

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 838**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2015 PCT/IB2015/054150**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15186049**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2015 E 15738981 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 3148698**

54 Título: **Dispositivo de recolección y procesamiento de muestras**

30 Prioridad:

01.06.2014 CH 838142014

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

06.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RIDA, AMAR y
FERRARI, SÉLÈNE**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 740 838 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de recolección y procesamiento de muestras

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo para recolección de muestras de líquido, en particular para la recolección de muestras biológicas de líquido, y procesamiento con el objetivo de diagnosticar o caracterizar moléculas o partículas diana que pueden estar presentes en la muestra. Más específicamente, la invención se refiere a un dispositivo adecuado para preparación de muestras que permite separación y concentración eficaz de moléculas o partículas diana de las muestras.

Descripción de técnicas relacionadas

15 En ensayos biológicos la capacidad de extraer, concentrar y purificar molécula(s), partícula(s) o analito(s) diana a partir de diversas muestras (es decir preparación de muestras) representa una etapa crítica y es un desafío como una etapa necesaria para detección y análisis de dianas eficaz. La etapa de preparación de muestras es la etapa limitante de velocidad principal en ensayos biológicos en cuanto a límite de detección, reproducibilidad e interferencias con otros compuestos de dicho(s) analito(s) o partícula(s). Los procedimientos de preparación de
20 muestras existentes típicos implican etapas de pipeteo manual prolongado o robótico complejo que incluyen largas rondas de centrifugación. No sólo son tales procedimientos lentos, costosos y laboriosos sino que también pueden representar un riesgo para la salud para el personal de laboratorio requiriendo la costosa eliminación de productos químicos peligrosos. Además, el flujo de trabajo para la preparación de muestras, especialmente para la nueva generación de dianas moleculares se ha vuelto incluso más complejo y se están ofreciendo múltiples soluciones.
25 Actualmente, se están usando soluciones diferentes e individuales para la preparación de muestras para cada tipo de muestra y diana. Proporcionar una solución de flujo de trabajo de preparación de muestras estándar aplicable a múltiples muestras y dianas que sea fácil de implementar, compatible con automatización e integración de reactivos e implique tiempo práctico mínimo, sigue siendo un requisito sin resolver en el ambiente diagnóstico y de la las ciencias de la vida. Además, la normalización de las metodologías de flujo de trabajo de las muestras es un requisito
30 importante principalmente en entornos diagnósticos regulados.

Hasta la fecha, hay dos metodologías para el procesamiento de ensayos: (1) Ensayos homogéneos que funcionan entre analitos a nivel molecular en disolución. Las velocidades de reacción en estos ensayos son rápidas, dado que
35 tienen lugar en la fase líquida, y su implementación es relativamente sencilla. Sin embargo, su baja especificidad y fuerte susceptibilidad a interferencias con el medio son limitaciones importantes que imposibilitan su uso sin etapas de procesamiento de muestras adicionales. (2) Los ensayos heterogéneos contienen una superficie sólida con grupo(s) de reconocimiento molecular que se unen a y separan "selectivamente" analitos diana previamente a su detección en disolución. Esto proporciona una especificidad excelente pero a costa de velocidades de reacción lentas entre los analitos y la superficie sólida y también de un potencial alto de unión no específica en la superficie
40 sólida. La conciliación de ambos tipos de ensayos durante un procedimiento único abriría la posibilidad de diseñar herramientas diagnósticas más sensibles, precisas y rápidas. Ciertamente, la capacidad de controlar la interacción molecular así como la especificidad del reconocimiento a nivel molecular y al mismo tiempo también realizar una separación controlada en cuanto a una superficie sólida abrirá nuevas perspectivas en ensayos biológicos.

