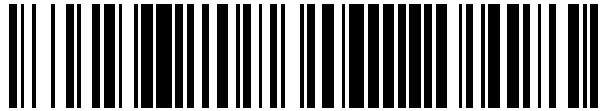


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 571 127**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04 (2006.01)

C12Q 1/14 (2006.01)

C12Q 1/56 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.09.2011 E 11788227 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2616550**

54 Título: **Método para la separación de moléculas o partículas objetivo a partir de muestras que contienen fibrinógeno, incluyendo componentes sanguíneos**

30 Prioridad:

15.09.2010 CH 14782010

07.12.2010 CH 20412010

20.07.2011 CH 12072011

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

24.05.2016

73 Titular/es:

**DEBIOPHARM INTERNATIONAL SA (100.0%)
Forum "après-demain", Chemin Messidor 5-7
1006 Lausanne, CH**

72 Inventor/es:

**RIDA, AMAR;
MERMOD, NICOLAS;
FRANÇOIS, PATRICE;
LAZAREVIC, VLADIMIR y
SCHRENZEL, JACQUES**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 571 127 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la separación de moléculas o partículas objetivo a partir de muestras que contienen fibrinógeno, incluyendo componentes sanguíneos

5

Sector de la invención

La presente invención se refiere a un método para el procesamiento de muestras para la separación de moléculas o partículas objetivo de dicha muestra. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de muestras que permite la separación y concentración eficaz de moléculas o partículas objetivo a partir de muestras que contienen proteínas de fibrinógeno antes de su detección y análisis.

10

Descripción de la técnica relacionada

En bioensayos, la capacidad de extraer, concentrar y purificar una molécula o moléculas, partícula o partículas o analito o analitos objetivo a partir de diversas muestras (es decir, preparación de la muestra) representa una etapa crítica y es desafiante como una etapa requisito previo para la detección y el análisis de objetivos eficaz. La etapa de preparación de la muestra es la principal etapa limitante de la velocidad en los bioensayos, en términos de límite de detección, reproducibilidad e interferencias con otros compuestos de dicha o dichas partículas o dicho o dichos analitos. Los procedimientos de preparación de la muestra existentes implican típicamente etapas manuales largas o de pipeteado robótico complejo que incluyen rondas de centrifugación largas. Estos procedimientos no sólo son lentos, costosos y requieren trabajo, sino que también pueden representar un riesgo para la salud para el personal del laboratorio, exigiendo la eliminación costosa de los productos químicos peligrosos. Por otra parte, el flujo de trabajo para la preparación de la muestra, especialmente para la nueva generación de objetivos moleculares se ha vuelto aún más complejo y se están ofreciendo múltiples soluciones. Actualmente, se utilizan soluciones diferentes e individuales para la preparación de muestras para cada tipo de muestra y objetivo. Proporcionar una solución de flujo de trabajo de preparación de muestras estándar aplicable para múltiples muestras y objetivos que sea fácil de implementar, compatible con la automatización y la integración de reactivos y que implique un mínimo tiempo de trabajo manual, todavía sigue siendo un requisito sin resolver en las ciencias de la vida y el entorno de diagnóstico. Además, la estandarización de metodologías de flujo de trabajo de la muestra es un requisito importante sobre todo en los ambientes de diagnóstico regulados.

15

20

25

30

Un ejemplo típico de la complejidad de la preparación de muestras es la detección de moléculas o partículas objetivo del medio sanguíneo complejo. Es particularmente compleja la detección de agentes infecciosos (bacterias, hongos) de la sangre a niveles de detección bajos. En el nivel clínico, la detección de infección de la sangre (es decir, sepsis) es particularmente importante ya que es la causa de un estado médico grave inducido por la respuesta inflamatoria a la infección microbiana en la sangre. La sepsis representa, de hecho, la causa más común de muerte en las unidades de cuidados intensivos. Por otra parte, debido a la detección menor de microorganismos de la sangre, la falta de identificación del agente infeccioso o su identificación tardía y/o la ausencia de pruebas de sensibilidad a los antibióticos, o el rechazo a los mismos, muchas modalidades de tratamiento con antibióticos se están iniciando solamente de forma empírica sin cobertura de diagnóstico apropiado. La necesidad médica en el diagnóstico de sepsis de una detección temprana, la identificación de microorganismos rápida y las pruebas de sensibilidad a los antibióticos y la gestión adecuada del paciente está altamente insatisfecha. En tiempos de un creciente desarrollo de resistencia de los microorganismos (por ejemplo, microorganismos nosocomiales), son cruciales nuevas metodologías para el diagnóstico rápido y preciso de la sepsis para disminuir la morbilidad y la mortalidad. Finalmente, otra fuente de infecciones de la sepsis son las transfusiones de sangre. La detección eficaz de los microorganismos fuera de la sangre, componentes sanguíneos y derivados de la sangre es de gran importancia para la prevención de contaminaciones.

35

40

45

50

La utilización de cultivos de sangre, ya sea como cultivo con botellas de sangre o cultivo con agar de sangre todavía es el método de rutina de elección (patrón oro) para detectar e identificar agentes infecciosos en pacientes con bacteriemia y sepsis.

Una cuestión importante en la detección de células bacterianas en la sangre es la capacidad de detectar un número de células tan bajas como 1 unidad formadora de colonias (ufc) por mililitro. En este contexto, el volumen de sangre que debe ser procesada para un nivel de detección en este orden de magnitud, por lo tanto, debe constar de varios mililitros (5 - 10 ml) de la muestra de sangre. "Buscar una aguja en un pajar", el gran reto en el diagnóstico de la infección de la sangre, se basa en la disponibilidad de tecnologías eficientes y fáciles de aplicar que permitan la extracción y purificación de biomarcadores de infección específicos de microorganismos viables o su contenido genético de ácidos nucleicos.

55

60

Tal como, por ejemplo, se ha presentado en las solicitudes de patente internacional W095/15397 y WO2009/015484, se utilizan metodologías de centrifugación múltiple o filtración en combinación con etapas específicas de lisis de la pared/membrana celular para enriquecer muestras de sangre y fluidos corporales en microorganismos objetivo. Junto con la baja eficiencia de enriquecimiento, otra limitación de estas metodologías de centrifugación es su no compatibilidad con los flujos de trabajo de ensayo de laboratorio automatizado de rutina. Con el fin de superar las

65

limitaciones del proceso de centrifugación, se han introducido partículas magnéticas recubiertas con grupos de afinidad dirigidos contra microorganismos objetivo. Utilizando una fuerza magnética, las partículas capturan los objetivos en sus superficies dando como resultado la separación fácil de los objetivos de la sangre. Sin embargo, hay algunas desventajas importantes para una aplicación amplia de grupos de afinidad sobre micropartículas magnéticas para capturar bacterias viables. En primer lugar, el espectro de microorganismos patógenos comprende una larga lista de bacterias gram-negativas y gram-positivas y numerosas especies de hongos; no hay grupos de afinidad genéricos disponibles que cubren todas las clases de microorganismos. Además, muchos de estos microorganismos se encapsulan, un fenómeno que facilita su supervivencia y su disponibilidad en la sangre. En segundo lugar, se ha demostrado que los microorganismos no siempre están en el torrente sanguíneo de flotación libre, sino que más bien están asociados a algunas células de la sangre o secuestrados por las mismas, así como las plaquetas. En el caso de *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, la interacción con las plaquetas y el secuestro posterior de las bacterias por parte de las plaquetas es un importante factor de virulencia que permite a las bacterias escapar del sistema de defensa del huésped.

El documento US 6680195 da a conocer varios métodos de separación de partículas objetivo utilizando la adherencia al fibrinógeno sobre un soporte sólido, tal como la superficie de un coágulo de fibrina.

Una alternativa al enriquecimiento directo de microorganismos viables de las muestras de sangre consiste en la utilización de biomarcadores moleculares (secuencias de genes de ácidos nucleicos específicos) y las técnicas de amplificación de ácidos nucleicos inmediatamente posteriores, tales como PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) (Polymerase Chain Reaction). El método abre nuevas posibilidades para obtener resultados más rápidos. Sin embargo, el nivel de detección (sensibilidad) es a menudo menor que el de los métodos basados en cultivo. La sensibilidad limitada de los métodos moleculares se debe principalmente al nivel de fondo elevado de ADN de células eucariotas (glóbulos blancos de la sangre) en la muestra de sangre. Un aumento de la sensibilidad de los métodos basados en la PCR se puede lograr mediante la extracción de los ácidos nucleicos eucariotas de la muestra de sangre o concentrando específicamente el ADN del microorganismo (procariota). En esta perspectiva, el documento EP-A-1.400.589 da a conocer un método para separar el ADN procariótico a partir de lisado de sangre que comprende la etapa de unión específica del ADN procariótico con, como mínimo, una proteína o polipéptido, seguido de la separación del complejo formado de este modo. Dentro del mismo ámbito, el documento EP-A-1.861.495 describe un método para aislar específicamente ácidos nucleicos a partir de células microbianas proporcionadas en una muestra mixta que comprende adicionalmente células eucarióticas superiores. La presente invención da a conocer la utilización de nucleasas, especialmente nucleasas degradantes de ADN, para degradar ácidos nucleicos en presencia de uno o varios agentes caotrópicos y/o uno o varios surfactantes en sangre completa, permitiendo de este modo extraer ácidos nucleicos eucariotas a partir de lisados de sangre. Ambos métodos están limitados por los protocolos complejos y las etapas de tratamiento largas, es decir, la mitad de un día antes de la obtención de ácidos nucleicos bacterianos purificados. Además, estos métodos muestran un límite de detección de 100 ufc/ml, que todavía es considerablemente inferior a la sensibilidad del método de cultivo de sangre que por definición es 1 ufc en el volumen considerado de 10 ml.

Además de las limitaciones mencionadas de los métodos de detección de ácidos nucleicos del estado de la técnica, en general, la pertinencia de los métodos moleculares para la detección de bacterias y hongos es cuestionable. De hecho, la detección de ADN circulante en la sangre no se correlaciona necesariamente con los métodos de cultivo de sangre que detectan microorganismos viables. Para "mantener" esta correlación, algunos enfoques proponen la identificación de los agentes infecciosos utilizando métodos en base molecular a partir de hemocultivos positivos. Sin embargo, la relevancia clínica de estos enfoques sigue siendo limitada, dado que todavía se requiere del método de cultivo que consume tiempo. Esta cuestión es aún de mayor importancia, dado que los métodos moleculares fallan en la gran mayoría de los casos en proporcionar información sobre el espectro de susceptibilidad antimicrobiana de la bacteria, esto último todavía se basa en los enfoques tradicionales de cultivo.

