

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 963**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/96** (2006.01)

**C08L 51/06** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.02.2012** **PCT/EP2012/053163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012** **WO12113906**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012** **E 12705857 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016** **EP 2678692**

54 Título: **Soporte sólido y método para aumentar la recuperación de material biológico del mismo**

30 Prioridad:

**25.02.2011 GB 201103258**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.12.2016**

73 Titular/es:

**GE HEALTHCARE UK LIMITED (100.0%)**  
**Amersham Place**  
**Little Chalfont, Buckinghamshire HP7 9NA, GB**

72 Inventor/es:

**HORTON, JEFFREY, KENNETH;**  
**TATNELL, PETER, JAMES y**  
**STUBBS, SIMON, LAURENCE, JOHN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 592 963 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

Soporte sólido y método para aumentar la recuperación de material biológico del mismo

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a soportes sólidos, y se ocupa en particular de los soportes sólidos que se pueden usar en el almacenamiento, la recuperación y el procesamiento posterior de materiales biológicos, tales como fármacos biofarmacéuticos.

**Antecedentes de la invención**

10 El uso de soportes sólidos, tales como papel de filtro, para la recogida y el análisis de sangre humana se remonta a comienzos de la década de 1960, cuando el Dr. Robert Guthrie usó muestras de manchas de sangre seca (DBS) para medir la fenilalanina en recién nacidos para la detección de la fenilcetonuria (Mei, J., et al., 2001; Journal of Nutrition, 131:1631S-1636S). Esta aplicación nueva para la recogida de sangre condujo al cribado de la población de recién nacidos para la detección de enfermedades metabólicas hereditarias tratables. La DBS se ha usado a lo largo de 40 años para cribar en busca de una gran variedad de trastornos metabólicos neonatales.

15 Las muestras de DBS se recogen transfiriendo sangre completa a un soporte sólido, tal como una membrana, fibra de vidrio o papel, de sangre venosa o directamente de un pinchazo en un dedo o talón, lo que hace que este método sea especialmente adecuado para el envío de muestras desde clínicas periféricas a laboratorios centrales. Además, las DBS envasadas en bolsas de plástico con cierre hermético con un desecante se pueden almacenar y enviar a temperatura ambiente, por lo que se evita la necesidad del i) almacenamiento con cadena de frío y ii) transporte especializado rápido. Las DBS recogidas aplicando una gota de sangre sobre un material absorbente, tal como  
20 papel Whatman 903 Neonatal STD, no están sometidas al Reglamento de Materiales Peligrosos de la IATA (Apéndice II, marzo de 2005).

Los soportes sólidos de papel adicionales que se usan para la recogida, el transporte y el almacenamiento de DBS y otros fluidos corporales para fines de cribado neonatal y de recién nacidos incluyen:

1. Ahlstrom 226
- 25 2. Munktel TFN (marcado CE)
3. Toyo Roshi grado 545 Advantec Toyo, Tokio (véase Elvers L et al 2007; J. Inherit Medtab Dis 30, 4, 609).

30 Todos estos papeles, como el papel Whatman 903 Neonatal STD, consisten en fibras de algodón. Los papeles Whatman 903 Neonatal STD y Ahlstrom 226 están clasificados como dispositivos médicos de clase II. Los soportes sólidos de papel que tienen la posibilidad de transformarse en dispositivos para fines de cribado neonatal y de recién nacidos incluyen los fabricados por Macherey Nagel (p.ej. MN818), Reeve Angel (p.ej. Double Ring) y Hahnemuhle Grado 2292.

35 Los costes consumibles para DBS son menores de 1 dólar de EE.UU. por ensayo, y los costes de transporte se reducen notablemente en comparación con el plasma, que requiere un formato líquido y condiciones de transporte especializado (Johannessen, A., et al., 2009; J Antimicrobial Chemotherapy, 64, 1126-1129). Aunque los costes de ensayo reales permanecen inalterados, y la extracción de los analitos de DBS implica cierto tiempo extra de manipulación en un laboratorio centralizado, el uso de DBS y de manera específica los soportes sólidos de papel se usan cada vez más en el almacenamiento y/o el análisis de materiales biológicos tales como ácidos nucleicos, proteínas etc. Además, también se ha utilizado DBS durante el proceso de descubrimiento de fármacos, en el que se han introducido compuestos farmacológicos candidatos de peso molecular bajo en animales de ensayo y se han  
40 monitorizado las concentraciones en la sangre.