45 La solicitud de patente internacional WO2012035508 divulga un método que usa fibrinógeno como un vehículo para separar moléculas o partículas diana a partir de prácticamente cualquier clase de muestras, en lugar de los enfoques de vanguardia que usan superficies sólidas tales como perlas magnéticas o micropocillos revestidos con grupo de afinidad diferente como medio para capturar y separar dianas de las muestras. En la metodología del documento WO2012035508, la separación de dianas se consigue convirtiendo el vehículo de fibrinógeno en fibrina lo que
50 conduce a su agregación en una red de fibrina que se retraerá para obtener un aglomerado pequeño y se separará de la muestra. Basándose en las interacciones entre moléculas libres en suspensión (es decir condiciones homogéneas), la reacción entre las dianas y el vehículo de fibrinógeno es muy rápida y eficaz. Sin embargo, el método tal como se divulga en el documento WO2012035508 todavía sufre una limitación relacionada con el manejo del aglomerado de fibrina durante el procedimiento de separación. En particular no se dirige a problemas asociados
55 con el manejo físico del aglomerado de fibrina.

El documento US3525254 divulga un dispositivo y un método para someter a prueba los factores de coagulación de la sangre que comprenden un tubo de ensayo con un tapón retirable que tiene un elemento de retención de
60 coágulos. El elemento de retención de coágulos tiene en su cuerpo plano un par de bordes opuestos convergente o inclinado hacia dentro y hacia abajo, en el que una pluralidad de púas similares a un gancho se proyectan hacia fuera y hacia arriba desde los bordes.

Por tanto, aún existe una necesidad de un dispositivo y método nuevos que permitan un manejo fácil y automatizado del aglomerado de fibrina formado según el método divulgado en los documentos WO2012035508 o US3525254,
65 que abrirá la posibilidad de proporcionar un enfoque de procesamiento de muestras homogéneo nuevo que supera la complejidad de las metodologías basadas en superficie sólida existentes.

Breve descripción de la invención

5 La presente invención divulga un dispositivo para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra de líquido que contiene fibrinógeno que, cuando se introduce en un recipiente del dispositivo, es capaz de formar un aglomerado de fibrina polimerizada en el que se atrapan partículas o moléculas diana, comprendiendo el dispositivo: un recipiente para recolectar la muestra y preferiblemente un cierre. El recipiente comprende un primer extremo superior y un segundo extremo inferior y al menos una pared interior que define una porción de depósito para recibir la muestra, en el que dicha porción de depósito comprende al menos un elemento de anclaje configurado para engancharse de manera local con un aglomerado de fibrina polimerizada formada al añadirse la dicha muestra al recipiente y en el que las partículas o moléculas diana se atrapan dentro del aglomerado de fibrina polimerizada.

15 El aglomerado de fibrina polimerizada que atrapa las dianas dentro del dispositivo según la invención se realiza según el método descrito en la solicitud de patente WO2012035508. A este respecto, la presente invención se refiere a un dispositivo para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra de líquido que contiene fibrinógeno, comprendiendo el dispositivo: un recipiente para recolectar la muestra y preferiblemente un cierre. El recipiente comprende un primer extremo superior y un segundo extremo inferior y al menos una pared interior que define una porción de depósito para recibir dicha muestra, en el que dicho depósito comprende al menos un elemento de anclaje configurado para engancharse de manera local con un aglomerado de fibrina polimerizada formada al añadirse la dicha muestra al recipiente, en el que el recipiente comprende un elemento de pasador alargado que se extiende en la porción de depósito, el elemento de anclaje está situado en o hacia el extremo de dicho elemento de pasador, y en el que el elemento de anclaje comprende un revestimiento de superficie local alrededor del cual se fijará de manera local el aglomerado de fibrina polimerizada. Las partículas o moléculas diana se atrapan dentro del aglomerado de fibrina polimerizada formado al convertirse (al menos parcialmente) el fibrinógeno contenido en la muestra en fibrina.

La presente invención divulga también un método para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra que contiene fibrinógeno que, en funcionamiento, comprende las etapas de:

- 30 (a) añadir la dicha muestra al recipiente del dispositivo,
- (b) convertir el fibrinógeno dentro de la muestra al menos parcialmente en fibrina, formando de ese modo una red de fibrina que atraparán las moléculas o partículas diana,
- 35 (c) retraer la red de fibrina formada de la etapa (b) para obtener un aglomerado pequeño enganchado alrededor del elemento de anclaje del dispositivo, y
- (d) separar el aglomerado de fibrina polimerizada de la etapa (b) del medio de muestra circundante.

