействию ускорения, имеющему по меньшей мере один компонент, который ориентирован от собирающего устройства (10) по направлению к гнезду (5) таким образом, чтобы первая часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) вытекала из контейнера (6) и достигала собирающего устройства (10), а вторая часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) с по существу определенным объемом оставалась в контейнере (6), в частности в области указанного первого закрытого конца (7),

при этом блок обработки (4) содержит перемещающее устройство (11), которое выполнено с возможностью вращения гнезда (5) вокруг оси (А) вращения таким образом, что центробежная сила вынуждает указанную первую часть, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) вытекать из контейнера (6) в собирающее устройство (10), причем гнездо (5) выполнено в такой форме, что ось (А) вращения проходит через контейнер (6) между первым закрытым концом (7) и вторым концом (8).

2. Устройство по п.1, в котором блок обработки (4), в частности перемещающее устройство (11), выполнен в такой форме, что один или более гибких луночных планшетов могут быть установлены непосредственно на перемещающее устройство (11) таким образом, чтобы проходить (изгибаться) вокруг оси (А) вращения.

3. Устройство по любому из пп.1 и 2, в котором собирающее устройство (10) содержит удерживающую систему (12) (в частности, резервуар) для задерживания, по меньшей мере, фракции указанной первой части указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3).

4. Устройство по п.3, в котором удерживающая система (12) содержит элемент, выбранный из группы, состоящей из поглощающего материала (13), капиллярной ловушки, ловушки для жидкости, а также комбинации из них;

капиллярную ловушку, содержащую множество канавок (14), имеющих ширину меньше 2,0 мм, в частности меньше 0,9 мм;

ловушку для жидкости, содержащую собирающую камеру (15), которая снабжена впуском (16), и по меньшей мере одну подвижную стенку (17), которая способна перемещаться между положением закрытия, в котором она предотвращает протекание жидкости через выпуск (16), и положением открытия, в котором жидкость может протекать через выпуск (16), причем стенка (17) приспособлена для перемещения в положение открытия, когда применяется используемое указанное ускорение, и как только ускорение больше не применяется к гнезду (5), стенка (17) возвращается в положение закрытия.

5. Устройство по любому из пп.1-4, в котором блок обработки (4) содержит множество гнезд (5), каждое из которых приспособлено для размещения соответствующего контейнера (6), причем блок обработки (4) содержит перемещающее устройство (11), которое приспособлено для того, чтобы вынуждать все гнезда (5) совершать одинаковое перемещение.

6. Устройство по п.5, в котором перемещающее устройство (11) приспособлено вращать гнезда (5) вокруг оси (А) вращения таким образом, что центробежная сила перемещает указанные первые части указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) в собирающее устройство (10), причем гнезда (5) располагаются по меньшей мере в один ряд, который по существу параллелен оси (А) вращения.

7. Устройство по любому из пп.1-6, в котором блок обработки (4) содержит перемещающее устрой-

ство (11), которое приспособлено вращать гнездо (5) вокруг оси (А) вращения таким образом, что центробежная сила перемещает указанную первую часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) к собирающему устройству (10), причем блок обработки (4) содержит множество дополнительных периферийных гнезд (19), которые располагаются вокруг оси (А) вращения и приспособлены для размещения дополнительных контейнеров (6), каждый из которых содержит соответствующую пробу (2), и должны вращаться перемещающим устройством (11) вокруг оси (А) вращения таким образом, что центробежная сила прикладывается к указанному, по меньшей мере, частично жидкому компоненту (3), содержащемуся в дополнительных контейнерах (6), по направлению к первому закрытому концу (7) дополнительных контейнеров (6).

8. Устройство по любому из пп.1-7, в котором блок обработки (4) содержит систему сохранения температуры, которая приспособлена для сохранения температуры контейнеров (6), в частности гнезд (5), в пределах желательного интервала, в частности, между заданной минимальной температурой и заданной максимальной температурой, причем, в частности, система сохранения температуры содержит датчик температуры и нагревательное и/или охлаждающее устройство, которое приспособлено для работы на основе данных, обнаруженных датчиком температуры.

9. Устройство по любому из пп.1-8, в котором блок обработки (4) содержит первый магнит, который располагается в области торца гнезда (5) напротив собирающего устройства (10), причем, в частности, первый магнит располагается в области закрытого конца (7).

10. Устройство по любому из пп.1-9, в котором блок обработки (4) содержит второй магнит, который располагается в области гнезда (5), в частности в области торца гнезда (5) в области собирающего устройства (10), причем, в частности, магнит располагается в области второго конца (8), более конкретно отверстия (8').

11. Устройство по любому из пп.1-10, в котором во время этапа ускорения вследствие ускорения, приложенного к контейнеру (6), на первую часть пробы (2) действует по меньшей мере одна первая инерционная сила и по меньшей мере одна вторая инерционная сила действует на вторую часть пробы (2),

причем блок обработки (4) содержит перемещающее устройство (11), которое приспособлено вращать во время этапа ускорения контейнер (6) вокруг оси (А) вращения, проходящей через контейнер (6) между первым закрытым концом (7) и вторым концом (8) таким образом, что центробежная сила вынуждает указанную первую часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) вытекать из контейнера (6) в собирающее устройство (10); или

первая инерционная сила, которая больше, чем первая удерживающая сила, действующая между первой частью пробы и контейнером (6), и вторая инерционная сила, которая меньше, чем вторая удерживающая сила, действующая между второй частью пробы и контейнером (6), ориентированы от первого закрытого конца (7) по направлению ко второму концу (8) поперечно (в частности, перпендикулярно) к указанному отверстию (8').