45 En años recientes, las proteínas recombinantes obtenidas mediante biotecnología, los péptidos y los fármacos basados en anticuerpos, así como los oligonucleótidos inversos y el ADN para terapia génica se han transformado en agentes terapéuticos convencionales, y actualmente constituyen una porción sustancial de los compuestos en desarrollo clínico. Estos agentes se denominan habitualmente "fármacos biotecnológicos" o "fármacos biofarmacéuticos", para diferenciarlos de los compuestos farmacológicos de peso molecular bajo.

50 El análisis metabólico y farmacocinético de fármacos (DMPK) de los fármacos biotecnológicos y de los compuestos farmacológicos de peso molecular bajo es importante, ya que el análisis DMPK es vital para el descubrimiento de fármacos ya que permite comprender cómo los candidatos farmacológicos pueden ser absorbidos, metabolizados y excretados por el cuerpo. Los análisis se llevan a cabo de manera rutinaria en la etapa de descubrimiento del fármaco, e implican administrar a los animales el compuesto de interés, y medir la concentración del fármaco (o metabolito) en los fluidos biológicos en función del tiempo. Esto genera una información valiosa, tal como el aclaramiento del fármaco, la biodisponibilidad, etc., pero exige una cantidad significativa de tiempo y recursos (Beaudette, P., et al., 2004; J. of Chromatography B 809, 153-158).

Los problemas principales asociados al análisis DMPK, llevado a cabo en general en programas de cribado de

fármacos, son la carencia aparente de un medio de almacenamiento adecuado para mantener la estabilidad e integridad en las muestras de sangre antes del análisis. Las metodologías actuales usan plasma o sangre completa recogida en los momentos designados de los animales a los que se administraron dosis. Sin embargo, este método tiene varias desventajas, que incluyen la implicación de procedimientos que consumen mucho tiempo, que crean un obstáculo en el proceso de análisis. Además, el sangrado múltiple de animales individuales para experimentos a lo largo del tiempo es restrictivo. Esto impone una limitación sobre el rendimiento e incrementa el uso de animales, lo que da como resultado que se puedan adelantar menos compuestos principales.

El pequeño volumen de sangre necesario para DBS permite la toma de muestras de sangre en serie de un animal en vez de sangrados compuestos de varios animales, lo que mejora significativamente la calidad de los datos y estudios DMPK y toxicocinéticos. Los beneficios éticos del volumen reducido de sangre (en general 15-20 µl por mancha) necesario para la DBS con respecto a las "3 Rs" (reducción, refinamiento y reemplazo) son evidentes en el desarrollo preclínico de fármacos. El número de animales de ensayo se puede reducir significativamente. Además, es posible la toma de muestras de sangre no terminal en estudios de toxicidad juvenil, que son cada vez más demandados por las autoridades como parte de la evaluación de la seguridad de los fármacos para uso pediátrico. Otra ventaja para los estudios de toxicología regulatoria/animal es el incremento de la calidad de los datos.

Por lo tanto, debido a la necesidad creciente del análisis rápido de grandes cantidades de muestras de sangre en la investigación farmacocinética, la DBS se ha convertido en una opción atractiva. Para que el papel actúe como soporte sólido para DBS, es deseable que el papel combine propiedades mecánicas satisfactorias con la capacidad de mantener el material biológico de interés en una condición estable, de tal manera que se pueda someter a un procesamiento y/o análisis adicional tras el almacenamiento. Los ejemplos de tales papeles usados para los análisis DMPK son los conocidos como los papeles de recogida de muestras 903 Neonatal y también los papeles conocidos como FTA y FTA Elute descritos, por ejemplo, en los números de patentes de EE.UU. 5.75.126 y 5.939.259.

Los soportes sólidos de papel adicionales usados para los análisis DMPK incluyen los siguientes:

1. Papel Ahlstrom grado 226:

Use of Dried Plasma Spots in the Determination of Pharmacokinetics in Clinical Studies: Validation of a Quantitative Bioanalytical Method.

Barfield, M., et al., (2011), *Anal., Chem.*, 83, 118-124.

2. Papel de filtro estandarizado:

Drug monitoring of lamotrigine and oxcarbazepine combination during pregnancy.

Wegner, I., et al., (2010), *Epilepsia*, 51, 2500-2502.

3. Whatman 903, sustratos FTA (DMPK-A) y FTA Elute (DMPK-B):

Effect of storage conditions on the weight and appearance of dried blood spot samples on various cellulose-based substrates.

Denniff, P., et al., (2010), *Bioanalysis*, 2, 11, 1817-22.

4. Whatman DMPK-A, -B, -C:

Application of DBS for quantitative assessment of the peptide Exendin-4; comparison of plasma and DBS method by UHPLC-MS/MS.

Kehler, R., et al., (2010), *Bioanalysis*, 2, 8, 1461-1468.