40 El dispositivo de la presente invención, al usarse, conduce a la formación de un aglomerado de fibrina pequeño en el que se atrapan partículas o moléculas diana y se concentran. El aglomerado de fibrina así formado se captura de manera local por el elemento de anclaje situado dentro del recipiente del dispositivo, lo que permite su fácil separación del medio líquido circundante.

45 Además, la tasa de concentración de dianas está determinada por el tamaño del aglomerado de fibrina así formado. Por tanto, la composición y el diseño del dispositivo es tal que dará como resultado la formación de un coágulo con un tamaño que es como mucho 1/3 del tamaño de muestra inicial y preferiblemente el tamaño del coágulo es como mucho 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, en una realización preferida de la invención, el coágulo se retrae para formar adicionalmente un aglomerado pequeño con un tamaño que puede alcanzar valores entre 1/50 y 1/1000 del volumen de muestra inicial.

50 Por consiguiente, la presente invención divulga un dispositivo que usa fibrinógeno como molécula vehículo para separar cualquier molécula o partícula diana a partir de prácticamente cualquier clase de muestra. Los mecanismos de separación implican dos procedimientos: (1) una separación por tamaño capturando las dianas dentro de la red de fibrina al someter la muestra a enzimas trombina o similares a trombina, (2) captura por afinidad de las partículas o moléculas diana en el fibrinógeno en suspensión y la separación de la diana capturada en una red de fibrina al someter la muestra a enzimas trombina o similares a trombina. En el último caso, la captura por afinidad puede deberse a afinidad nativa de la diana por la molécula de fibrinógeno. En otra realización, la captura por afinidad puede realizarse por una molécula compuesta por un resto de unión a fibrina/fibrinógeno y un resto captador de diana.

60 El método según la invención puede incluir además una etapa en la que el aglomerado de fibrina así producido se lisa para recuperar las dianas. Esta etapa de lisis se consigue al resuspender el concentrado de aglomerado de fibrina en una disolución tamponada apropiada. Un ejemplo típico de un tampón controlado un tampón hipotónico, detergentes que contienen tampón en combinación con un fibrinolítico como plasmina y/o agentes proteolíticos como

proteínasa K, pronasa y metaloproteínasa. Tal etapa de lisis puede mejorarse añadiendo además potenciadores de lisis de coágulos como plasminógeno o activador de plasminógeno. En una realización preferida, la etapa de lisis puede incluir además el uso de enzimas degradadoras de ácidos nucleicos.

5 Pueden emplearse atrapamiento por tamaño dentro de la red de fibrina así como reacciones de unión por afinidad específicas para la determinación o aislamiento de una amplia gama de sustancias diana en muestras biológicas. Ejemplos de sustancias diana son células, componentes celulares, subpoblaciones celulares (tanto eucariotas como procariontas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácidos nucleicos y similares.

10 Un aspecto principal de la invención se refiere a un dispositivo para separar moléculas o partículas diana a partir de una muestra que contiene fibrinógeno, según la reivindicación independiente 1.

15 Otro aspecto principal de la invención se refiere a un método para separar moléculas o partículas diana a partir de una muestra según la reivindicación 10.

Diferentes realizaciones están expuestas en las reivindicaciones dependientes. El contenido de las reivindicaciones y todas las combinaciones reivindicadas se incorpora por referencia en esta descripción y sigue formando parte de la divulgación incluso si se abandonan las reivindicaciones.

20 Breve descripción de los dibujos

Los objetos y características de la presente invención se exponen con particularidad en las reivindicaciones adjuntas. La presente invención, tanto en cuanto a su organización como en cuanto a su manera de funcionamiento, junto con objetos y ventajas adicionales, pueden entenderse mejor en referencia a la siguiente descripción, tomada en conjunto con los dibujos adjuntos, en los que

- la figura 1 es una representación esquemática de una realización preferida del dispositivo según la invención,
- la figura 2(a) y la figura 2(b) son representaciones esquemáticas del funcionamiento del dispositivo,
- la figura 3 ilustra la separación y concentración de partículas o moléculas diana,
- la figura 4 ilustra un recipiente secundario para la recuperación y suspensión de dianas,
- la figura 5 muestra tres diferentes tipos de elemento de anclaje,
- la figura 6 es un diagrama del funcionamiento global, y
- las figuras 7 (a), (b) y (c) muestran una realización adicional del dispositivo en tres estados diferentes.