12. Способ уменьшения объема пробы (2), содержащей по меньшей мере один, по меньшей мере, частично жидкий компонент (3) и имеющей объем вплоть до 10 мл, реализуемый посредством устройства по любому из пп.1-11,

причем способ включает использование по меньшей мере одного контейнера (6), имеющего внутреннее пространство, первый закрытый конец (7), второй конец (8), выполненный с отверстием (8'), обеспечивающим сообщение между внутренним пространством и наружной частью, и по меньшей мере одну боковую стенку (9),

отличающийся тем, что он включает этап ускорения, во время которого блок обработки (4) перемещает контейнер (6), содержащий пробу (2), подвергая контейнер (6) воздействию ускорения, которое имеет по меньшей мере один компонент, который ориентирован от второго конца (8) по направлению к первому закрытому концу (7) и является поперечным (в частности, перпендикулярным) к указанному отверстию (8'), так что первая часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) вытекает из контейнера (6), протекая через указанное отверстие (8'), а вторая часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) с по существу определенным объемом остается в контейнере (6), в частности в указанном первом закрытом конце (7),

при этом блок обработки (4) содержит перемещающее устройство (11), которое во время этапа ускорения вращает контейнер (6) вокруг оси (А) вращения таким образом, что центробежная сила вынуждает указанную первую часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3) вытекать из контейнера (6), проходя через указанное отверстие (8'),

причем ось (А) вращения проходит через контейнер (6) между первым закрытым концом (7) и вторым концом (8).

13. Способ по п.12, отличающийся тем, что

проба (2) содержит по меньшей мере одну микрочастицу (18);

во время этапа ускорения блок обработки (4) подвергает контейнер (6) воздействию ускорения таким образом, что микрочастица (18) остается в контейнере (6), в частности в области указанного первого закрытого конца (3).

14. Способ по п.13, отличающийся тем, что содержит этап предварительной обработки, который предшествует этапу ускорения и во время которого контейнер (6), содержащий пробу (2), подвергают воздействию дополнительного ускорения, имеющего по меньшей мере один компонент, который ориентирован от первого закрытого конца (7) в направлении ко второму концу (8) и является поперечным (в частности, перпендикулярным) к указанному отверстию (8'), таким образом, что микрочастица (18) располагается в области первого закрытого конца (3).

15. Способ по любому из пп.12-14, отличающийся тем, что блок обработки (4) во время этапа ускорения одновременно подвергает множество контейнеров (6) воздействию указанного ускорения;

в частности, блок обработки (4) содержит множество гнезд (5), в каждом из которых размещается соответствующий контейнер (6).

16. Способ по любому из пп.12-15, отличающийся тем, что во время этапа ускорения первый закрытый конец (7) расположен между осью (А) вращения и вторым концом (8).

17. Способ по любому из пп.12-16, отличающийся тем, что микрочастицы (18) выбирают из группы, состоящей из клеток, клеточного дебриса (в частности, клеточных фрагментов, например ДНК и/или РНК), клеточных агрегатов (таких как, например, небольшие скопления клеток, происходящих из стволовых клеток, таких как нейросферы или маммосферы), бактерий, липо-бус, микрошариков (из полистирола и/или магнитные), наночастиц (например, наночастиц размером вплоть до 100 нм), скоплений, образованных микрошариками (в частности, магнитными шариками, в частности, с наибольшим размером меньше 500 мкм), связанными с клетками, циркулирующих опухолевых клеток, связанных с феррофлюидом, экзосом, коллоидной суспензии (например, феррофлюида), липосом, ядер, спор и комбинации из них;

в частности, микрочастицы (18) выбирают в группе, состоящей из стволовых клеток, эритробластов, трофобластов, нейрональных клеток, эпителиальных клеток, опухолевых клеток, лейкоцитов (WBC), стромальных клеток, сперматозоидов, циркулирующих опухолевых клеток (СТС), фетальных клеток, микрошариков (в частности, с наибольшим размером меньше 500 мкм), коллоидной суспензии (например, феррофлюида), скоплений, образованных микрошариками, связанными с клетками (например, стволовыми клетками, эритроблантами, трофоблантами, нейрональными клетками, эпителиальными клетками, опухолевыми клетками, лейкоцитами (WBC), стромальными клетками, сперматозоидами, циркулирующими опухолевыми клетками (СТС), фетальными клетками), эритроцитов, циркулирующих опухолевых клеток, связанных с феррофлюидом, и комбинации из них.

18. Способ по любому из пп.12-17, отличающийся тем, что включает этап вставления, во время которого пробу (2) вставляют в контейнер (6); и этап обработки, который следует за этапом вставления и до этапа ускорения и во время которого пробу (2) обрабатывают, в частности, с помощью дополнительного вещества.