5. Papel Ahlstrom grado 237:

Application of a Liquid Extraction Based Sealing Surface Sampling Probe for Mass Spectrometric Analysis of DBS & Mouse Whole-Body Thin Tissue Sections.

Van Berkel, G., et al., (2009), *Anal., Chem.*, 2009, 81, 21, 9146-9152.

6. Tarjetas de manchas de sangre Whatman FTA:

Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method.

Spooner, N., et al., (2009), *Anal Chem.* 81, 1557-63.

7. Microtarjeta Whatman FTA Elute:

Study of dried blood spots technique for the determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human whole blood by LC-MS/MS.

Liang, X., et al., (2009), J. Chrom B, Anal. Tech Biomed & Life Sci, 877, 799-806.

8. Tarjetas de papel de filtro Whatman:

- 5 A liquid chromatography/Tandem mass spectrometry method for determination of 25-hydroxy vitamin D2 and 25-hydroxy vitamin D3 in dried blood spots: a potential adjunct to diabetes and cardiometabolic risk screening.

Newman, M., et al., (2009), J Diabetes Sci and Tech. 3, 156-162.

9. Papel de filtro Toyo Roshi N° 545 (Advantec Toyo, Tokio):

- 10 Simultaneous determination of 17 $\alpha$ -hydroxypregnenolone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in DBS from low birth weight infants using LC-MS/MS.

Higashi, T., et al., (2008), J. Pharm and Biomedical Analysis, 48, 1, 177-182.

10. Papel de recogida de muestras Whatman BFC 180:

Determination of morphine & 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots.

Garcia-Boy, R., et al., (2008), Therapeutic Drug Monitoring, 30, 6, 733-739.

- 15 11. Papel de filtro Whatman (n° de catálogo 10535097):

Quantification of cationic anti-malaria agent methylene blue in different human biological matrices using cation exchange chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

Burhenne, J., et al., (2008), J. Chrom B, Anal. Tech Biomed & Life Sci, 863, 273-282.

12. Whatman 3MM:

- 20 Use of filter paper for sample collection and transport in steroid pharmacology.

Howe, C., et al., (1997), Clin Chem. 43, 1408-15.

13. Whatman FTA, FTA Elute, DMPK-A, B, C, Ahlstrom 226 –

Determination of Tamiflu® and active metabolite in dried blood spots using the SCAPTM DBS system and column-switching LC-MS/MS.

- 25 Heinig, K., et al., F. Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza.

(véase: <http://www.research.co.uk/pages/products/applications/1725/Determination%20of%20Tamiflu%C2%AE%20and%20active%20metabolite%20in%20dried%20blood%20spots%20using%20the%20SCAPTM%20DBS%20system.pdf>)

- 30 Los soportes sólidos de papel que tienen la posibilidad de transformarse en dispositivos para fines de DMPK incluyen Munktell grado TFN, Toyo Roshi grado 545, Macherey Nagel (p.ej. MN818), Reeve Angel (p.ej. Double Ring) y Hahnemuhle Grado 2292).

Para el procesamiento y análisis posteriores eficaces, el analito de interés (tal como proteínas endógenas o fármacos biotecnológicos) se debe extraer fácilmente del soporte sólido de papel mediante el uso de técnicas relativamente simples que son adaptables a un formato de alto rendimiento.

- 35 Se ha descrito la combinación de DBS y la detección de una proteína endógena en la bibliografía científica. Por ejemplo, el biomarcador de fibrosis quística (FQ) tripsina inmunorreactiva (TI), el primer uso informado de TI endógena de DBS para el cribado de FQ fue publicado por Ryley et al., en 1981 (J. Clin. Pathol. 34, 906-910). Desde entonces, se ha usado TI de manera rutinaria como indicador de FQ mediante el uso de DBS de neonatos. Varias organizaciones comerciales suministran kits de inmunoensayos aprobados por la FDA para esta aplicación. Muchos usan simplemente una aproximación "en papel", en la que una perforación de papel que contiene la DBS se aplica directamente en el inmunoensayo y el analito de interés se extrae in situ. Recientemente (Lindau-Shepard y Pass, 2010, Clinical Chem. 56, 445-450) demostraron que la TI existe en dos isoformas diferentes. Estos autores informaron del desarrollo de un inmunoensayo basado en una matriz en suspensión (o en papel) para el diagnóstico de FQ mediante el uso de las dos isoformas diferentes de TI. Todos estos estudios basados en proteínas se llevaron a cabo con tarjetas de Guthrie sin revestir (papel Whatman 903).
- 40
- 45

Desde el comienzo del cribado anónimo de la inmunodeficiencia humana (VIH), se han llevado a cabo más de 1,2

millones de ensayos de DBS para la detección serológica de los anticuerpos endógenos anti-VIH en la sangre de mujeres gestantes.