La figura 1 es una representación esquemática de una realización preferida del dispositivo para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra de líquido que comprende un recipiente (1) para recolectar la muestra y una tapa (2) de cierre posicionada en el primer lado superior abierto del recipiente. El recipiente comprende además un segundo extremo inferior cerrado y al menos una pared interior que define una porción (5) de depósito para recibir la muestra. La tapa (2) de cierre comprende un elemento (3) de pasador alargado que protruye hacia abajo sumergido en la muestra en el depósito (5) del dispositivo y que comprende en su extremo inferior un elemento (4) de anclaje.

La figura 2 es una representación esquemática del funcionamiento del dispositivo para la separación y concentración de partículas o moléculas diana a partir de una muestra. Tal como se muestra en la figura 2 (a), el dispositivo según la invención está diseñado para recibir una muestra de líquido que puede incluir partículas o moléculas (8) diana que van a separarse o concentrarse. La muestra puede incluir fibrinógeno como un componente nativo (por ejemplo sangre). En el caso de una muestra sin fibrinógeno que va a procesarse, el recipiente (1) debe incluir fibrinógeno como un aditivo que va a mezclarse con la muestra sin fibrinógeno. La figura 2 (b) muestra que a medida que se añade la muestra al dispositivo, el fibrinógeno dentro del líquido (o bien nativo de la muestra o bien no) se convertirá al menos parcialmente en fibrina al someter la muestra a enzimas trombina o similares a trombina, formando de ese modo una red de fibrina que atraparán las moléculas o partículas diana. La red de fibrina así formada se retraerá para formar un aglomerado (9) de fibrina polimerizada enganchado o adherido alrededor del elemento (4) de anclaje.

La figura 3 es una representación esquemática del funcionamiento del dispositivo para la separación y concentración de partículas o moléculas diana a partir de una muestra. Al retraer la red de fibrina para obtener un aglomerado (9) de fibrina polimerizada enganchado alrededor del elemento (4) de anclaje, la tapa (2) de cierre, con el elemento (4) de anclaje y aglomerado (9) de fibrina polimerizada enganchado, se retirarán del recipiente (1), separando de ese

modo el aglomerado (9) de fibrina polimerizada, con las dianas atrapadas, del medio de la muestra. En una etapa posterior, la tapa (2) de cierre puede sumergirse en un recipiente (6) secundario que contiene un medio (7) líquido de resuspensión que lisará el aglomerado de fibrina, permitiendo de ese modo la recuperación de las moléculas o partículas (8) diana. El recipiente (6) secundario es preferiblemente más pequeño que el dispositivo según la presente invención.

La figura 4 es una representación esquemática de una realización preferida del dispositivo de resuspensión y recuperación de dianas que comprende un recipiente (6) secundario más pequeño para contener el líquido de resuspensión. El recipiente (6) comprende un primer extremo superior abierto que está adaptado para recibir una tapa, tal como la tapa (2) de cierre, que comprende el elemento (4) de anclaje del dispositivo según la invención. El recipiente (6) comprende además un segundo extremo inferior cerrado y al menos una pared interior que define una porción (7) de depósito para contener el líquido de resuspensión que permite lisar el aglomerado de fibrina y de ese modo recuperar las dianas (8). La recuperación de dianas se consigue sumergiendo el elemento (4) de anclaje de la tapa (2) de cierre en el recipiente (6) de recuperación.

La figura 5 muestra diferentes realizaciones del elemento (4) de anclaje: concretamente (4a) forma de anillo, (4b) revestimiento químico o biológico y (4c) forma de gancho irregular.

La figura 6 es una representación esquemática del funcionamiento global del método para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra que contiene fibrinógeno usando el dispositivo según la invención. En la etapa 1, se añade la muestra al recipiente del dispositivo. En la etapa 2, se produce una reacción de formación de red de fibrina. En la etapa 3, el aglomerado de fibrina se retrae alrededor de un pasador hidrófobo (elemento de anclaje) ajustado en la tapa del tubo. La etapa 4 es una fase de separación del aglomerado. En la etapa 5, el aglomerado se sumerge en un volumen pequeño de disolución de resuspensión. Finalmente, en la etapa 8, se recuperan las partículas o moléculas diana.