19. Способ по п.18, отличающийся тем, что этап обработки содержит первый подэтап добавления, во время которого реагент (в частности, реагент для окрашивания микрочастиц (18), и/или реагент для обеспечения проницаемости микрочастиц (18), и/или реагент для фиксации микрочастиц (18)) вставляют в контейнер (6), содержащий пробу (2); и

второй подэтап добавления, который следует за первым подэтапом добавления и во время которого промывающую жидкость вставляют в контейнер (6), содержащий пробу (2), причем, в частности, этап обработки содержит подэтап выдерживания, который следует за первым подэтапом добавления и перед вторым подэтапом добавления и во время которого реагент остается с пробой (2) (более конкретно, при регулируемой температуре, изменяющейся в диапазоне между минимальной температурой и максимальной температурой).

20. Способ по любому из пп.12-19, отличающийся тем, что во время этапа ускорения собирающее устройство (10), которое собирает первую часть указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3), располагается в области отверстия (8') снаружи контейнера (6).

21. Способ по п.20, отличающийся тем, что собирающее устройство (10) содержит удерживающую систему (12) для задерживания, по меньшей мере, фракции первой части указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3), причем, в частности, удерживающая система (12) содержит элемент, выбранный из группы, состоящей из поглощающего материала (13), капиллярной ловушки, ловушки для жидкости, а также комбинации из них;

капиллярную ловушку, содержащую множество канавок (14), имеющих ширину, которая меньше 2,0 мм, в частности меньше 0,9 мм;

ловушку для жидкости, содержащую сборную камеру (15), которая снабжена впуском (16), и по меньшей мере одну подвижную стенку (17), которая способна перемещаться между положением закрытия, в котором она предотвращает протекание жидкости через впуск (16), и положением открытия, в котором жидкость может протекать через впуск (16);

во время этапа ускорения указанное ускорение (в частности, прямо и/или косвенно посредством указанного, по меньшей мере, частично жидкого компонента (3)) перемещает подвижную стенку (17) в поло-

жение открытия;

как только ускорение больше не прикладывается к контейнеру (6), в частности к удерживающей системе (12), подвижная стенка (17) возвращается в положение закрытия.

22. Способ по любому из пп.12-21, отличающийся тем, что во время этапа ускорения температуру контейнера (6) поддерживают в пределах заданного интервала температур.

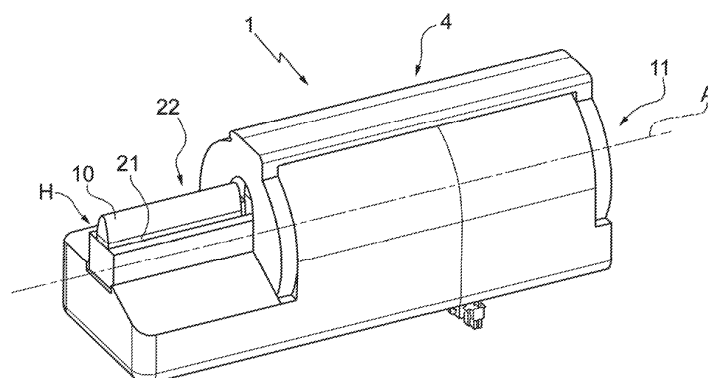
23. Способ по любому из пп.12-22, отличающийся тем, что содержит этап вставления, во время которого пробу (2) вставляют в контейнер (6) с помощью инструмента, выбранного из группы, состоящей из микрофлюидных устройств, пипетирующих инструментов, проточных цитометров, микроманипуляторов, оптических пинцетов, причем, в частности, проба (2) выбрана таким образом, чтобы она содержала по меньшей мере одну микрочастицу (18) с использованием изображений, иммунофлуоресценции, импеданса, размеров, геометрии, морфологических признаков, а также их комбинации.

24. Способ по любому из пп.12-23, отличающийся тем, что

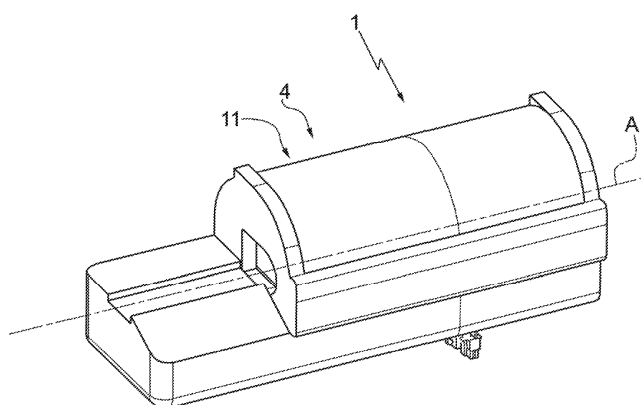
проба (2) содержит по меньшей мере одну микрочастицу (18), в частности, обеспеченную по меньшей мере одним магнитным компонентом;

во время этапа ускорения магнитная сила действует на микрочастицу (18) по направлению к боковой стенке (9) и/или закрытому концу (7).