Estos estudios han demostrado que i) las preocupaciones sobre el almacenamiento a largo plazo de la sangre y de cualquier proteína asociada de interés han demostrado ser infundadas y ii) la presencia de hemo en la DBS no interfiere con el rendimiento del ensayo.

Por lo tanto, es deseable producir soportes sólidos que proporcionen un medio de almacenamiento simple y estable para los materiales biológicos, que incluyen i) restos endógenos y ii) fármacos biofarmacéuticos o biotecnológicos, que proporcionen un rendimiento o recuperación elevada del material biológico en el procesamiento posterior. La presente invención aborda estas necesidades y proporciona métodos que aumentan los niveles de recuperación de materiales biológicos tales como fármacos biofarmacéuticos de muestras biológicas almacenadas en forma de DBS en soportes sólidos, en particular soportes sólidos de papel.

#### Definiciones

La expresión "material biológico", tal como se usa en la presente memoria, significará cualquier "biomolécula", "biomolécula obtenida de manera sintética", "fármaco biofarmacéutico" o "componente celular", como se define más adelante:

i) Una biomolécula es cualquier molécula orgánica que es producida por un organismo vivo, que incluye moléculas poliméricas grandes tales como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos, así como moléculas pequeñas de peso molecular bajo tales como metabolitos primarios, metabolitos secundarios, y productos naturales.

ii) Una biomolécula obtenida de manera sintética es una "biomolécula" como se definió en i) anteriormente que se genera mediante el uso de tecnologías de ADN recombinante o se sintetiza químicamente mediante otros métodos *in vitro* sin organismos vivos.

iii) Un fármaco biofarmacéutico (o "fármaco biotecnológico") es una proteína recombinante obtenida de manera biotecnológica, péptido o fármaco basado en anticuerpos, o un oligonucleótido inverso, ácido peptidonucleico (APN) o ácido desoxirribonucleico (ADN) para terapia génica.

iv) Un componente celular es una sustancia o sustancias únicas sumamente organizadas de las cuales están compuestas las células, y por tanto los organismos vivos. Los ejemplos incluyen membranas, orgánulos, proteínas y ácidos nucleicos. Aunque la mayoría de los componentes celulares están localizados dentro de la propia célula, algunos pueden existir en las áreas extracelulares de un organismo.

#### Sumario de la invención

Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un soporte sólido que tiene al menos una superficie revestida con un producto químico que aumenta la recuperación de un material biológico de dicha superficie, en el que el producto químico se selecciona del grupo que consiste en un polímero de vinilo, polímero sintético no iónico y proteína.

En un aspecto, el soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en papel, microfibra de vidrio y una membrana.

En otro aspecto, el papel es un papel de celulosa. Preferiblemente, el papel es una tarjeta 903 Neonatal STD o DMPK-C.

En un aspecto adicional, la membrana se selecciona del grupo que consiste en poliéster, poliéter sulfona (PES), poliamida (Nailon), polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), policarbonato, nitrato de celulosa, acetato de celulosa y óxido de aluminio.

En otro aspecto, el polímero de vinilo es polivinil pirrolidona (PVP).

En un aspecto adicional, el polímero sintético no iónico es poli-2-etil-2-oxazolina (PEOX).

En un aspecto, la proteína se selecciona del grupo que consiste en albúmina y caseína.

Según un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un método de recuperación de un material biológico de un soporte sólido que comprende las etapas de

- i) poner en contacto una superficie de un soporte sólido como se describió anteriormente en la presente memoria con una muestra que contiene un material biológico;
- ii) secar la muestra sobre la superficie del soporte;
- iii) almacenar el soporte; y

iv) extraer el material biológico de la superficie.

En un aspecto, la etapa iii) comprende almacenar el soporte de papel a una temperatura en el intervalo de 15 a 40 °C. Preferiblemente, la temperatura está en el intervalo de 20 a 30 °C. En otro aspecto, el soporte de papel se almacena a una temperatura inferior dependiendo de la estabilidad térmica del material biológico.

5 La naturaleza de la muestra dependerá de la fuente del material biológico. Por ejemplo, la fuente puede ser de una variedad de organismos biológicos que incluyen, pero sin limitación, virus, bacterias, vegetales y animales. Preferiblemente, la fuente será un mamífero o un sujeto humano. Para fuentes mamíferas y humanas, la muestra se puede seleccionar del grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma, saliva y orina.

10 En otro aspecto, el material biológico se selecciona del grupo que consiste en una biomolécula, biomolécula obtenida de manera sintética, componente celular y fármaco biofarmacéutico.