Conociendo estas deficiencias, el desarrollo de nuevos métodos que permitan la detección e identificación rápida y fiable de microorganismos en la sangre sigue siendo una cuestión de gran relevancia. Por otra parte, la detección de agentes infecciosos en la sangre que se muestra en el presente documento es un ejemplo típico para ilustrar la complejidad de los procedimientos de preparación de muestras y su gran importancia, en general en bioensayos y en el diagnóstico médico en particular. Los ensayos para determinar la presencia de moléculas o partículas objetivo en una variedad de muestras, incluidos las muestras de alimentos, clínicas, del medio ambiente y experimentales, son de una importancia creciente.

Características de la invención

La presente invención se refiere a un método para la preparación y procesamiento de muestras que da como resultado una separación eficaz de moléculas o partículas objetivo de un medio líquido complejo circundante. Este método permitirá adicionalmente recuperar el o los citados objetivos en una concentración elevada en un medio tampón controlado, en un volumen que es preferentemente, como mínimo, un 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, la ventaja del método descrito es la capacidad de alcanzar una tasa de concentración de 1/100 a 1/1000 del volumen de muestra inicial. El o los objetivos concentrados de esta forma posteriormente pueden ser procesada

muy fácilmente a través de otra u otras etapas de purificación y/o analizarse directamente utilizando métodos del estado de arte.

5 El método de preparación de muestras dado a conocer está particularmente adaptado para ser utilizado con diversas fuentes de muestra y un amplio espectro de tamaños de volumen. Además, la separación según la presente invención permite separar específica o no específicamente la o las partículas o moléculas objetivo a partir de volúmenes de muestra complejos utilizando la selección por tamaño y/o afinidad.

10 Por consiguiente, la presente invención da a conocer un método de preparación de muestras que, por lo tanto, presenta la ventaja de que se utiliza universalmente para prácticamente cualquier tipo de muestra y objetivo.

15 En base al método dado a conocer, la presente invención da a conocer además un dispositivo de recogida de muestras que se pueden utilizar muy fácilmente de forma manual o se puede integrar con los sistemas automatizados del estado de la técnica, lo que hace a este método de preparación de muestras, por lo tanto, fácilmente integrable en los flujos de trabajo de laboratorio de rutina.

20 La base técnica del método de preparación de muestras dado a conocer se basa en la observación de los presentes inventores acerca de la posibilidad de separar de manera eficiente los microorganismos objetivo, tales como partículas bacterianas o de hongos, típicamente de muestras de sangre, mediante la conversión, de una manera controlada y estandarizada, del fibrinógeno en fibrina a través de coagulación controlada la muestra de sangre utilizando la enzima trombina para atrapar dichas partículas objetivo dentro de una red de fibrina que rápidamente se retrae para formar un pequeño gránulo dentro del recipiente de sangre. Cuando se forma el gránulo, la muestra de sangre circundante se puede decantar lo que conduce a la separación de los objetivos atrapados dentro de este pequeño gránulo. En una segunda etapa, el gránulo se puede lisar para recuperar los objetivos de su trampa de fibrina dentro de un pequeño volumen de un tampón controlado. Mediante este proceso, el tamaño más pequeño del gránulo es un factor clave que necesita ser controlado ya que determinará la tasa de concentración del método dado a conocer.

30 Por consiguiente, por muestra de sangre se hace referencia a sangre completa, plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas o suero. Según la presente invención, la sangre puede, obviamente, referirse también a sustitutos de la sangre o muestras compuestas constituidas artificialmente a partir de componentes sanguíneos, aditivos de sangre o cualquier otro componente que imite las funciones de la sangre. Entre los ejemplos típicos de este tipo de componentes sanguíneos y que se utilizan normalmente en las transfusiones de sangre se incluyen concentrados de plaquetas concentradas de glóbulos rojos (hemoglobina), sustitutos de suero o plasma (también conocidos como expansores de volumen). En caso de que dicha muestra de sangre sea deficiente en factores de coagulación (principalmente fibrinógeno) como, por ejemplo, en algunos casos clínicos, tales como muestras de sepsis, muestras de sangre compuestas o sustitutos de la sangre, esta deficiencia puede ser compensada mediante la adición de factores de coagulación que incluyen fibrinógeno a dicha muestra de sangre como un componente obligatorio para ser capaz de separar partículas o moléculas objetivo según la presente invención.

40 Aunque la presente invención da a conocer preferentemente tal como en el texto un método de separación de microorganismos o moléculas infecciosas o partículas de una muestra de sangre, se reconocerá por una persona técnica en la materia que la muestra de la presente memoria descriptiva en la sangre también se puede referir a una muestra compuesta que incluye componentes sanguíneos que entran en el proceso de coagulación controlada tal como se ha descrito anteriormente.

50 Por consiguiente, en general, la presente invención da a conocer, por lo tanto, un método de separación y concentración de partículas o moléculas objetivo a partir de muestras que contienen proteínas de fibrinógeno al atrapar, en una primera etapa, dichas moléculas o partículas objetivo en una red de fibrina mediante la conversión, como mínimo, parcial, del fibrinógeno contenido en dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina. En una segunda etapa, la red de fibrina formada de este modo forma un coágulo de fibrina que se separará del medio de la muestra circundante.

55 En una realización, la separación según la presente invención se obtiene por selección del tamaño atrapando dicha partícula objetivo. En este proceso de captura, el tamaño del poro de la red de fibrina, por lo tanto, es particularmente crítico. De hecho, cuanto más pequeño sea el tamaño de poro más eficazmente conducirá a una captura de los microorganismos infecciosos pequeños tales como *E. coli* (2 μm) o *Chlamydia* (0,3 μm) o incluso virus. A este respecto, el control de la red de fibrina de captura se puede realizar mediante el ajuste de los parámetros, tales como el pH y la fuerza iónica de la muestra y las concentraciones de calcio, fibrinógeno y trombina en dicha muestra.

60 En una realización, la separación según la presente invención se obtiene por afinidad atrapando dicha partícula objetivo en la red de fibrina. El descubrimiento de los presentes inventores es que las partículas bacterianas tales como *Staphylococcus aureus* tienen una fuerte afinidad por las moléculas de fibrinógeno/fibrina, lo que facilita aún más (mejora) su separación y concentración según el método de la presente invención. Al imitar la interacción por

afinidad de partículas bacterianas, la presente invención da a conocer la utilización de interacciones de afinidad nativas, así como las inducidas para separar los objetivos a partir de las muestras que contienen fibrinógeno.

La separación por afinidad inducida, según una realización preferente de la presente invención, se realiza con la o las proteínas recombinantes de fibrinógeno compuestas de proteína o proteínas de fusión de fibrinógeno que comprenden un resto de dominio de captura dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo. En otra realización la captura química está asegurada por un resto de unión a fibrina/fibrinógeno, tal como una proteína de unión a fibrinógeno de *Staphylococcus aureus* y un resto de captura de sustancias, tal como un anticuerpo dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo.

Por consiguiente, se puede utilizar la captura por tamaño dentro de la red de fibrina, así como reacciones de unión por afinidad específicas para la determinación o el aislamiento de una amplia gama de sustancias objetivo en muestras biológicas. Ejemplos de sustancias objetivo son células, componentes celulares, subpoblaciones de células (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácidos nucleicos y similares.

Por lo tanto, el fibrinógeno, tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva, puede ser un fibrinógeno natural obtenido de cualquier fuente de sangre, tal como por ejemplo, sangre humana o sangre de vertebrados en general. El fibrinógeno según la presente invención puede ser también una molécula sintética compuesta obtenida mediante la combinación de fibrinógeno natural con cualquier otra molécula en una forma de obtener una nueva molécula con, por ejemplo, una nueva funcionalidad de afinidad. En una realización preferente, la molécula combinada de este modo se obtiene mediante una unión covalente de una molécula de fibrinógeno a otra molécula. En otra realización, la molécula combinada de este modo es una proteína de fusión producida mediante las técnicas de síntesis de proteínas recombinantes del estado de la técnica.

El fibrinógeno, tal como se hace referencia en la presente memoria descriptiva, puede ser también una molécula de fibrinógeno sintetizada modificada que tendrá toda la estructura cristalina de fibrinógeno. En una realización preferente, la molécula de fibrinógeno sintetizada es una molécula modificada que tendrá diferente estructura, tamaño, composición y actividad de afinidad. Más particularmente, es deseable que el fibrinógeno según la presente invención sea una molécula de estructura simplificada (en lugar de la molécula de fibrinógeno natural grande y compleja) que todavía exprese la actividad de escisión (polimerización) por trombina y que pueda tener reacción de unión por afinidad definida hacia la o las partículas o moléculas objetivo.

Por lo tanto, la presente invención da a conocer la utilización de fibrinógeno o proteínas modificadas de fibrinógeno como un vehículo para atrapar o capturar la o las partículas o moléculas objetivo. Tras la exposición de dichas proteínas de fibrinógeno o fibrinógeno modificado a la trombina escinde las moléculas de fibrinógeno y las transforma en fibrina. Posteriormente, las partículas de fibrina autopolimerizan para formar un pequeño coágulo en el que están atrapados los objetivos dando como resultado, por lo tanto, la separación del objetivo fuera del volumen de líquido de muestra. El método propuesto presenta una gran ventaja en comparación con las técnicas del estado de la técnica, tales como partículas magnéticas, por ejemplo, o cualquier otra tecnología en base "superficie sólida". Como tiene lugar a nivel molecular, la reacción entre los objetivos y el vehículo fibrinógeno es muy rápida y eficiente y se pueden eliminar los problemas de unión no específicos inherentes a ensayos basados en superficie.

Basado en esto y en una utilización particular, la presente invención da a conocer un método que permite proporcionar una solución de separación y concentración eficaz de microorganismos intactos a partir de una muestra de sangre infectada. Un objetivo alcanzable de esto es la separación de pequeñas cantidades de microorganismos de grandes volúmenes de sangre, lo que permite posteriormente su concentración en un pequeño volumen de tampón compatible con etapas de procesamiento posteriores. Otro objetivo alcanzable de la presente invención es la separación de microorganismos intactos de una muestra de sangre que pueden posteriormente ser detectados y analizados por técnicas específicas reconocidas en la técnica. Una vez conseguido, en cambio, este método abre muchas posibilidades en la detección y diagnóstico rápido y eficaz de infecciones del torrente sanguíneo utilizando los métodos de cultivo rápido, así como ensayos en base molecular rápidos y más sensibles.