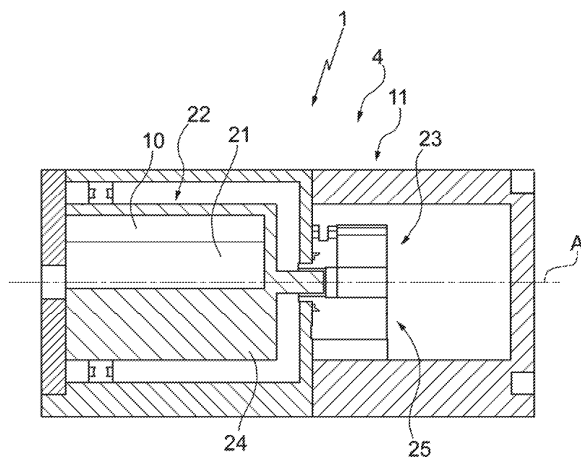
25. Способ по любому из пп.12-24, отличающийся тем, что во время этапа ускорения магнитная сила прикладывается по направлению к отверстию (8'), в частности, таким образом, чтобы удалять нежелательный материал (например, феррофлюид) из контейнера (6).



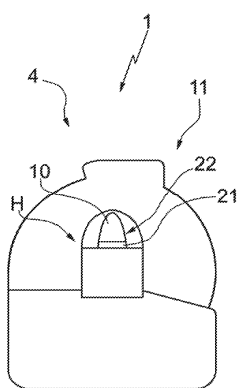
Фиг. 1



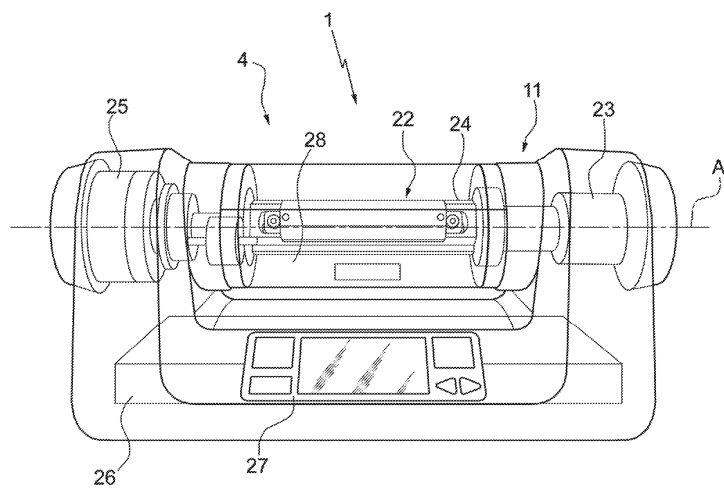