En un aspecto adicional, el material biológico es un fármaco biofarmacéutico.

En un aspecto, el soporte es un papel. Preferiblemente, el papel es un papel de celulosa. Más preferiblemente, el papel es una tarjeta 903 Neonatal STD o DMPK-C.

15 Según un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para fabricar un soporte sólido como se describió anteriormente en la presente memoria, que comprende revestir al menos una superficie de un soporte sólido con una disolución de un producto químico que aumenta la recuperación de un material biológico de dicha superficie, en el que el producto químico se selecciona del grupo que consiste en un polímero de vinilo, polímero sintético no iónico y proteína.

20 En un aspecto, el producto químico se selecciona del grupo que consiste en polivinil pirrolidona (PVP), poli-2-etil-2-oxazolina (PEOX), albúmina y caseína.

En otro aspecto, el soporte sólido es un papel. Preferiblemente, el papel es un papel de celulosa. Más preferiblemente, el papel de celulosa es una tarjeta 903 Neonatal STD o DMPK-C.

25 Según un cuarto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un soporte sólido como se describió anteriormente en la presente memoria para aumentar la recuperación de un material biológico de una superficie del mismo.

En un aspecto, el material biológico es un fármaco biofarmacéutico.

### Breve descripción de las figuras

La Figura 1 presenta la recuperación de IL-2 añadida de manera exógena de manchas de sangre seca aplicada a diversas matrices de papel.

30 La Figura 2 presenta la recuperación de IL-2 añadida de manera exógena de manchas de sangre seca aplicada a papeles 903 Neonatal STD revestidos con diversos productos químicos.

La Figura 3 presenta la recuperación de IL-2 añadida de manera exógena de manchas de sangre seca aplicada a papeles DMPK-C revestidos con diversos productos químicos.

### Descripción detallada de la invención

35 La IL-2 recombinante ± vehículo (R & D Systems; Cat. 202-IL-CF-10µg; lote AE4309112, y Cat. 202-IL-10µg; lote AE4309081, respectivamente) se disolvió en PBS de Dulbecco sin calcio ni magnesio (PAA; Cat. H15-002, lote H00208-0673), sangre humana, de conejo o de caballo anti-coagulada con EDTA (TCS Biosciences) a 50 pg o 100 pg/µl.

40 Se aplicaron alícuotas (1 µl que contenía 0, 50 o 100 pg de IL-2) a los siguientes papeles de filtro de GE Healthcare; tarjeta 903 Neonatal STD, Cat. 10538069, lote 6833909 WO82; tarjeta DMPK-A, Cat. WB129241, lote FT6847509; tarjeta DMPK-B, Cat. WB129242, Lote FE6847609 y tarjeta DMPK-C, Cat. WB129243, Lote FE6847009. Las muestras se dejaron secar durante la noche a la temperatura y humedad ambientales.

45 Se extrajeron perforaciones (3 mm de diámetro) de cada tipo de papel mediante el uso del perforador Harris Uni-core del tamaño adecuado (Sigma, Cat. Z708860-25ea, lote 3110). Se colocaron las perforaciones individuales en pocillos individuales de la microplaca de IL-2 obtenida del Quantikine ELISA de IL-2 humana (R & D Systems, Cat. D0250, lote 273275). Estas placas están revestidas con un anticuerpo monoclonal de ratón hacia IL-2. La proteína IL-2 se eluyó de la perforación de papel mediante el uso del tampón de ensayo (100 µl) suministrado con el kit Quantikine. Todas las etapas posteriores se llevaron a cabo según las instrucciones suministradas con el kit Quantikine mediante el uso de un método "en papel" (las perforaciones de papel se colocan directamente en el

50 tampón de ensayo y el analito se eluye directamente in situ). Tras la finalización del ensayo, se monitorizó la densidad óptica de la microplaca a 450 nm mediante el uso de un aparato Multiskan Ascent de Thermo Electron

Corporation. Se determinó la recuperación de IL-2 comparando los valores con una curva patrón de concentraciones conocidas de IL-2. Se preparó una curva patrón nueva de IL-2 para cada experimento individual.

Los experimentos adicionales implicaron la adición de sangre con IL-2 añadida a las tarjetas 903 Neonatal STD y DMPK-C después de haber sumergido completamente las tarjetas en varias disoluciones de productos químicos (como se describe a continuación).

#### Productos químicos usados

Se proporciona una lista de los productos químicos y sus fuentes a continuación.

Poli-etil-enemina, 50% en agua (Fluka; Cat. P3143, lote 29k1492).