Por lo tanto, resulta claro que a partir de la descripción anterior que el fibrinógeno según la presente invención puede ser nativo de la muestra (es decir, muestras de sangre entera) o añadido artificialmente a dicha muestra.

Basado en esto y en una utilización particular, la presente invención da a conocer un método para separar la o las moléculas o partículas objetivo a partir de una muestra compuesta, que comprende las etapas:

- (a) Añadir el fibrinógeno a dicha muestra.
- (b) Capturar dichas moléculas o partículas objetivo en una red de fibrina mediante la conversión del fibrinógeno añadido a dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina.
- (c) Retraer dicha red de fibrina para formar un coágulo de fibrina.

(d) Separar dicho coágulo de fibrina a partir del medio de muestra circundante.

Una muestra compuesta según la presente invención puede incluir, sangre, derivados de la sangre o componentes de muestras de sangre, pero también se puede referir a cualquier muestra libre de fibrinógeno tal como por ejemplo, sin que constituya limitación, muestras clínicas (como orina, esputo y frotis), alimentarias y medioambientales.

Por consiguiente, la presente invención da a conocer además un dispositivo de recogida de muestras para la separación de moléculas o partículas objetivo de una muestra, que comprende: (i) un código de identificación; (ii) un recipiente para contener dicha muestra; y (iii) una muestra que contiene fibrinógeno en el recipiente, siendo operable el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas objetivo tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a la trombina dentro de dicho dispositivo.

El dispositivo según la presente invención puede ser un tubo de reacción estándar o depósito diseñado para recibir una muestra de fluido que tiene que ser examinado posteriormente por la existencia de la o las partículas o moléculas objetivo, tal como por ejemplo, la o las partículas de patógenos (bacterias, virus, etc.) o la o las moléculas objetivo (ADN, ARN o proteína, etc.). El dispositivo de la presente invención incluirá además formulaciones de reactivos estables que conducirán a la formación de coágulos de fibrina con el objetivo de la separación tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Preferentemente, el dispositivo incluye una zona de reacción que contiene sus formulaciones de reactivos estables almacenados que incluyen factores de coagulación, tales como moléculas de fibrinógeno y agentes de promoción de la coagulación, tales como enzimas de trombina. Este dispositivo permitirá el aislamiento cuantitativo y detección de objetivos, tales como agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y proteínas en un kit de prueba, en un número de copias muy bajo de cualquier muestra biológica compleja. El hecho de que el dispositivo dado a conocer permitirá recoger la muestra y al mismo tiempo para separar y concentrar de forma eficaz partículas o moléculas objetivo de dicha muestra simplificará considerablemente las etapas de procesamiento de muestras necesarias y aún más dará como resultado una reducción de los riesgos potenciales de infección y los riesgos de contaminación.

Por consiguiente, un aspecto principal de la presente invención se refiere a un método para la separación de moléculas o partículas objetivo de una muestra que contiene fibrinógeno, obtenido según la reivindicación independiente 1.

En las reivindicaciones dependientes se exponen formas de realización diferentes.

Descripción breve de los dibujos

Los objetos y características de la presente invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención, bien en cuanto a su organización y manera de funcionamiento, junto con otros objetos y ventajas, se puede comprender mejor con referencia a la siguiente descripción, tomada en conexión con los dibujos adjuntos, en los que

- La figura 1 es una representación esquemática del proceso de coagulación ([Ref. http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation](http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation)) y que muestra la conversión de fibrinógeno en fibrina que se puede utilizar para alcanzar el objetivo principal de la presente invención.

- La figura 2 es una representación esquemática del mecanismo de captura de la o las moléculas o partículas objetivo -2- en una red de fibrina -3- tras la exposición de una muestra que contiene fibrinógeno -1- a trombina.

- La figura 3 es una representación esquemática de las diferentes formas de realización para la captura por afinidad de la o las moléculas o partículas objetivo en una red de fibrina tras la exposición de una muestra que contiene fibrinógeno a la trombina: (a) afinidad nativa de los objetivos -2- que tienen un resto de unión -4- a fibrinógeno/fibrina -1-; (b) la captura por afinidad a través de una captura por sustancias -5- dirigidas contra dicho o dichos objetivos -2- y que tienen un resto de unión -4- de fibrina/fibrinógeno -1-; (c) captura por afinidad a través de una proteína de fusión de fibrinógeno -1- con un resto de dominio de captura -7- dirigido contra el o los objetivos -1-.

- La figura 4 es una representación esquemática de una variación de la captura por afinidad de la figura 3 (b), en la que la captura por afinidad se realiza a través de la sustancia de captura -5- dirigida contra dicho o dichos objetivos -2- y que tiene un resto de unión -4- de fibrina -3-. En una realización preferente, la afinidad del resto -4- a la fibrina se transformará en una forma activa -4- sólo después de la etapa de exposición de la muestra a la trombina.

- La figura 5 es una representación esquemática de un proceso completo de ensayo de separación de objetivos para la detección y en el que el o los objetivos -2- dentro de una muestra que contiene fibrinógeno -1- son expuestos a una sustancia de captura -5- que comprende un resto de unión de fibrina/fibrinógeno -4- y una sustancia de marcado -8- que comprende una marca de detección -9-. Tras la exposición a la trombina el complejo "objetivo u objetivos/ sustancia de captura/sustancia de marcado" será separado dentro de un coágulo de fibrina retraído. La detección del objetivo se llevará a cabo directamente en el concentrado de coágulos.

- La figura 6 es una representación esquemática de una operación del dispositivo de recogida de muestra; el dispositivo es operable para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas objetivo tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a la trombina dentro de dicho dispositivo.

Descripción detallada de la invención

Según una realización de la presente invención, un método para la separación de moléculas o partículas objetivo de una muestra de sangre comprende:

(a) Capturar dichas moléculas o partículas objetivo en una red de fibrina mediante la conversión, como mínimo, parcial, del fibrinógeno contenido en la dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina;

(b) Retraer dicha red de fibrina para formar un coágulo de fibrina;

(c) Separar dicho coágulo de fibrina a partir del medio de muestra circundante.

Por consiguiente, por muestra de sangre se hace referencia a sangre completa, plasma rico en plaquetas, y plasma pobre en plaquetas. Muestra de sangre se puede referir también al suero en el que esta condición el fibrinógeno se debe añadir a dicha muestra para permitir que el mecanismo de separación funcione según la presente invención. Sangre según la presente invención, obviamente, puede referirse también a sustitutos de la sangre o muestras compuestas artificialmente constituidas a partir de componentes sanguíneos, aditivos de sangre o cualquier otro componente que imite las funciones de la sangre. Entre los ejemplos típicos de este tipo de componentes sanguíneos y que se utilizan normalmente en las transfusiones de sangre se incluyen concentrados de plaquetas, concentrados de glóbulos rojos (hemoglobina), sustitutos de suero o plasma (conocidos también como expansores de volumen). En caso de que dicha muestra de sangre sea deficiente en factores de coagulación (principalmente fibrinógeno) tal como, por ejemplo, en algunos casos clínicos como muestras de sepsis, muestras de sangre compuestas o sustitutos de sangre, esta deficiencia puede ser compensada mediante la adición de factores de coagulación que incluyen fibrinógeno a dicha muestra de sangre como un componente obligatorio para ser capaz de separar partículas o moléculas objetivo según la presente invención.

Por lo tanto, la muestra de sangre se puede referir además a una muestra de sangre compuesta artificialmente obtenida mediante la combinación de una muestra de sangre con una muestra deficiente en fibrinógeno. Dicha muestra deficiente en fibrinógeno puede incluir muestras de cualquier fuente tal como, por ejemplo, muestras biológicas, clínicas, alimentarias y ambientales. Más particularmente, el término muestra de sangre, según la presente invención, abarca una muestra de sangre compuesta artificialmente mediante la combinación de factores de coagulación que incluyen, como mínimo, fibrinógeno con una muestra deficiente en fibrinógeno.

Tal como se utiliza generalmente en la presente memoria descriptiva, "red de fibrina" significa el producto de un proceso en el que el fibrinógeno se escinde tras la exposición a la enzima trombina y se convierte en fibrina. Una vez que el fibrinógeno se convierte en fibrina, se produce una etapa de autopolimización en la que los monómeros de fibrina se unen y forman una red de polímero tridimensional reticulado no covalentemente. Además, en presencia del factor de coagulación XIII, la red de fibrina se reticulará por el factor XIIIa, una transglutaminasa activada por la trombina del factor XIII. Existen otras transglutaminasas y también pueden estar involucradas en la reticulación covalente y el injerto en la red de fibrina.

Tal como se utiliza generalmente en la presente memoria descriptiva, "formación y retracción del coágulo" significa el tensado observado de la matriz de fibrina para formar un coágulo después de un cierto tiempo. El tamaño de este coágulo se puede, en ciertas condiciones, reducir en el tiempo (es decir, retracción del coágulo) expulsando agua fuera del coágulo. Naturalmente, la retracción del coágulo está inducida por la liberación de múltiples factores de coagulación de las plaquetas activadas atrapadas en la red de fibrina del coágulo.

Para la formación de la red de fibrina, las concentraciones de la solución de fibrinógeno y/o las soluciones de trombina tienen un efecto significativo sobre la densidad de la red formada, la formación del coágulo, la reticulación y la velocidad de la matriz de fibrina final. Típicamente, la reducción de la cantidad de trombina y fibrinógeno ralentiza el proceso de reticulación y contribuye a formar un coágulo de fibrina con una red menos densa. Por consiguiente, el control de la proporción de las cantidades de trombina y fibrinógeno, conduce a una formación controlada de la densidad de la red de fibrina y el tamaño del coágulo final. Además, la proporción de la cantidad de trombina a fibrinógeno proporciona matrices de fibrina con una red menos densa que es más adecuada para la captura de objetivos. Por otra parte, la proporción de la cantidad de trombina a fibrinógeno proporciona un coágulo de fibrina retraído con un tamaño más pequeño que permite alcanzar un índice de concentración elevado de las partículas o moléculas objetivo separadas.