Фиг. 2



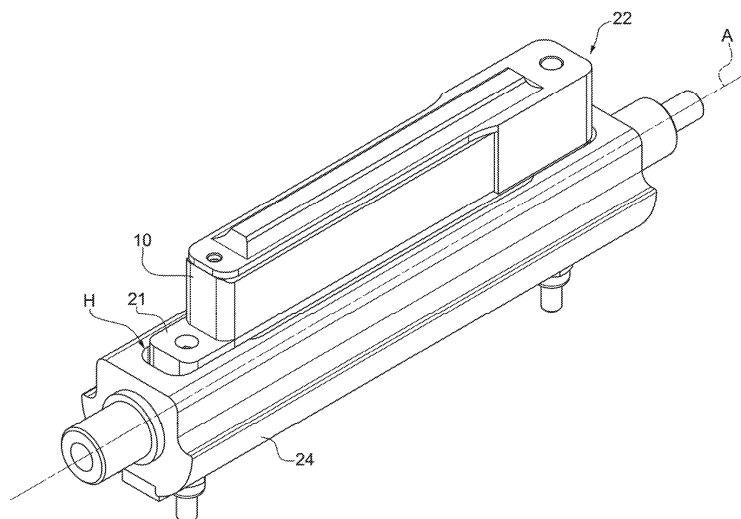
Фиг. 3



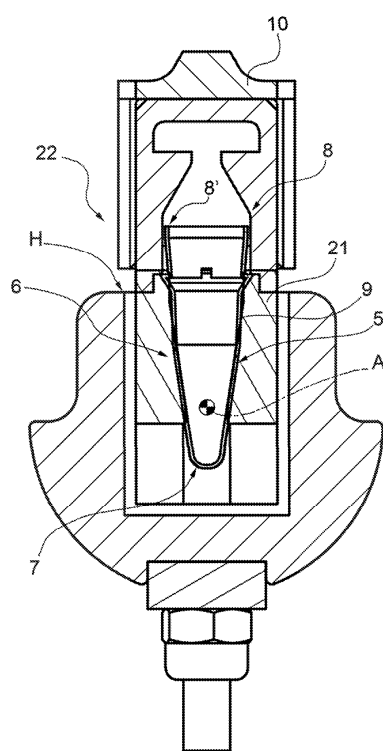
Фиг. 4



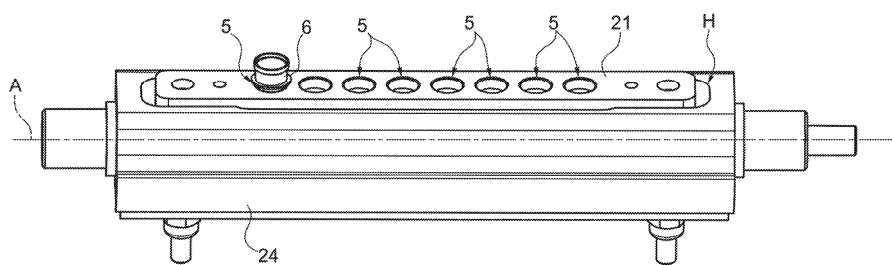
Фиг. 5



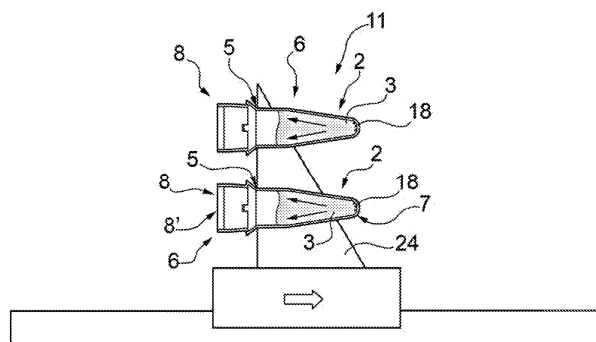
Фиг. 6



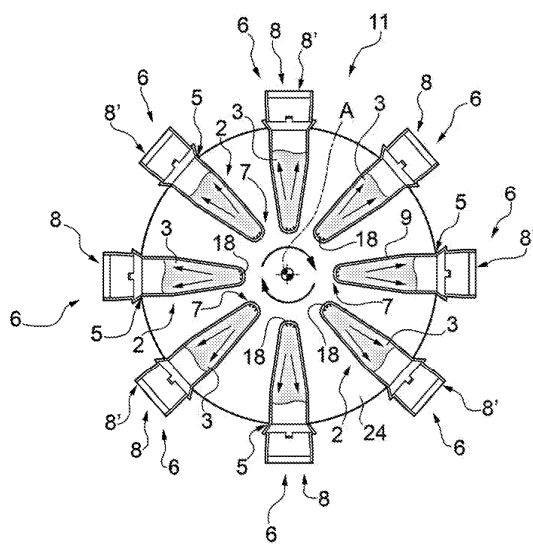
Фиг. 7



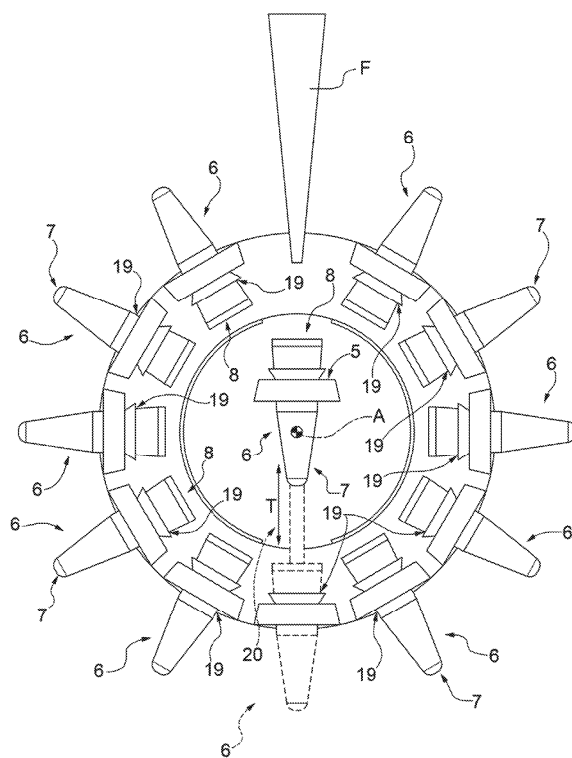
Фиг. 8



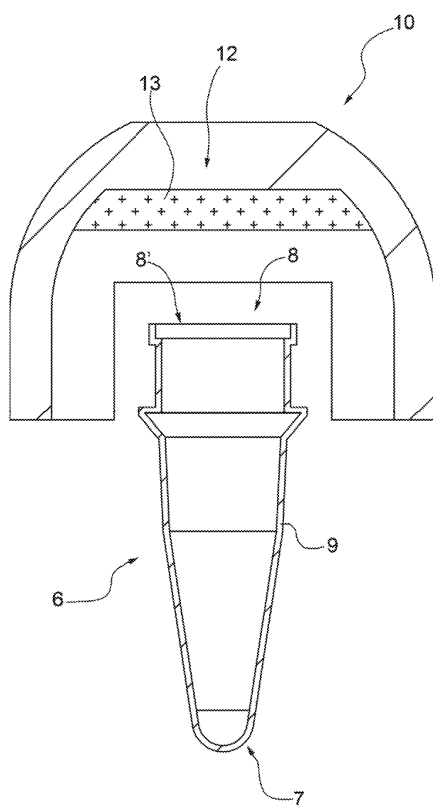
Фиг. 9