Poli-vinil-pirrolidona, 1% en agua (Sigma; Cat. PVP40-100 mg, lote 11pk0097).

Inulina, 1% en agua (Sigma; Cat. I2255-100 g, lote 079F7110).

Poli-2-etil-2-oxazolina, 1 % en agua (Aldrich, Cat. 372846, lote 30498PJ).

Albúmina, 1% en agua (Sigma, Cat. A2153-10 g, lote 049k1586).

Caseína de leche de vaca, 1% en agua (Sigma, Cat. C5890-500 g, lote 089k0179).

Poli-etilen glicol 1000, 1% en agua (Biochemika, Cat. 81189, lote 1198969).

Poli-etilen glicol 200, 1% en agua (Fluka, Cat. 81150, lote 1384550).

#### Resultados Experimentales

Cuando se disolvió IL-2 en sangre anti-coagulada con EDTA, las tarjetas 903 y DMPK-C facilitaron la recuperación de un 45 - 55% de la citocina, mientras se recuperó solamente un 2 -3 % de las tarjetas DMPK-A y B (véase la Tabla 1 y la Figura 1). Las tarjetas 903 y DMPK-C son los papeles base básicos, y no se han sumergido o revestido con ningún producto químico, mientras las tarjetas DMPK-A y B están revestidas con una mezcla patentada de productos químicos que facilitan la desnaturalización e inactivación de las proteínas, microorganismos y células, respectivamente. Estas tarjetas se han diseñado para facilitar el transporte y el almacenamiento prolongado de ácidos nucleicos. Por lo tanto, los bajos niveles de recuperación de IL-2 observados al usar las tarjetas DMPK-A y B pueden ser en realidad un reflejo de la presencia de estos reactivos desnaturalizantes y del sistema usado de detección de anticuerpos basado en ELISA. El sistema de detección mediante ELISA requiere que la IL-2 eluida exhiba una estructura nativa intacta.

| Tipo de papel        | Recuperación de IL-2 (%) | Valor de p |
|----------------------|--------------------------|------------|
| 903; sin vehículo    | 46,9 ± 13,3              | > 0,05     |
| 903; con vehículo    | 50,7 ± 5,8               |            |
| DMPK A; sin vehículo | 2,0 ± 0,0                | > 0,05     |
| DMPK A; con vehículo | 2,0 ± 0,0                |            |
| DMPK B; sin vehículo | 2,0 ± 0,0                | > 0,05     |
| DMPK B; con vehículo | 2,0 ± 0,0                |            |
| DMPK C; sin vehículo | 53,9 ± 4,8               | > 0,05     |
| DMPK C; con vehículo | 45,2 ± 5,4               |            |

Tabla 1 - Recuperación de IL-2 añadida de manera exógena de manchas de sangre seca aplicada a diversos tipos de papel. El valor de p compara ± vehículo para cada tipo de papel. La presencia del vehículo no tuvo un efecto significativo sobre la recuperación de IL-2 (valor de p > 0,05).

No se observó recuperación de IL-2 cuando se disolvió la citocina en PBS, independientemente del tipo de papel usado (datos no mostrados). Los niveles de recuperación de IL-2 observados en ausencia de IL-2 añadida fueron básicamente equivalentes a los niveles de fondo, lo que indica que la sangre anti-coagulada con EDTA contiene cantidades insignificantes de IL-2 endógena (datos no mostrados).

- 5 Se usaron varios productos químicos para sumergir completamente las tarjetas 903 Neonatal STD y DMPK-C, algunos de los cuales parecieron facilitar la recuperación de niveles elevados de IL-2 en comparación con los papeles sin sumergir (valor de  $p < 0,05$ ). Para las dos tarjetas 903 Neonatal STD y DMPK-C (Tablas 2 y 3; Figuras 2 y 3), los productos químicos tales como poli-vinil-pirrolidona, poli-2-etil-2-oxazolina, albúmina y caseína facilitaron un incremento significativo de los niveles de recuperación de IL-2 (media  $> 55\%$  en comparación con el  $\sim 45\%$  observado para el papel sin sumergir correspondiente).

| Producto químico                   | Recuperación de IL-2 (%) | Valor de p |
|------------------------------------|--------------------------|------------|
|                                    |                          |            |
| Sin sumergir                       | $44,9 \pm 6,5$           | n/a        |
| Poli-etil-enemina (PEI)            | $41,8 \pm 6,0$           | $> 0,05$   |
| Poli-vinil-pirrolidona (PVP)       | $62,0 \pm 10,7$          | $< 0,05$   |
| Inulina                            | $50,4 \pm 7,6$           | $> 0,05$   |
| Poli-2-etil-2-oxazolina (PeOX)     | $66,1 \pm 12,6$          | $< 0,05$   |
| Albúmina                           | $73,8 \pm 13,6$          | $< 0,05$   |
| Caseína                            | $55,0 \pm 7,8$           | $< 0,05$   |
| Poli-etilen glicol 1000 (PEG 1000) | $42,5 \pm 9,1$           | $> 0,05$   |
| Poli-etilen glicol 200 (PEG 200)   | $43,3 \pm 11,0$          | $> 0,05$   |