El mecanismo subyacente de la presente invención es que la conversión de fibrinógeno en fibrina conduce a la formación de una red de fibrina que desempeñará el papel de una red que capturará las partículas o moléculas

objetivo. Para obtener el efecto deseado, el control de dicha formación de la red de fibrina es particularmente importante. A este respecto, la concentración de trombina y fibrinógeno como los factores clave de la coagulación son críticos en la formación de la red de fibrina de captura y, por lo tanto, en la creación de coágulos y la separación según la presente invención. De hecho, una alta concentración de trombina y fibrinógeno conduce a una red de fibrina muy densa y un tamaño de coágulos grandes, lo que no es deseable. Sin embargo, el descubrimiento es que concentraciones menores de trombina y fibrinógeno conducen a la formación de una red de fibrina relajada que se retrae rápidamente a una formación de gránulos pequeños en el recipiente o contenedor de muestra. Durante esta retracción, la red de fibrina atrapa las partículas o moléculas objetivo del volumen de la muestra, lo que conduce a su concentración y la separación de dicha muestra.

Para conseguir los efectos deseados en la captura y la separación eficaz de las partículas o moléculas objetivo a partir de una muestra que contiene fibrinógeno, la concentración de dicho fibrinógeno en la muestra es preferentemente, como mínimo, 0,1 µg/ml. En una realización preferente la concentración de fibrinógeno en la muestra está entre 10 mg/ml a 10 µg/ml. La utilización de una concentración más elevada, incluso superior a los intervalos mencionados en el presente documento, también se puede utilizar, pero da como resultado una densidad de la matriz de fibrina y tamaño del coágulo retraída más elevados. En el caso de separar partículas objetivo mediante selección por tamaño o captura por tamaño, es particularmente adecuado utilizar una concentración relativamente alta de fibrinógeno. Cuanto menor es el tamaño de la o las partículas objetivo mayor es la concentración de fibrinógeno requerida. Sin embargo, la desventaja de utilizar concentraciones más elevadas de fibrinógeno es la formación de un coágulo de tamaño más grande, lo que da como resultado una tasa de concentración más baja de la o las partículas objetivo. Por lo tanto, en la práctica y en el caso de una selección por tamaño o atrapamiento por tamaño, la concentración de fibrinógeno se debe optimizar de una manera para alcanzar la máxima eficiencia de captura y al mismo tiempo un tamaño coágulo inferior.

Resulta bien entendido de la descripción anterior que el fibrinógeno según la presente invención puede ser nativo de la muestra (es decir, muestras de sangre) o añadirse artificialmente a dicha muestra. En una realización preferente, el fibrinógeno se añadirá a una muestra incluso si dicha muestra tiene fibrinógeno nativo, como es el caso de la sangre completa, por ejemplo. Esto será ventajoso, por ejemplo, para compensar cualquier deficiencia de fibrinógeno o la variación en la concentración del fibrinógeno nativo que puede tener lugar en estas muestras. En otra realización preferente, el fibrinógeno que se añade a una muestra de sangre (incluso si la concentración de fibrinógeno nativo está en la concentración deseada) se originará de una fuente de sangre de una especie diferente que la de la muestra bajo consideración. Por ejemplo, si se utiliza una muestra de sangre entera humana, según esta realización, se puede añadir un fibrinógeno originado a partir de otro vertebrado, tal como bovino, ovejas, zarigüeya o pollo a dicha muestra humana. Utilizando el hecho de que la reacción de fibrinógeno/trombina puede ser específica de la especie, un efecto deseado mediante la utilización de diferentes fuentes de fibrinógeno como aditivos para una muestra con fibrinógeno nativo es utilizar específicamente el fibrinógeno añadido (preferentemente activado con trombina de especies afines) para llevar a cabo la separación de objetivos evitando o minimizando al mismo tiempo la interferencia del fibrinógeno nativo en el proceso de separación. Esto puede ser particularmente ventajoso, ya que permitirá un control más efectivo del proceso de separación del o de los objetivos y evita depender de las variaciones del fibrinógeno nativo. En el mismo espíritu, en otra realización, el fibrinógeno añadido será una proteína recombinante de fibrinógeno diseñada específicamente para ser no escindible por la trombina endógena de la muestra de sangre en condiciones de utilización.

Por consiguiente, el efecto deseado de la captura y la separación eficaz de las partículas o moléculas objetivo de una muestra que contiene fibrinógeno se puede conseguir sometiendo dicha muestra a la trombina o a enzimas similares a la trombina. A este respecto, dicha trombina puede ser una trombina o enzimas de tipo trombina exógenos (añadido artificialmente a dicha muestra) o endógena (ya parte de dicha muestra). Por consiguiente, la trombina puede estar en forma activa o generarse a través de la activación de factores de coagulación, tales como el factor X, tal como se muestra en la figura 1. El origen de esta trombina y/o estos factores de coagulación puede ser humano, animal o de insecto. Por consiguiente, por enzimas similares a la trombina se hace referencia a la familia de serina proteasas obtenidas a partir de fuentes fuera de sangre y que tienen la capacidad de convertir fibrinógeno en fibrina. Estas enzimas son bien conocidas en la técnica y generalmente se obtienen a partir de veneno de serpiente o se producen en forma recombinante.

En una realización preferente, la concentración de trombina es de 0,01 a 10 I.U/ml y preferentemente está dentro del intervalo de 0,1 a 2 I.U/ml de muestra. En la práctica, la cantidad de la trombina o enzima de tipo trombina debe estar bastante ajustada en correspondencia con la concentración de fibrinógeno en el dispositivo para obtener la estructura de la red de fibrina y el tamaño del coágulo deseados. A este respecto, la cantidad de trombina es preferentemente menor que 20 I.U de trombina por mg de fibrinógeno, preferentemente en un intervalo entre 0,01 y 10 I.U de trombina por mg de fibrinógeno, más preferentemente entre 0,1 y 1 I.U de trombina por mg de fibrinógeno.

En una realización preferente, para controlar la estructura de la red de fibrina con el fin de atrapar moléculas o partículas objetivo de una muestra, se puede ajustar también la concentración de calcio. En la práctica esto se puede lograr mediante la adición de una fuente de iones de calcio a la muestra de prueba. La fuente de iones de calcio es preferentemente cloruro de calcio (CaCl₂), preferentemente en un intervalo de concentración entre 1 a 10 mg por ml de volumen de muestra, aún más preferentemente entre 4 y 7 mg por ml de volumen de muestra, lo más

preferentemente entre 5-6 mg por ml de volumen de muestra. En muestras de sangre, por ejemplo, el calcio está presente naturalmente y el ajuste de la concentración de calcio se puede lograr mediante la adición además de agentes quelantes de calcio seleccionados del grupo de GDTA, EDTA y citrato.

5 En un aspecto preferente, para controlar la estructura de la red de fibrina con el fin de atrapar moléculas o partículas objetivo de una muestra, el método puede implicar la etapa de adición de factor de coagulación XIII a dicha muestra. El factor de coagulación XIII es un enzima capaz de catalizar la formación de reticulación en la matriz de fibrina después de que haya sido activada por la trombina. Esto ayudará además a estabilizar la estructura de la red de fibrina, acelerar la retracción del coágulo y contribuir a titular la porosidad de la fibrina. Este factor XIII en sus
10 formatos inactivo o activo (XIIIa) se puede añadir o ajustarse junto con el aditivo de fibrinógeno en un intervalo de concentración entre 0,5 y 100 I.U por ml de volumen de muestra, más preferentemente entre 1 y 60 I.U por ml de volumen de muestra, y más preferentemente entre 1 y 10 I.U por ml de volumen de muestra.

15 Se desprende de la descripción anterior que el objetivo alcanzable más importante del método según la presente invención es el de concentrar eficazmente la o las partículas o moléculas objetivo de la muestra de prueba. El factor o tasa de concentración estará determinado por el tamaño del coágulo. Por lo tanto, en un aspecto preferente, el tamaño del coágulo formado es, como mínimo, 1/3 del tamaño inicial de la muestra y, preferentemente, el tamaño del coágulo es inferior a 1/10 del volumen de muestra inicial. Por otra parte, en una realización preferente según la presente invención, el coágulo se retrae para formar además un pequeño gránulo con un tamaño que puede
20 alcanzar valores que están entre 1/50 y 1/1000 del volumen de muestra inicial.

Para alcanzar una mayor tasa de retracción, como ya se ha descrito anteriormente, las concentraciones de fibrinógeno y trombina son los factores predominantes. Otros parámetros tales como la concentración de calcio y aditivos como el factor de coagulación XIII puede afectar el tamaño del coágulo. Sin embargo, en la práctica, el
25 coágulo puede retraerse aún más en la presencia de células de plaquetas activadas o lisados celulares de plaquetas activadas dentro de dicha muestra. Naturalmente presentes en muestras de sangre o como un aditivo en muestras compuestas de la sangre, la activación de las plaquetas se puede lograr con los agonistas de plaquetas seleccionados del grupo de difosfato de adenosina (ADP) y colágeno.

30 Por consiguiente, la presente invención da a conocer un método para separar la o las molécula o partículas objetivo a partir de una muestra que contiene fibrinógeno, que incluye la etapa de someter dicha muestra a células de plaquetas activadas o lisado celular de plaquetas. En un aspecto preferente, dichas células de plaquetas activadas o lisado celular de plaquetas pueden estar presentes de forma nativa en dicha muestra o añadirse artificialmente a dicha muestra. La activación de las plaquetas se consigue preferentemente mediante ADP a una concentración de 1
35 mM a 1 μ M y preferentemente entre 100 μ M y 10 μ M.

Para alcanzar una mayor tasa de retracción, en una realización preferente, se pueden utilizar partículas magnéticas atrapadas en la red de fibrina como un medio de retracción para comprimir y, por lo tanto, reducir el tamaño del
40 coágulo. En la práctica, de hecho, las partículas magnéticas se utilizarán para emular la función natural que desempeñan las plaquetas en la retracción del coágulo de fibrina. Esta retracción se puede conseguir sometiendo las partículas magnéticas atrapadas dentro de un coágulo de fibrina a una fuerza magnética externa. Por consiguiente, dichas partículas magnéticas están atrapadas dentro del coágulo de fibrina debido a su mayor tamaño en comparación con la porosidad de la red de fibrina. En una realización preferente, las partículas magnéticas quedan atrapadas dentro del coágulo de fibrina por la interacción de afinidad que dichas partículas pueden tener con
45 el fibrinógeno/fibrina. Esto se puede lograr utilizando partículas magnéticas recubiertas con un resto de unión de fibrinógeno/fibrina que se puede seleccionar a partir de grupos de trombina, factor de coagulación XIII, proteínas bacterianas de unión a fibrinógeno y activador del plasminógeno tisular (t-PA).