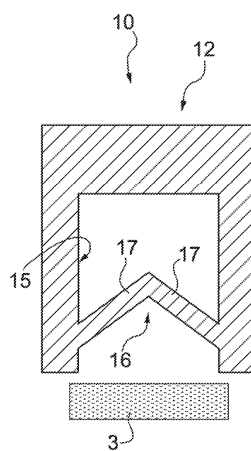
Фиг. 10



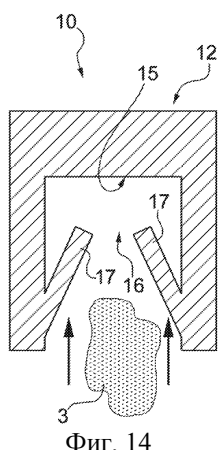
Фиг. 11



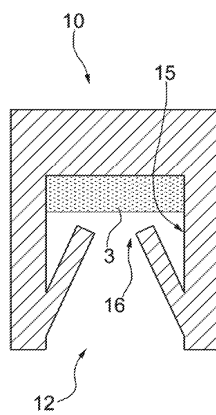
Фиг. 12



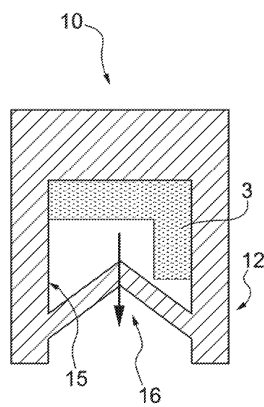
Фиг. 13



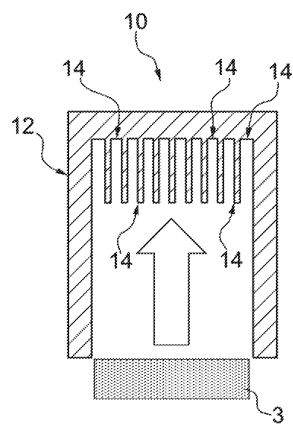
Фиг. 14



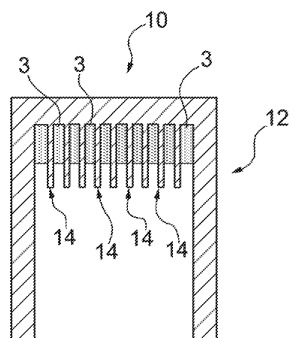
Фиг. 15



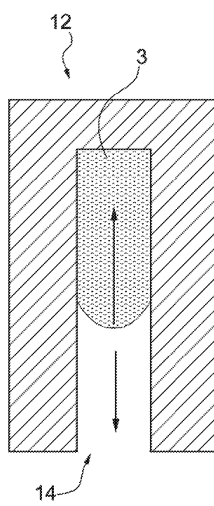
Фиг. 16