- 10 Tabla 2 - Recuperación de IL-2 añadida de manera exógena de manchas de sangre seca aplicada a papeles 903 Neonatal STD revestidos con diversos productos químicos. La tabla se obtiene de 2 experimentos independientes ( $n = 6$ ). El valor de p compara los valores derivados de los papeles sumergidos con los obtenidos del papel 903 sin sumergir.

| Producto químico                   | Recuperación de IL-2 (%) | Valor de p |
|------------------------------------|--------------------------|------------|
|                                    |                          |            |
| Sin sumergir                       | $49,0 \pm 2,1$           | n/a        |
| Poli-etil-enemina (PEI)            | $55,8 \pm 12,2$          | $> 0,05$   |
| Poli-vinil-pirrolidona (PVP)       | $74,7 \pm 7,8$           | $< 0,05$   |
| Inulina                            | $33,6 \pm 15,4$          | $> 0,05$   |
| Poli-2-etil-2-oxazolina (PeOX)     | $62,2 \pm 2,0$           | $< 0,05$   |
| Albúmina*                          | 63,7                     | incremento |
| Caseína                            | $57,7 \pm 1,5$           | $< 0,05$   |
| Poli-etilen glicol 1000 (PEG 1000) | $31,0 \pm 2,8$           | $> 0,05$   |
| Poli-etilen glicol 200 (PEG 200)   | $33,5 \pm 15,7$          | $> 0,05$   |

- 15 Tabla 3 - Recuperación de IL-2 añadida de manera exógena de manchas de sangre seca aplicada a DMPK-C revestido con diversos productos químicos ( $n = 3$ ). El valor de p compara los valores derivados de los papeles sumergidos con los obtenidos del papel DMPK-C sin sumergir. Albúmina\*  $n = 1$ .

Aunque se describen las realizaciones ilustrativas preferidas de la presente invención, un experto en la técnica apreciará que la presente invención se puede poner en práctica mediante realizaciones distintas de las descritas, que se presentan con fines de ilustración solamente, y no a modo de limitación. La presente invención se limita solamente mediante las reivindicaciones siguientes.

# REIVINDICACIONES

1. Un método de recuperación de un material biológico de un soporte sólido que tiene al menos una superficie revestida con un producto químico seleccionado del grupo que consiste en polivinil pirrolidona (PVP), poli-2-etil-2-oxazolina (PEOX), albúmina y caseína, que comprende las etapas de
  - 5 i) poner en contacto una superficie de un soporte sólido con una muestra que contiene un material biológico;
  - ii) secar dicha muestra sobre dicha superficie de dicho soporte;
  - iii) almacenar el soporte; y
  - iv) extraer dicho material biológico de la superficie.
2. El método de la reivindicación 1, en el que dicho soporte sólido se selecciona del grupo que consiste en papel, microfibra de vidrio y una membrana.
3. El método según la reivindicación 1, en el que el soporte sólido es un papel.
4. El método de la reivindicación 3, en el que dicho papel es un papel de celulosa.
5. El método de la reivindicación 2, en el que dicha membrana se selecciona del grupo que consiste en poliéster, poliéter sulfona (PES), poliamida (Nailon), polipropileno, politetrafluoroetileno (PTFE), policarbonato, nitrato de celulosa, acetato de celulosa y óxido de aluminio.
6. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la etapa iii) comprende almacenar el soporte sólido a una temperatura en el intervalo de 15 a 40 °C.
7. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la muestra se selecciona del grupo que consiste en un tejido, célula, sangre, plasma, saliva y orina.
8. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho material biológico se selecciona del grupo que consiste en una biomolécula, una biomolécula obtenida de manera sintética, un componente celular y un fármaco biofarmacéutico.
9. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho material biológico es un fármaco biofarmacéutico.
10. El uso de un soporte sólido que tiene al menos una superficie revestida con un producto químico seleccionado del grupo que consiste en polivinil pirrolidona (PVP), poli-2-etil-2-oxazolina (PEOX), albúmina y caseína para facilitar la recuperación de un material biológico del mismo.
11. El uso de un soporte sólido que tiene al menos una superficie revestida con un producto químico seleccionado del grupo que consiste en polivinil pirrolidona (PVP), poli-2-etil-2-oxazolina (PEOX), albúmina y caseína para facilitar la recuperación de un fármaco biofarmacéutico del mismo.