La figura 7 es una representación esquemática de una realización preferida del dispositivo para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra de líquido que comprende, diferenciado con respecto al dispositivo de la figura 1, un elemento (3) de pasador alargado que se extiende hacia arriba sumergido en la porción (5) de depósito y posicionado en el extremo inferior cerrado del recipiente (1). El elemento (3) de pasador alargado comprende además en su extremo superior un elemento (4) de anclaje. En funcionamiento, una red de fibrina retraída que forma un aglomerado (9) de fibrina polimerizada se enganchará o adherirá alrededor del elemento (4) de anclaje. El aglomerado de fibrina así formado puede separarse después de esto decantando el medio líquido circundante. La recuperación de dianas se consigue añadiendo, al mismo recipiente (1), un tampón (7) de lisis de aglomerado de fibrina que lisará el aglomerado de fibrina permitiendo de ese modo la recuperación de las moléculas o partículas (8) diana.

Descripción detallada de la invención

Tal como se ilustra en la figura 1, un dispositivo según la invención para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra de líquido que contiene fibrinógeno comprende: un recipiente (1) para recolectar la muestra y un cierre (2). El recipiente (1) comprende un primer extremo superior y un segundo extremo inferior y al menos una pared interior que define una porción (5) de depósito para recibir la muestra, en el que la porción de depósito comprende al menos un elemento (4) de anclaje para enganchar de manera local el aglomerado (9) de fibrina polimerizada formado al añadirse la muestra al recipiente y en el que se atrapan partículas o moléculas diana dentro del aglomerado de fibrina polimerizada.

La invención cubre también un método para recolectar y procesar muestras biológicas que comprende: proporcionar un recipiente que comprende trombina y potencialmente fibrinógeno en concentración apropiada para conducir a una separación eficaz de las moléculas o partículas diana a partir de un medio líquido complejo circundante. Este método permite además recuperar la/las diana(s) que está(n) altamente concentrada(s) dentro del material polimerizado y que preferiblemente tienen un volumen que es como mucho 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, una ventaja del método divulgado es la capacidad de alcanzar una tasa de concentración de 1/100 a 1/1000 del volumen de muestra inicial. La/las dianas(s) así concentrada(s) puede(n) procesarse muy fácilmente después de esto a través de etapa(s) de purificación adicional(es) y/o analizarse directamente usando metodologías de vanguardia.

Una ventaja importante del dispositivo divulgado es que permite una separación fácil y automática de las partículas o moléculas diana integrando en el dispositivo un elemento (4) de anclaje que enganchará, adherirá o nucleará de manera local el aglomerado de fibrina polimerizada. En la práctica, el elemento (4) de anclaje constituye de algún modo un punto de "nucleación" alrededor del cual se formará el aglomerado de fibrina y se retraerá para obtener un aglomerado pequeño tal como se muestra en la figura 2. En una realización preferida, el elemento (4) de anclaje está integrado con la tapa (2) de cierre que comprende un elemento (3) de pasador alargado que va a sumergirse en la muestra de líquido contenida en la porción (5) de depósito al cerrar la tapa. En esta configuración, el elemento (4) de anclaje está situado en o hacia el lado extremo del elemento (3) de pasador.

La integración del elemento (4) de anclaje en la tapa tiene la ventaja de permitir una separación fácil del aglomerado (9) de fibrina polimerizada enganchado alrededor del elemento (4) de anclaje. Tal como se muestra en la figura 3, la tapa (2) de cierre que contiene el elemento (4) de anclaje con el aglomerado (9) de fibrina polimerizada enganchado puede retirarse del recipiente (1), consiguiendo de ese modo la separación del aglomerado (9) de fibrina polimerizada concentrado, con las dianas atrapadas en el mismo, del medio de muestra inicial. La tapa (2) de cierre puede encajarse después de esto en un recipiente (6) más pequeño que contiene medio (7) líquido de resuspensión para la recuperación de dianas, tal como se muestra en la figura 4.