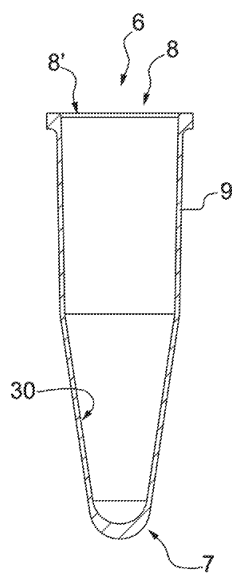
Фиг. 17



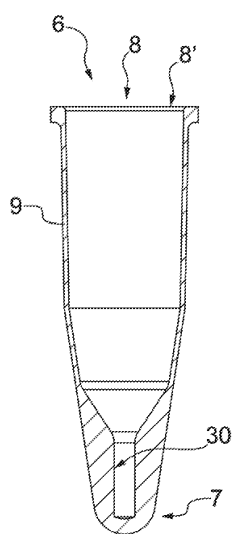
Фиг. 18



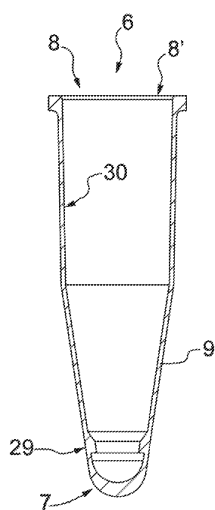
Фиг. 19



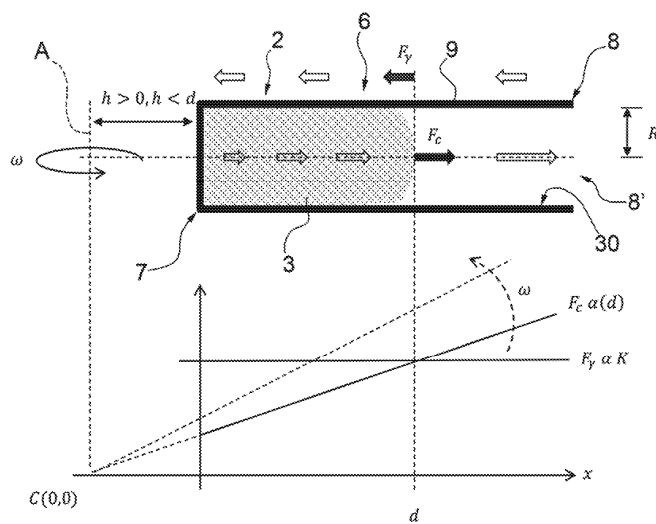
Фиг. 20



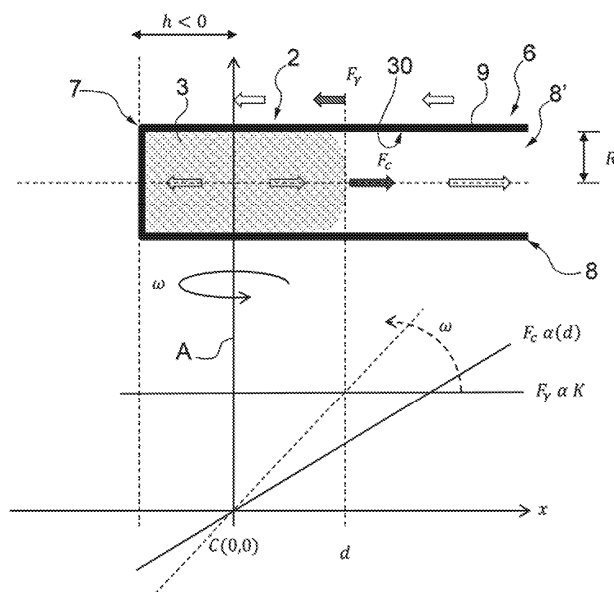
Фиг. 21



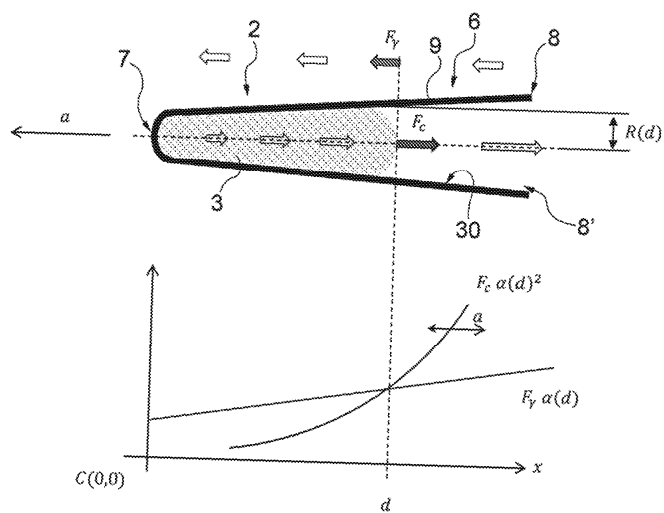
Фиг. 22



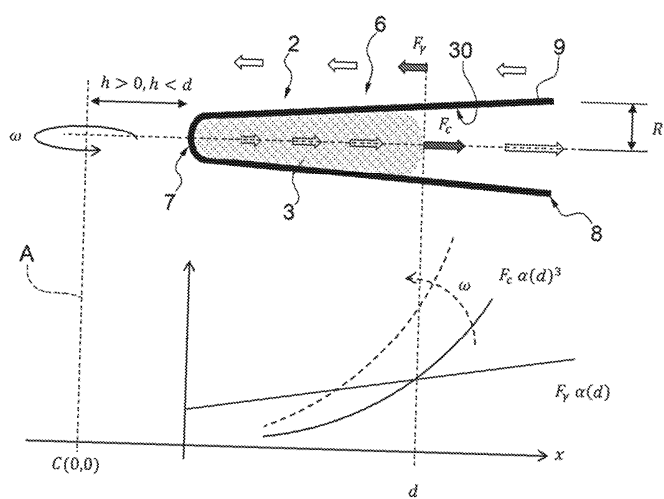
Фиг. 23