50 Para concentrar aún más las moléculas o partículas objetivo, la presente invención da a conocer además la utilización de captura por afinidad para capturar dichos objetivos dentro de la red de fibrina. Las ventajas de la utilización de la captura por afinidad son dobles: (1) la captura de objetivos pequeños que son difíciles de capturar o no pueden ser capturados mediante atrapamiento por tamaño dentro de la red de fibrina; (2) el permitir un nivel elevado de concentración (es decir, coágulo muy pequeño o más bien un gránulo) de los objetivos, dado que con la
55 captura por afinidad se requiere menor concentración de fibrinógeno para lograr el rendimiento de captura eficaz. De hecho, con la captura por afinidad se puede esperar alcanzar una tasa de concentración que es menor que el 1/50 del volumen de muestra inicial y, preferentemente, entre 1/100 y 1/1000 del volumen de muestra inicial. Con un volumen de muestra grande (3 - 10 ml, por ejemplo), la tasa de concentración puede ser incluso menor de 1/1000 del volumen de muestra inicial.

60 Tal como se ilustra en la figura 3 (a), en una primera realización preferente, la captura por afinidad puede lograrse mediante la afinidad nativa de los objetivos -2- que tienen un resto de unión -4- a fibrinógeno/fibrina -1-. Un ejemplo típico de este atrapamiento por afinidad es la captura de *Staphylococcus aureus*, que se sabe que tiene una afinidad hacia fibrinógeno/fibrina eficaz a través de su factor de aglutinación A (ClfA), proteína de unión a superficie de fibrinógeno. Tal como se describe más en general y exhaustivamente en la solicitud de patente internacional
65 WO2011/007004, estafilococos, estreptococos y enterococos portan proteínas llamadas adhesinas que pueden mediar la infección mediante la unión a proteínas que incluyen fibrinógeno. En caso de la sangre, otra ventaja del

método según la presente invención es la utilización de la afinidad natural de las células de sangre para precipitar además células de leucocitos y trombocitos dentro del pequeño gránulo de fibrina mientras los eritrocitos se mantienen sustancialmente en suspensión. Esto es particularmente importante porque los microorganismos no siempre están en la muestra de sangre de flotación libre, sino que más bien están asociados a los leucocitos y trombocitos o secuestrados en los mismos. Por ejemplo, en el caso de *Staphylococcus aureus*, la interacción y, posteriormente, el secuestro y la supervivencia bacteriana en plaquetas contribuyen a la virulencia, ya que permite a las bacterias escapar de las defensas del huésped. La captura por afinidad nativa también puede utilizarse para capturar pequeñas moléculas, tales como los ácidos nucleicos que se unen fuertemente a la fibrina debido a la interacción de carga eléctrica. En cuanto a las partículas bacterianas, la afinidad nativa se puede extender a pequeñas moléculas de proteínas tan pronto como estas moléculas tengan una afinidad de interacción directa hacia fibrinógeno/fibrina.

En un aspecto preferente, el proceso de separación por afinidad nativa se puede adaptar mediante la utilización de fibrinógeno a partir de diferentes especies. Por ejemplo, utilizando fibrinógeno ovino en lugar de fibrinógeno humano se reducirá la tasa de captura de *Staphylococcus aureus*. Esto es debido al hecho de que el fibrinógeno ovino muestra una baja afinidad de unión hacia la bacteria *Staphylococcus aureus*. En la misma dirección, el fibrinógeno en condiciones de utilización dentro de la muestra puede ser un fibrinógeno recombinante o uno modificado diseñado para potenciar o inhibir la captura por afinidad nativa del fibrinógeno hacia unos objetivos o grupos objetivo definidos.

Una segunda forma de realización de la captura por afinidad se ilustra en la figura 3 (b). Por consiguiente, la afinidad se realiza utilizando una sustancia de captura -5- dirigida contra dicho o dichos objetivos -2- y que tiene a su vez un resto de unión -4- a fibrina/fibrinógeno -1-. La utilización de una sustancia de captura como un medio intermedio para marcar los objetivos, es preferente en el caso de que el objetivo no tenga una afinidad nativa hacia fibrinógeno/fibrina. Un ejemplo típico de esto es la captura de especies gram-negativas que en la mayoría de casos carecen de afinidad nativa hacia fibrinógeno/fibrina. Esto se puede realizar, por ejemplo, mediante la utilización de un anticuerpo específico gram-negativo que tiene un resto de unión a fibrinógeno. Además, la captura por afinidad indirecta puede extenderse prácticamente a cualquier partícula o molécula objetivo, entre las que se pueden incluir, sin que constituya limitación, células objetivo, componentes de células, subpoblaciones de células (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácidos nucleicos y similares. Para lograr esto, el resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo se selecciona del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente las citadas moléculas o partículas objetivo. Además, dicho resto de captura de sustancia se puede acoplar o combinar con un resto de unión a fibrina/fibrinógeno seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas bacterianas de unión a fibrinógeno, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo. En una realización preferente, dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dicho resto de captura de sustancias están unidos covalentemente.

Una tercera forma de realización de la captura por afinidad se ilustra en la figura 3 (c). Por consiguiente, la afinidad se realiza mediante la proteína fusión de fibrinógeno -1- con un dominio de resto de captura -7- dirigido contra el o los objetivos -1-. La utilización de una proteína de fusión de fibrinógeno presenta la ventaja de combinar la selectividad de la captura por afinidad directamente dentro de las moléculas de fibrinógeno. Dentro de este punto de vista, la molécula de fibrinógeno puede estar producida a medida o específicamente diseñada para capturar específicamente y posteriormente separar un grupo o grupos de objetivos específicos. Además, la proteína modificada o recombinante de fibrinógeno se puede diseñar para evitar la o las interacciones nativas y/o mejorar la interacción específica de las moléculas o partículas dentro de un tipo de muestra específico. Además, en otra realización, la proteína de fusión de fibrinógeno incluye además un sitio de degradación. Esto será particularmente útil para la recuperación de las moléculas o partículas objetivo unidas fuera de la red de fibrina durante una etapa de lisis, tal como se describirá más adelante. En una realización preferente, el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimático o hidrolítico. En una realización más preferente, el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática, que se escinde por una enzima seleccionada del grupo que comprende plasmina y metaloproteinasas de matriz.

En un aspecto preferente y tal como se ilustra en la figura 4, la captura por afinidad se lleva a cabo a través de una sustancia de captura -5- dirigida contra dicho o dichos objetivos -2- y que tiene un resto de unión -4'- específico hacia la fibrina -3- sin ninguna afinidad hacia fibrinógeno, tal como utilizar activador del plasminógeno de tipo tisular como un resto de unión a fibrina. En una realización preferente, la afinidad de la fracción -4'- hacia la fibrina se transformará en una forma activa -4- sólo después de la etapa de exposición de la muestra a la trombina, tal como en el caso de la utilización de factor XIII como un resto de unión a fibrina.

En utilización, esta invención no sólo implica un procedimiento para separar y concentrar moléculas o partículas objetivo, sino que también puede incluir además la etapa de detección de dichos objetivos tal como se ilustra en la figura 5. A este respecto, el procesamiento de ensayo incluye la etapa de captura y separación del objetivo dentro de un coágulo de fibrina seguido por la detección de dichos objetivos directamente dentro del concentrado de coágulo. Esto puede lograrse por ejemplo, mediante la exposición del fibrinógeno -1- que contiene la muestra a una sustancia de captura -5- que comprende un resto de unión a fibrina/fibrinógeno -4- y una sustancia de marcado -8- que

comprende una marca de detección -9-. Esto conduce a la formación de un complejo "objetivo u objetivos/sustancia de captura/sustancia de marcado". Tras la exposición a trombina, el complejo "objetivo u objetivos /sustancia de captura/sustancia de marcado" será separado dentro de un coágulo de fibrina retraída -3-. La detección del objetivo se llevará a cabo directamente en el concentrado de coágulo mediante, por ejemplo, la exposición del coágulo de fibrina a una fuente de excitación -10- de la marca -8-, dando como resultado una emisión de una señal de detección -11-. En general, la metodología de detección dependerá de la marca utilizada y, para éstas, se pueden adoptar las metodologías de detección bien conocidas tales como fluorescencia, luminiscencia, SERS (Espectroscopia Raman potenciada de superficie) (Surface Enhanced Raman Spectroscopy) y espectroscopia Raman.

Después de la formación de gránulos y la separación del objetivo, en un aspecto preferente, el coágulo o gránulo de fibrina se puede suspender en una solución tamponada controlada seguido de perturbación (es decir, lisis) del coágulo para recuperar el o los objetivos separados del coágulo de fibrina. Un ejemplo típico de un tampón controlado es un tampón hipotónico, un tampón que contiene detergentes en combinación con fibrinolíticos, tales como plasmina y/o agentes proteolíticos, tales como proteinasa K, pronasa y metaloproteinasa. Esta etapa de lisis se puede mejorar aún más mediante la adición de potenciadores de lisis de coágulos, tales como plasminógeno o activador de plasminógeno. En un aspecto preferente, la etapa de lisis puede incluir la utilización además de enzimas de degradación de ácido nucleico.

Para la aplicación práctica de lo que se da a conocer por la presente invención, se da a conocer un dispositivo de recogida de muestras para la separación de moléculas o partículas objetivo de una muestra, que comprende: (i) un código de identificación; (ii) un recipiente para contener dicha muestra que puede ser en forma de un tubo que va a recibir dicha muestra; y (iii) una muestra que contiene fibrinógeno en el recipiente, siendo operable el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas objetivo tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a la trombina dentro de dicho dispositivo.

Por consiguiente, el volumen de dicho recipiente de muestra está entre 0,1 y 100 ml y, preferentemente, entre 0,1 y 10 ml. La concentración de dicho fibrinógeno en la muestra es preferentemente, como mínimo, 0,1 µg/ml. En una realización preferente la concentración de fibrinógeno en la muestra está entre 0,1 y 100 mg/ml y más preferentemente entre 10 mg/ml y 10 µg/ml.

Por consiguiente, dicho dispositivo incluye, además, como aditivo una trombina o una enzima de tipo trombina. A este respecto, la concentración de trombina es de 0,01 a 10 I.U./ml y, preferentemente, está dentro del intervalo de 0,1 a 2 I.U./ml de muestra. En la práctica, la cantidad de la trombina o enzima de tipo trombina debe estar bastante ajustada en correspondencia con la concentración de fibrinógeno en el dispositivo, para obtener la estructura de la red de fibrina y el tamaño del coágulo deseados. A este respecto, la cantidad de trombina es preferentemente menor que 20 I.U de trombina por mg de fibrinógeno, preferentemente está en un intervalo entre 0,01 y 10 I.U de trombina por mg de fibrinógeno, más preferentemente entre 0,1 y 1 I.U de trombina por mg de fibrinógeno.