Aunque la presente invención se ha ilustrado mediante una realización preferida en la que el elemento (4) de anclaje está integrado en la tapa de cierre, en la práctica el elemento de anclaje también puede formar parte del recipiente (1) del dispositivo como por ejemplo integrado en las paredes o lados inferiores de la porción de depósito (tal como se muestra en la figura 7). En este caso, el procedimiento de separación se conseguirá decantando la muestra del recipiente (1) del dispositivo mientras se mantiene el aglomerado de fibrina fijado (o enganchado) al elemento (4) de anclaje. La recuperación de dianas se consigue añadiendo, al mismo recipiente (1), un tampón (7) de lisis de aglomerado de fibrina (tal como se muestra en la figura 7 c), que lisará el aglomerado de fibrina permitiendo de ese modo la recuperación de las moléculas o partículas (8) diana.

El elemento de anclaje según la invención puede ser cualquier parte local con forma irregular o regular como los mostrados en la figura 5. Además, el elemento de anclaje comprende un revestimiento de superficie local que permite el anclaje local del aglomerado de fibrina. Los ejemplos no limitativos de tal revestimiento incluyen revestimiento químico (por ejemplo, revestimiento hidrófobo) y revestimiento biológico (por ejemplo moléculas de unión a fibrinógeno/fibrina tales como trombina, factor de coagulación XIII, proteínas de unión a fibrinógeno bacterianas y activador tisular del plasminógeno (t-PA)).

El dispositivo tal como se divulga en el presente documento puede abarcar cualquier dispositivo de recolección de muestras incluyendo tubos tales como tubos de ensayo y tubos de centrifuga; dispositivos de recolección de muestras de sistema cerrado, tales como bolsas de recolección; jeringas, especialmente jeringas precargadas; catéteres; micropocillos y otras placas multipocillo; matrices; conductos; vasos de laboratorio tales como matraces, y ensamblajes; pipetas y puntas de pipeta, etc. En general, la presente invención se refiere a cualquier recipiente adecuado para contener una muestra biológica, así como a recipientes y elementos implicados en la transferencia de muestras siempre que cumplan con los criterios explicados resumidamente en el presente documento.

Basándose en la divulgación anterior, la presente invención incluye además un método para separar moléculas o partículas diana a partir de una muestra usando un dispositivo de recolección de muestras que puede usarse muy fácilmente de manera manual o estar integrado con sistemas automatizados de vanguardia lo que facilita la integración del método de preparación de muestras en flujos de trabajo rutinario de laboratorio tal como se muestra en la figura 6.

El volumen del recipiente de muestras es de entre 0,1 y 100 ml y preferiblemente de entre 0,1 y 10 ml. La concentración de fibrinógeno en la muestra es preferiblemente al menos 0,1 $\mu\text{g/ml}$. En una realización preferida, la concentración de fibrinógeno en la muestra es de entre 0,1 y 100 mg/ml y lo más preferiblemente de entre 10 mg/ml y 10 $\mu\text{g/ml}$.

El dispositivo puede incluir además como un aditivo una enzima trombina o similar a trombina. La concentración de trombina es de 0,01 a 10 U.I./ml y preferiblemente dentro del intervalo de 0,1 a 2 U.I./ml de muestra. En la práctica, la cantidad de la enzima trombina o similar a trombina debe ajustarse de manera correspondiente con la concentración de fibrinógeno dentro del dispositivo para obtener la estructura de red de fibrina y tamaño de aglomerado deseados. La cantidad de trombina es preferiblemente menos de 20 U.I. de trombina por mg de fibrinógeno, preferiblemente en un intervalo de entre 0,01 y 10 U.I. de trombina por mg de fibrinógeno, más preferiblemente de entre 0,1 y 1 U.I. de trombina por mg de fibrinógeno.

En caso de muestras de sangre tales como sangre completa, el dispositivo de recolección de muestras según la invención puede incluir además agentes de coagulación que promueven la generación de trombina endógena dentro de la muestra. Tales agentes promotores pueden seleccionarse por ejemplo de grupos que comprenden compuestos de silicato fibroso o en polvo tales como caolín, Celite, sílice de diatomeas y fibras de vidrio, polvos finos de compuestos de calcio tales como carbonato de calcio y sulfato de calcio, sustancias similares a trombina derivadas de venenos de serpiente, y polifenoles que pueden activar factores de aglomeración de la sangre para promover la coagulación. Además, estos agentes promotores de la coagulación pueden añadirse, por ejemplo, de manera individual o en combinación en la muestra o revestidos dentro de la pared del recipiente de muestras. La cantidad de tales agentes promotores debe ajustarse de manera para controlar el proceso de coagulación y obtener un tamaño de aglomerado de fibrina pequeño.