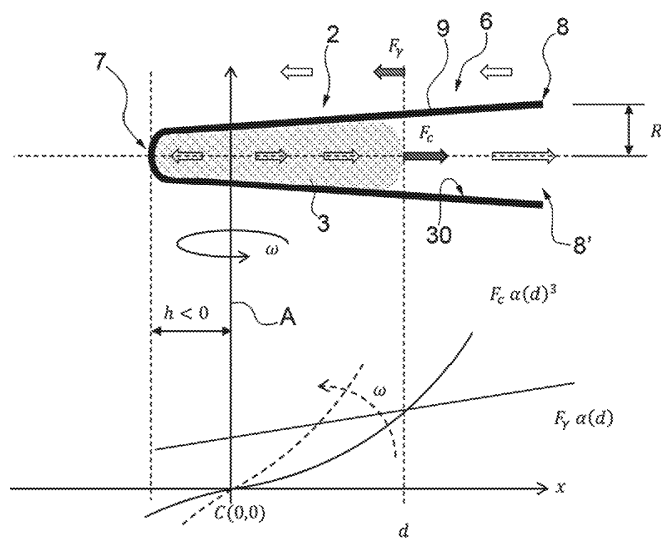
Фиг. 24



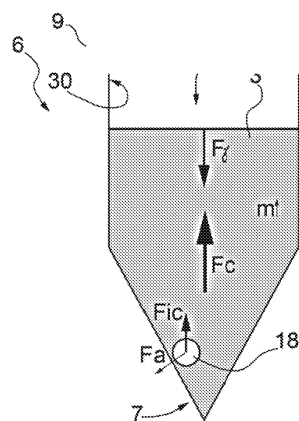
Фиг. 25



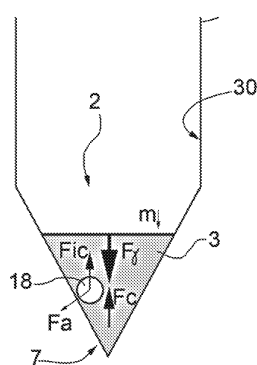
Фиг. 26



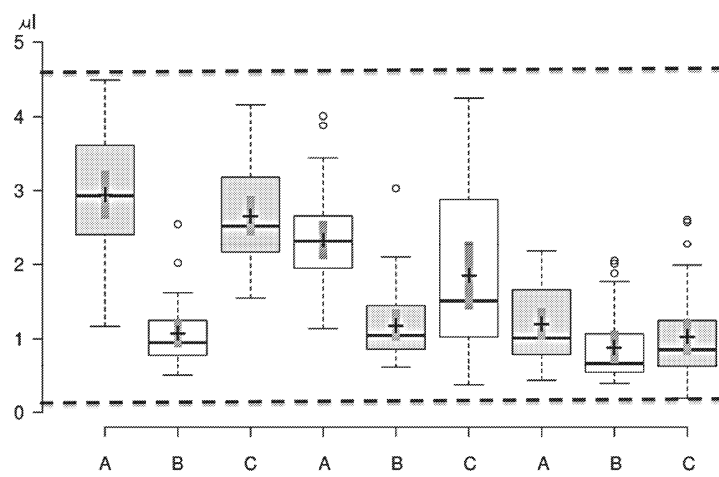
Фиг. 27



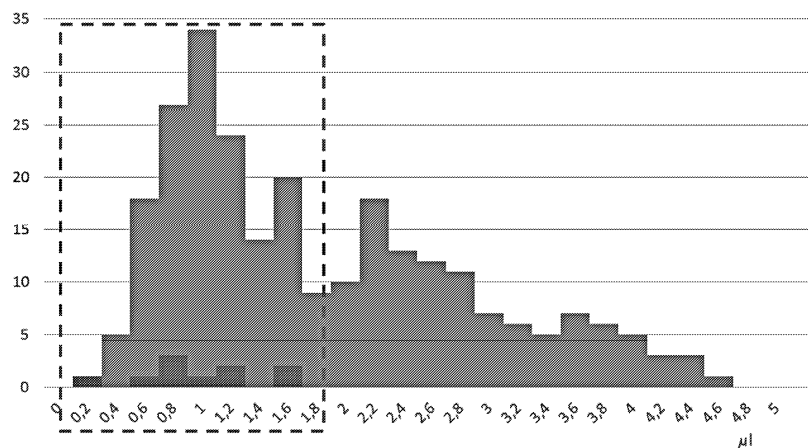
Фиг. 28



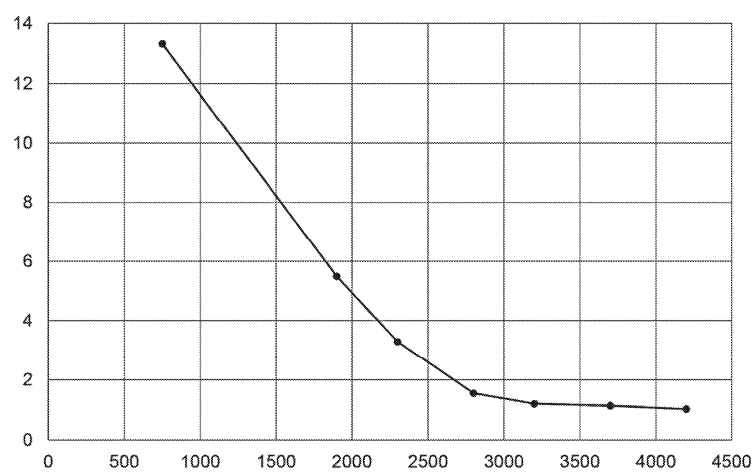
Фиг. 29



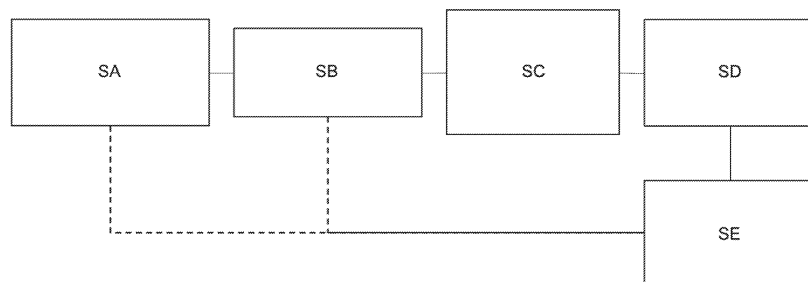
Фиг. 30



Фиг. 31



Фиг. 32



Фиг. 33