En el caso de muestras de sangre, tal como sangre completa, por ejemplo, el dispositivo de recogida de muestras según la presente invención incluye además agentes de coagulación que promueven la generación de trombina endógena dentro de la muestra. Estos agentes promotores se pueden seleccionar, por ejemplo de los grupos que comprenden compuestos de silicato pulverulentos o fibrosos tales como caolín, Celite, sílice de diatomeas y fibra de vidrio, polvos finos de compuestos de calcio, tales como carbonato de calcio y sulfato de calcio, sustancias similares a la trombina derivadas de veneno de serpiente, y polifenoles que pueden activar los factores de coagulación de la sangre para promover la coagulación. Además, estos agentes de promoción de la coagulación se pueden, por ejemplo, añadir individualmente o en combinación a la muestra o pueden recubrir el interior de la pared del recipiente de la muestra. La cantidad y el proceso de dichos agentes promotores de trombina endógena deben adaptarse en una forma de controlar el proceso de coagulación y obtener un coágulo de fibrina de tamaño pequeño.

Además, el dispositivo puede incluir aditivos seleccionados del grupo de calcio, agentes quelantes, células de plaquetas activadas o lisado de células de plaquetas activadas y factor XIII. Por consiguiente, el dispositivo de recogida de muestras puede incluir además como aditivos partículas magnéticas. En una realización preferente, dicha partícula magnética dentro del dispositivo está recubierta con un resto de unión a fibrinógeno/fibrina seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas bacterianas de unión a fibrinógeno, activador del plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo. En una realización preferente, dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dichas partículas magnéticas se unen covalentemente.

Además, el dispositivo puede incluir aditivos que comprenden moléculas que tienen: (I) resto de unión a fibrina/fibrinógeno y (II) un resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo. Por consiguiente, dicho resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo se puede seleccionar del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente dichas moléculas o partículas objetivo. Además, dicho resto de captura de sustancias se puede acoplar o combinar con un resto de unión a fibrina/fibrinógeno seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas bacterianas de unión a fibrinógeno, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y

restos derivados de cualquier miembro de este grupo. Dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dicho resto de captura de sustancias se pueden unir covalentemente.

Además, el dispositivo puede incluir aditivos que comprenden una proteína modificada o recombinante de fibrinógeno. Esta proteína recombinante o modificada de fibrinógeno se puede diseñar específicamente para mejorar o inhibir las interacciones de afinidad de dicha proteína recombinante de fibrinógeno con moléculas o partículas objetivo específicas contenidas en la muestra en condiciones de utilización dentro del dispositivo. Dicha proteína recombinante que se utiliza dentro del dispositivo es una proteína de fusión de fibrinógeno con un dominio de resto de captura dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo. La proteína de fusión de fibrinógeno incluye además un sitio de degradación. Esto será particularmente útil para la recuperación de las moléculas o partículas objetivo unidas fuera de la red de fibrina durante una etapa de lisis, tal como se describirá más adelante. El sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática o hidrolítica. El sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática, que se escinde mediante una enzima seleccionada del grupo que comprende plasmina y metaloproteínasa de matriz.

En la práctica, la totalidad de los aditivos descritos anteriormente se pueden añadir a la muestra después de la recogida de muestras o estar ya integrados en el dispositivo. En este último caso, los aditivos se pueden integrar solubilizados en una solución tampón acuoso. Preferentemente, dicho tampón comprende agua, cloruro de calcio, preferentemente a una concentración de 40 mM, y cloruro de sodio, preferentemente a una concentración de 75 mM, y tiene preferentemente un pH de 7,3. En una realización preferente, dichos aditivos se pueden incluir dentro del dispositivo en un formato liofilizado que puede ser solubilizado justo antes de la utilización del dispositivo o después de la introducción de la muestra dentro del dispositivo.

El dispositivo dado a conocer de este modo para recogida de muestras en funcionamiento conduce a la formación de un pequeño coágulo de fibrina en el las partículas o moléculas objetivo son atrapadas. El factor o tasa de concentración estará determinada por el tamaño del coágulo. Por lo tanto, la composición del dispositivo se diseña para que dé como resultado la formación de un coágulo con un tamaño que es, como mínimo, 1/3 del tamaño inicial de la muestra y, preferentemente, el tamaño del coágulo es de, como mínimo, 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, el coágulo se retrae para formar posteriormente un pequeño gránulo con un tamaño que puede alcanzar valores que están entre 1/50 y 1/1000 del volumen de muestra inicial.

El dispositivo de recogida de muestras se puede utilizar para separar y concentrar moléculas o partículas objetivo que se pueden seleccionar de los grupos que comprenden células objetivo, componentes de células, subpoblaciones de células (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácidos nucleicos y similares.

El dispositivo de recogida de muestras se puede utilizar para separar y concentrar moléculas o partículas objetivo de diversas muestras tal como ya se han definido. En general, entre estas se incluyen sangre completa, hemoderivados, componentes sanguíneos, muestras compuestas con aditivos de factores de coagulación. En este sentido, la muestra en la presente memoria descriptiva puede referirse a cualquier tipo de muestra que necesita ser examinada, en especial muestras alimentarias, clínicas, del medio ambiente y experimentales.

En la práctica, el código de identificación dentro del dispositivo puede ser, por ejemplo, un código de barras, el color, el tamaño y la forma del dispositivo. Este código de identificación se puede utilizar como una referencia o indicador de la utilización y aplicación pretendidas del dispositivo. De hecho, los dispositivos se pueden diferenciar en función de su composición, tipo de muestra para la que el dispositivo se utilizará y o el o los objetivos que necesitan ser separados.

La figura 6 muestra un ejemplo de un procesamiento de la muestra utilizando un dispositivo según la presente invención. El dispositivo puede ser un tubo de reacción estándar con un tapón de cierre y un código de identificación. El dispositivo está diseñado para recibir una muestra de fluido que debe ser examinado, a continuación, sobre la existencia de la o las partículas o moléculas objetivo, tal como por ejemplo, una partícula o partículas de patógeno (bacterias, virus, etc.) o una molécula o moléculas objetivo (ADN, ARN o proteína etc.). El dispositivo incluirá además formulaciones de reactivos estables que conducirán a la formación de coágulos de fibrina con el objetivo de la separación. Tras la recogida de la muestra dentro del dispositivo, las moléculas de fibrinógeno en primer lugar reaccionarán con los objetivos en el interior del tubo. En una segunda etapa, el fibrinógeno se transforma en fibrina, lo que conduce a una polimerización y la captura de dichos objetivos en la red de fibrina. La red de fibrina en una tercera etapa se retrae para formar un pequeño gránulo dentro del recipiente de sangre. A medida que se forma el gránulo, la muestra circundante se decanta lo que conduce a la separación de los objetivos atrapados dentro de este pequeño gránulo. En una etapa final, el gránulo se puede lisar para recuperar los objetivos de su trampa de fibrina dentro de un pequeño volumen de un tampón controlado. Mientras la etapa de captura de objetivos/formación de gránulos se lleva a cabo en un tubo cerrado durante, por ejemplo, el transporte de la muestra, la separación de gránulos y la lisis se puede realizar fácilmente utilizando un sistema automatizado de manipulación de líquidos del estado de la técnica. Con este proceso, el dispositivo dado a conocer permitirá recoger la muestra y al mismo tiempo separar y concentrar de manera eficaz partículas o moléculas objetivo de dicha muestra, lo que simplifica

considerablemente las etapas de procesamiento de muestra necesarias y da como resultado además una reducción de los riesgos potenciales de infección y los riesgos de contaminación.

Ejemplo 1. Captura de bacterias *Staphylococcus aureus* (SA) de una muestra de componentes de la sangre: muestra de plasma rico en plaquetas (PRP). Se añaden 100 ufc de bacterias SA a una muestra de 500 µl de PRP con citrato. Mediante la adición de 5 µl de trombina a una concentración de 10 U.I./ml e incubación, se formará un gránulo pequeño (tamaño 10 - 20 µl). La lisis del gránulo formado de este modo utilizando 100 µl de un tampón de lisis (0,01% de saponina, 0,05% de Tween y 0,05% de Triton X) y 5 µl de proteinasa K (10 U.I./ml) conduce a la recuperación en el tampón de lisis de entre el 90 y el 100% de las bacterias SA añadidas inicialmente.

Ejemplo 2. Captura de bacterias *Staphylococcus aureus* (SA) de una muestra de componentes sanguíneos: muestra de plasma pobre en plaquetas (PPP). Se añaden 100 ufc de bacterias SA a una muestra de 500 µl de PPP con citrato y se procesa utilizando el mismo protocolo que en el ejemplo 1. Se obtendrá el mismo rendimiento de recuperación. Sin embargo, el tamaño del coágulo de fibrina es más grande en comparación con el caso de PRP. Esta diferencia se debe a la baja retracción del coágulo de fibrina en el caso de la muestra de PPP. Esta retracción en su lugar se aseguró por las células plaquetarias presentes en la muestra de PRP.

Ejemplo 3. Captura de bacterias de *Staphylococcus aureus* (SA) en una muestra de componentes sanguíneos: muestra de suero. Se añaden 100 ufc de bacterias SA a una muestra de 500 µl de suero con citrato y se procesa utilizando el mismo protocolo que en el ejemplo 1. En este caso no se formará coágulo/gránulo debido a la falta de fibrinógeno en la muestra de suero. Mediante la adición de 1,25 mg de fibrinógeno humano a la muestra de suero, será capaz de formar el coágulo de fibrina y, por lo tanto, separar las bacterias SA de la muestra de suero.

Ejemplo 4. Captura de bacterias gram-positivas y hongos de sangre entera. Recuperación de 4 ml de sangre entera con adición de 100 ufc de microorganismos:

Cepa/especie de microorganismo	Rendimiento
S. pyogenes M57	85%
C. albicans	92%
MRSE	83%
E. faecalis	70%

Ejemplo 5. Captura específica de la bacteria de una muestra compuesta. Se añaden *Staphylococcus aureus* (SA) (1000 CFU/ml) o *Citrobacter Freundi* (18.000 CFU/ml) a 1 ml de una muestras compuesta de PBS con diferentes concentraciones de fibrinógeno en la muestra:

Fibrinógeno	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,08
Volumen de gránulo (tasa de concentración)	200 µl (1/5)	—	—	—	→	< 1 µl (1/1000)
Rendimiento de MRSA MW2 en % (1000 ufc/ml)	100	100	100	100	100	100
<i>Citrobacter freundii</i> en % (1800 ufc/ml)	48	44	34,7	7,6	0	0

Al reducir la concentración de fibrinógeno, se va a reducir el tamaño del gránulo (es decir, la tasa de concentración) y además el tamaño de la porosidad de la red de fibrina. En estas condiciones, la velocidad de captura SA sigue siendo muy eficaz, mientras que la tasa de captura de C. Freundi se reducirá considerablemente. Esta diferencia de la eficiencia de captura es debido al hecho de que la bacteria SA tiene una fuerte afinidad nativa hacia el fibrinógeno (a través de su proteína de superficie ClfA) mientras que la C. Freundi carece de tal afinidad.