En una realización preferida para controlar la estructura de la red de fibrina con el fin de atrapar moléculas o partículas diana de una muestra, el dispositivo de recolección de muestras según la invención puede incluir además aditivos que permiten ajustar la concentración de calcio. En la práctica, esto puede conseguirse añadiendo una fuente de iones de calcio al dispositivo. La fuente de iones de calcio es preferiblemente cloruro de calcio (CaCl_2),

preferiblemente en un intervalo de concentración de entre 1 y 10 mg por ml de volumen de muestra, incluso más preferiblemente entre 4 y 7 mg por ml de volumen de muestra, lo más preferiblemente entre 5 y 6 mg por ml de volumen de muestra. En muestras de sangre, por ejemplo, el calcio está presente de manera natural y el ajuste de la concentración de calcio puede conseguirse añadiendo adicionalmente al dispositivo agentes quelantes de calcio tales como GDTA, EDTA o citrato.

Además, el dispositivo según la invención puede incluir aditivos que comprenden moléculas que tienen: (I) resto de unión a fibrina/fibrinógeno y (II) un resto captador de sustancia dirigido contra las moléculas o partículas diana. Por consiguiente, el resto captador de sustancia dirigido contra las moléculas o partículas diana puede seleccionarse del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente las dichas moléculas o partículas diana. Además, el resto captador de sustancia puede estar acoplado o combinado con un resto de unión a fibrina/fibrinógeno seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas de unión a fibrinógeno bacterianas, activador de tipo tisular del plasminógeno, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo. En una realización preferida, el resto de unión a fibrina/fibrinógeno y el resto captador de sustancia están combinados en una molécula de fusión.

Además, el dispositivo según la invención puede incluir aditivos que comprenden una proteína recombinante de fibrinógeno. Tal proteína recombinante de fibrinógeno puede estar diseñada específicamente para potenciar o inhibir interacciones de afinidad de la proteína recombinante de fibrinógeno con moléculas o partículas diana específicas contenidas en la muestra en uso dentro del dispositivo. En una realización preferida, la proteína recombinante en uso dentro del dispositivo es una proteína de fusión de fibrinógeno con un dominio de resto de captación dirigido contra las dichas moléculas o partículas diana. En otra realización, la proteína de fusión de fibrinógeno incluye además un sitio de degradación. Esto será particularmente útil para recuperar las moléculas o partículas diana unidas de la red de fibrina durante una etapa de lisis. En una realización preferida, el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática o hidrolítica. En una realización lo más preferida, el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática, que se escinde mediante una enzima seleccionada del grupo que consiste en plasmina y metaloproteinasa de matriz.

En la práctica, todos los aditivos descritos anteriormente pueden añadirse a la muestra después de la recolección de muestras o estar ya integrados dentro del dispositivo. En el último caso, los aditivos pueden integrarse solubilizados en una disolución tampón acuosa. En una realización preferida, los dichos aditivos pueden incluirse dentro del dispositivo en forma liofilizada que puede solubilizarse justo antes del uso del dispositivo o al introducir la muestra en el dispositivo.

El dispositivo de recolección de muestras según la invención puede usarse para separar y concentrar moléculas o partículas diana tales como células, componentes celulares, subpoblaciones celulares (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácidos nucleicos diana y similares.

El dispositivo de recolección de muestras según la invención puede usarse para separar y concentrar moléculas o partículas diana a partir de diversas muestras. En general esto incluye sangre completa, derivados sanguíneos, componentes sanguíneos así como muestras sin fibrinógeno (incluyendo pero sin limitarse a orina, esputo e hisopado). A este respecto, la muestra en el presente documento puede referirse a cualquier tipo de muestra que necesita someterse a prueba, incluyendo muestras de comida, clínicas, ambientales y experimentales.