Figura 1

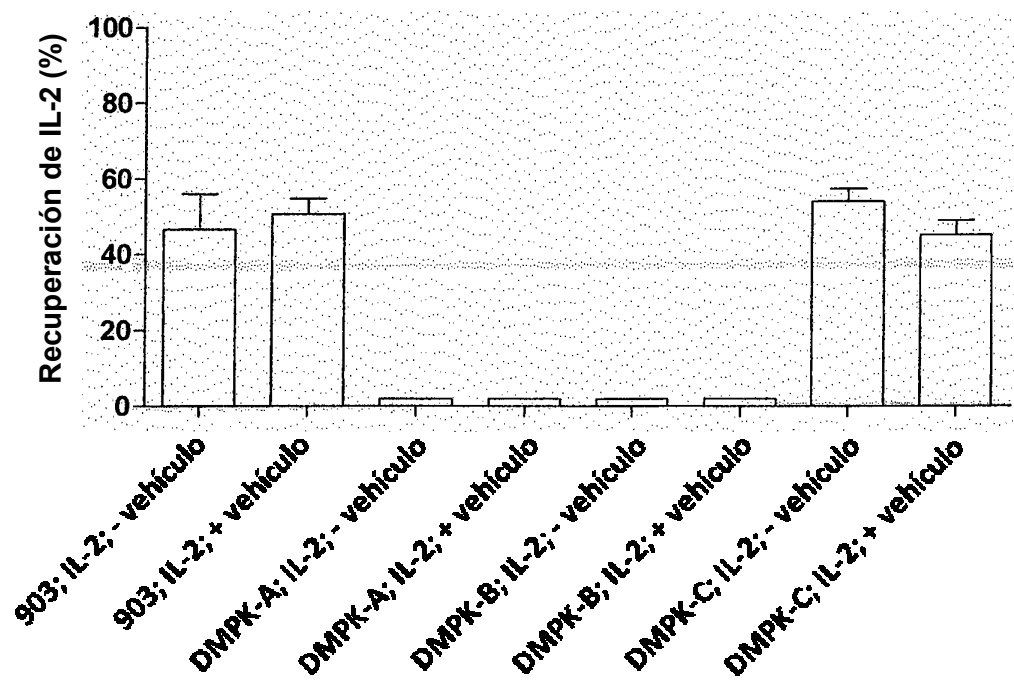


Figura 2

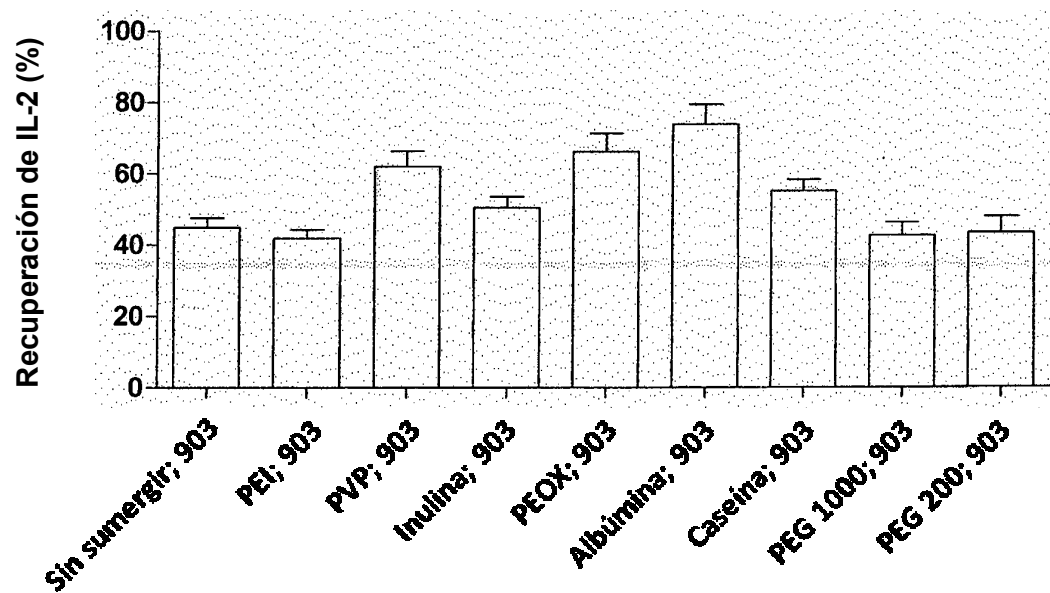


Figura 3