Ejemplo 6. Captura específica de bacterias de una muestra compuesta. Las mismas condiciones que para el ejemplo 5 utilizando C. Freundi dentro de 1 ml de PBS compuesto como una muestra, con la modificación de que los presentes inventores añadieron además a la muestra un anticuerpo dirigido contra la proteína de la superficie lipídica A de gram-negativas marcado con una proteína ClfA estafilocócica. En estas condiciones y tal como se muestra en la figura 3 (b), el anticuerpo se unirá C. Freundi permitiendo su unión eficaz al fibrinógeno y después su separación eficiente (rendimiento casi del 100%) dentro de un gránulo de fibrina.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para el procesamiento de una muestra líquida que comprende fibrinógeno, para la separación y concentración de moléculas o partículas objetivo de la muestra, que comprende:
- 10 a. Atrapar dichas moléculas o partículas objetivo en una red de fibrina sometiendo la muestra a trombina o enzimas de tipo trombina para convertir, como mínimo, parcialmente el fibrinógeno contenido en la dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina
- b. Retraer dicha red de fibrina para formar un coágulo de fibrina
- c. Separar de dicho coágulo de fibrina del medio de muestra circundante.
- 15 2. Método, según la reivindicación 1, en el que la concentración del fibrinógeno en dicha muestra es, como mínimo, 1 µg/ml.
- 20 3. Método, según la reivindicación 1, en el que la concentración de dicha trombina o enzima de tipo trombina está entre 0,01 y 10 UI por mililitro de muestra.
4. Método, según la reivindicación 1, en el que el coágulo formado en la etapa (b) tiene un tamaño menor de 1/10 del volumen de muestra inicial.
- 25 5. Método, según la reivindicación 1, que incluye además la etapa de lisar dicho coágulo de fibrina para recuperar dichas moléculas o partículas objetivo.
6. Método, según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de lisado utiliza componentes seleccionados entre el grupo que comprende enzimas de citólisis, proteasas y enzimas de degradación de ácidos nucleicos.
- 30 7. Método, según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de lisado incluye la utilización de detergentes.
8. Método, según la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra de sangre seleccionada entre el grupo que comprende sangre completa, plasma rico en plaquetas, plasma pobre en plaquetas y suero.
- 35 9. Método según la reivindicación 1, que comprende además la etapa de
- Añadir fibrinógeno a dicha muestra, antes de la etapa (a).
- 40 10. Método, según la reivindicación 1, en el que la captura en la etapa a) se obtiene atrapando por tamaño dichas moléculas o partículas objetivo dentro de la red de fibrina.
11. Método, según la reivindicación 1, en el que la captura en la etapa a) se obtiene atrapando por afinidad dichas moléculas o partículas objetivo en la red de fibrina.
- 45 12. Método, según la reivindicación 11, en el que la captura química se realiza por una afinidad nativa de dichas moléculas o partículas objetivo a fibrinógeno o fibrina.
13. Método, según la reivindicación 11, en el que el atrapamiento químico comprende una molécula compuesta de:
- 50 (i) un resto de unión a fibrina/fibrinógeno y (ii) un resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo.
14. Método, según la reivindicación 11, en el que el fibrinógeno es una proteína de fusión de fibrinógeno con un resto de dominio de captura dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo.
- 55 15. Método, según la reivindicación 13, en el que un resto de unión a fibrina/fibrinógeno se selecciona entre el grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas bacterianas de unión a fibrinógeno, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo.
- 60 16. Método, según la reivindicación 13, en el que un resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas objetivo se selecciona del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente dichas moléculas o partículas objetivo.

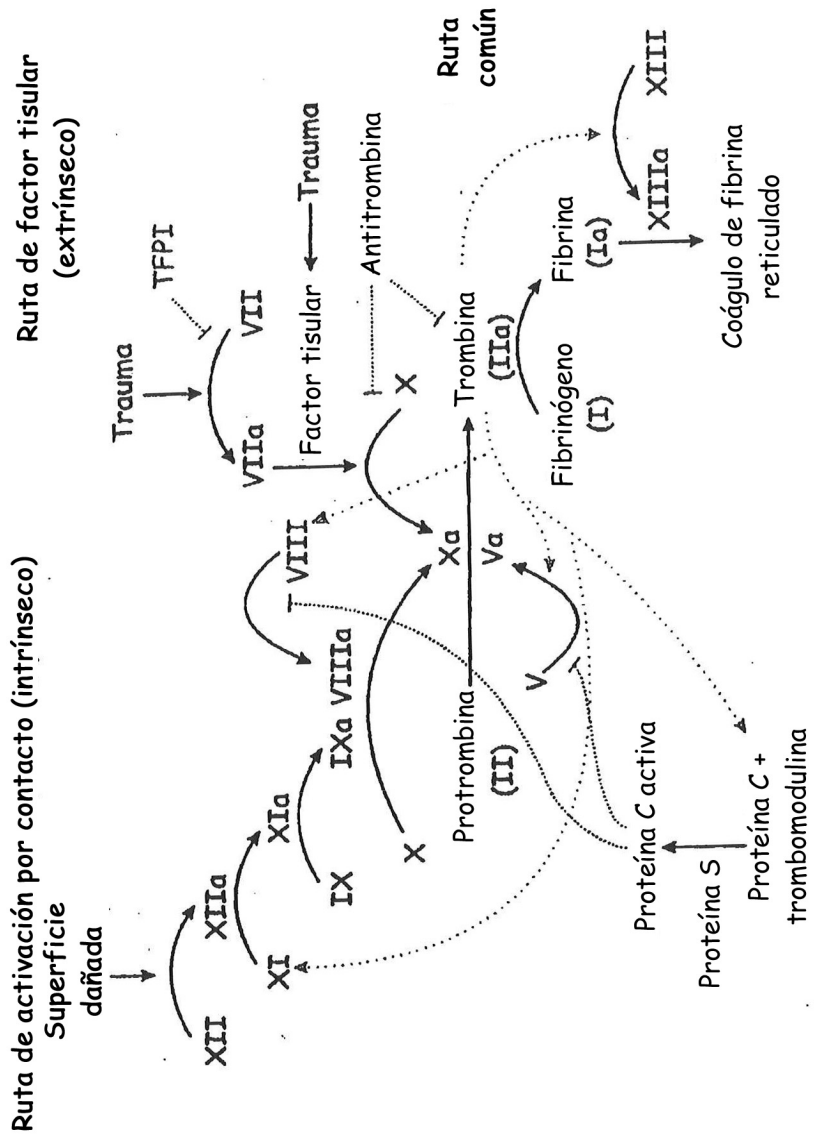


Figura 1

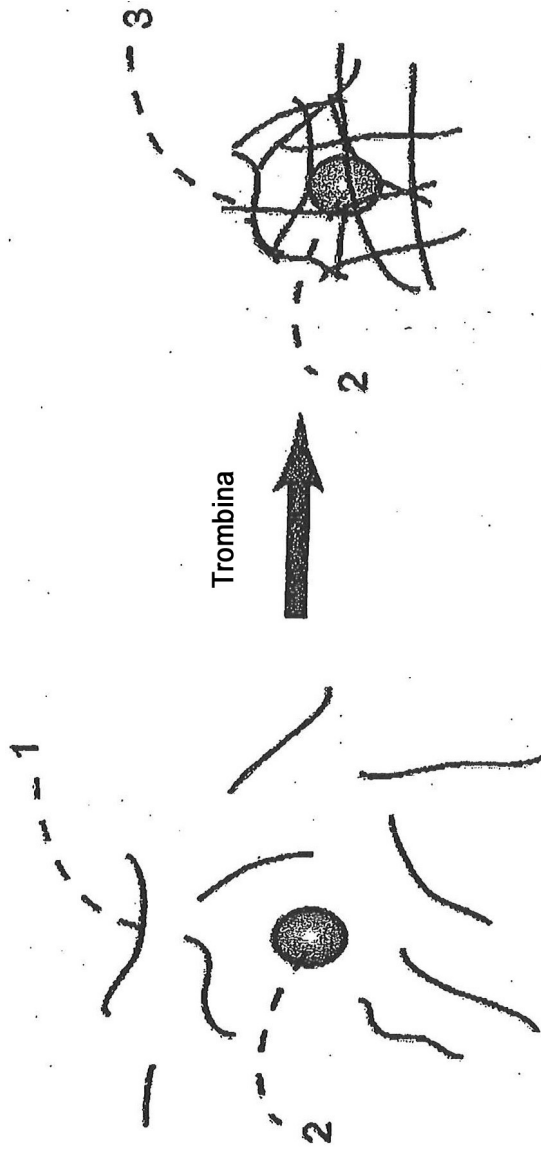


Figura 2

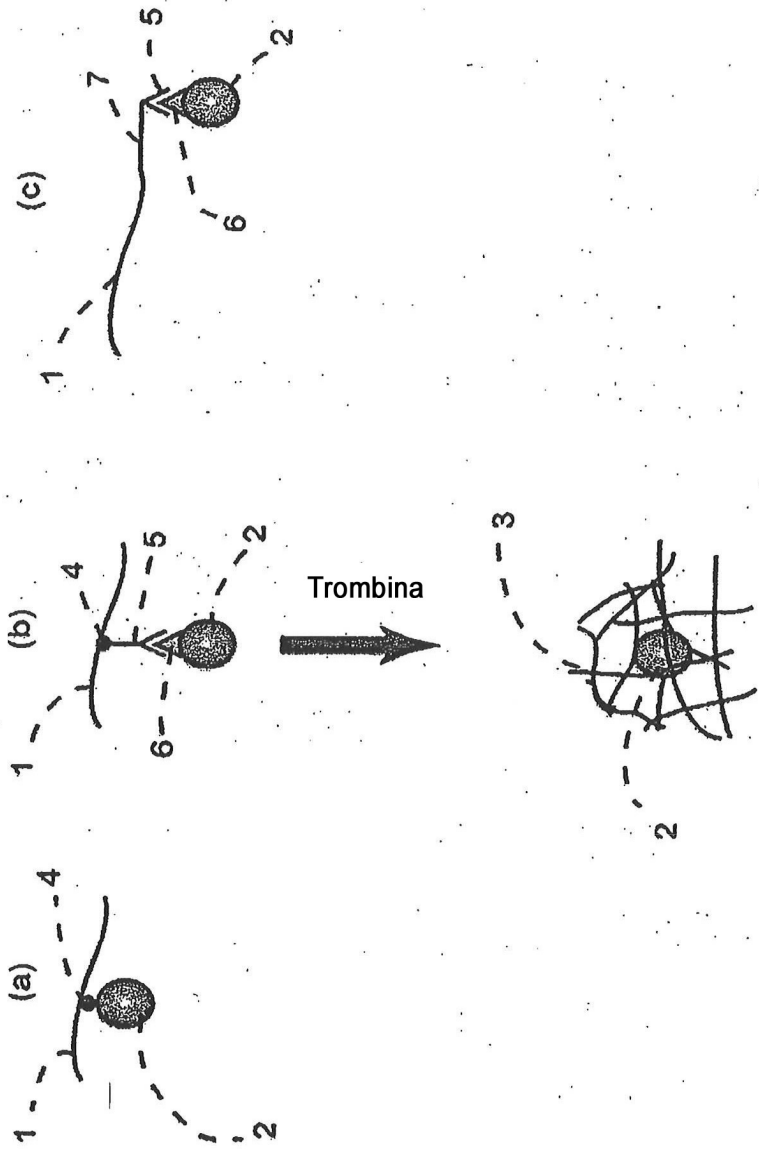


Figura 3

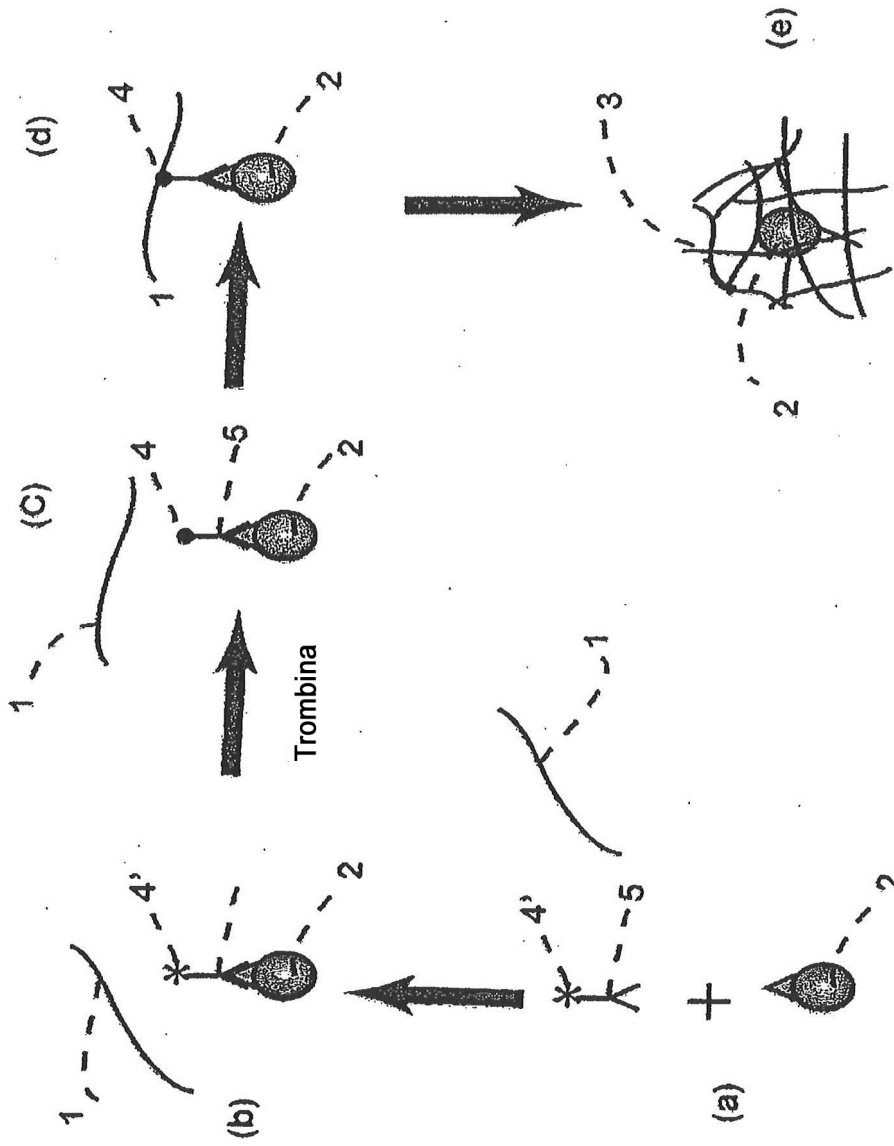


Figura 4

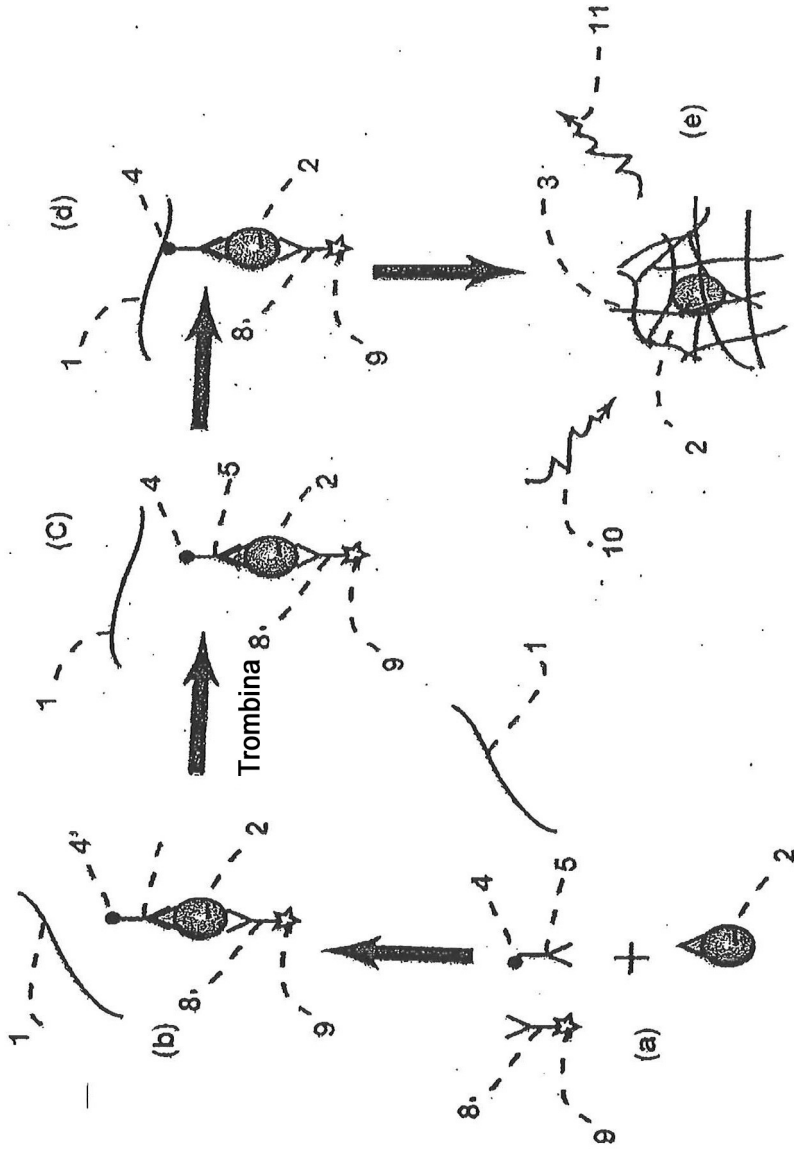


Figura 5

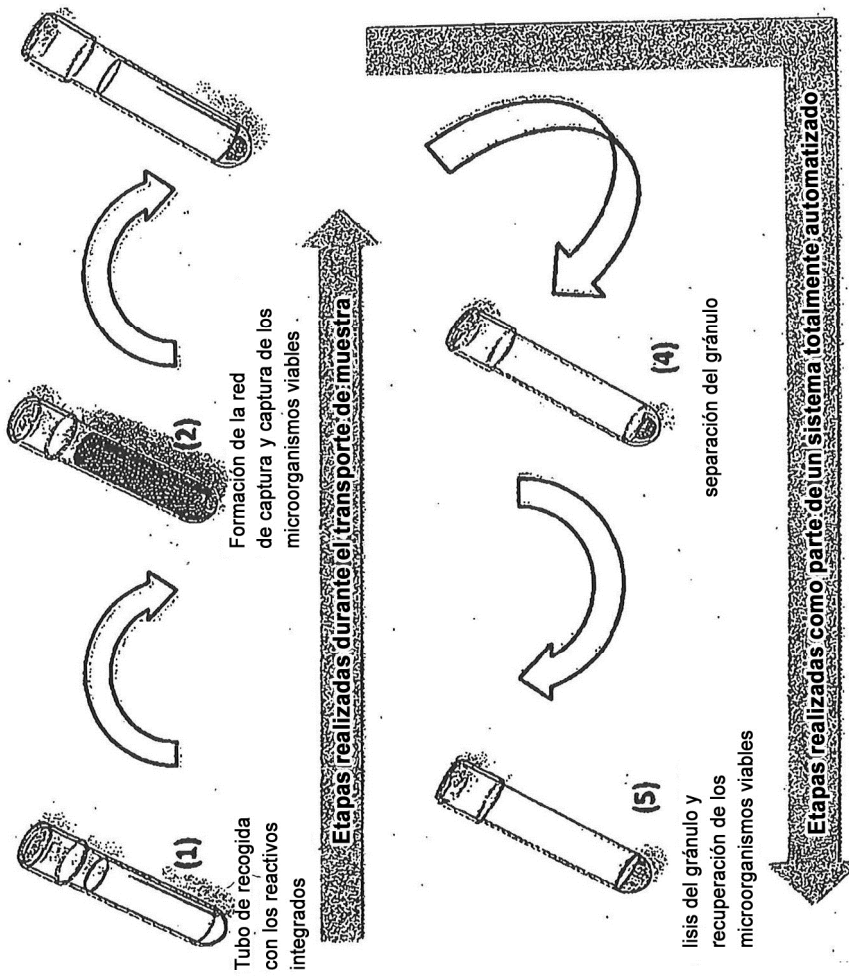


Figura 6