En la práctica, el dispositivo puede incluir también un código de identificación. Un código de identificación de este tipo puede estar determinado por, sin limitación, un código de barras o un color añadido al dispositivo, o por el tamaño y/o forma del dispositivo en sí. Tal código de identificación puede usarse como una referencia o indicador del uso y la aplicación deseados del dispositivo. Los dispositivos según varias realizaciones de la invención pueden diferenciarse, de hecho, según su composición, tipo de muestra para el que se usará el dispositivo y/o la/las diana(s) que necesitan separarse.

Los expertos en la técnica apreciarán que, dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas, la invención puede ponerse en práctica de otro modo que el descrito específicamente en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra de líquido que contiene fibrinógeno que es capaz, cuando se introduce en un recipiente del dispositivo, de formar un aglomerado (9) de fibrina polimerizada en el que se atrapan partículas o moléculas diana, comprendiendo el dispositivo: un recipiente (1) para recolectar la muestra, comprendiendo el recipiente un primer extremo superior, un segundo extremo inferior y al menos una pared interior que define una porción (5) de depósito para recibir la muestra, en el que dicha porción de depósito comprende al menos un elemento (4) de anclaje configurado para engancharse de manera local con el aglomerado (9) de fibrina polimerizada en el que se atrapan partículas o moléculas diana, después de su formación al añadirse la muestra en el recipiente (1),
- 5
- 10
- 15 en el que el recipiente (1) comprende un elemento (3) de pasador alargado que se extiende en la porción (5) de depósito, el elemento (4) de anclaje está situado en o hacia el extremo de dicho elemento (3) de pasador, y
- 20 en el que el elemento (4) de anclaje comprende un revestimiento de superficie local alrededor del cual se fijará de manera local el aglomerado de fibrina polimerizada.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el volumen del recipiente (1) es de entre 0,1 y 20 ml.
3. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que se incluye inicialmente enzima trombina o similar a trombina dentro de dicho recipiente (1).
- 25 4. Dispositivo según la reivindicación 1, para su cooperación con una muestra en el que se forma una muestra que contiene fibrinógeno al introducir una muestra sin fibrinógeno en el recipiente (1) que incluye inicialmente fibrinógeno.
- 30 5. Dispositivo según las reivindicaciones 3 y 4, en el que se incluye dicha trombina y/o fibrinógeno en el recipiente (1) en forma liofilizada.
6. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el primer extremo superior del recipiente (1) es un extremo abierto cerrado por una tapa (2) de cierre que comprende el elemento (3) de pasador alargado que se extiende en la porción (5) de depósito, y en el que el elemento (4) de anclaje está situado en o hacia el extremo de dicho elemento (3) de pasador.
- 35 7. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el segundo extremo inferior del recipiente (1) está cerrado y comprende el elemento (3) de pasador alargado que se extiende en la porción (5) de depósito y en el que el elemento (4) de anclaje está situado en o hacia el extremo de dicho elemento (3) de pasador.
- 40 8. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el elemento (4) de anclaje forma un gancho conformado alrededor del cual se atraparán de manera local el aglomerado de fibrina polimerizada.
9. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que dicho revestimiento de superficie es hidrófobo.
- 45 10. Método para separar y concentrar partículas o moléculas diana a partir de una muestra que contiene fibrinógeno usando el dispositivo según la reivindicación 1, comprendiendo el método las etapas de:
- 50 (a) añadir una dicha muestra al recipiente (1) del dispositivo,
- (b) convertir el fibrinógeno dentro de la muestra al menos parcialmente en fibrina, formando de ese modo una red de fibrina que atraparán las dichas moléculas o partículas diana,
- 55 (c) retraer la red de fibrina formada de la etapa (b) para obtener un aglomerado pequeño enganchado alrededor del elemento (4) de anclaje del dispositivo,
- (d) separar el aglomerado de fibrina polimerizada de la etapa (c) del medio de muestra circundante.
- 60 11. Método según la reivindicación 10 que usa el dispositivo según la reivindicación 6, en el que la etapa (d) de separación se consigue retirando la tapa (2) de cierre que contiene el elemento (4) de anclaje del recipiente (1).
- 65 12. Método según la reivindicación 10 que usa el dispositivo según la reivindicación 7, en el que la etapa (d) de separación se consigue decantando la muestra circundante del recipiente (1).
13. Método según la reivindicación 10, en el que el método comprende además la etapa (e) de resuspensión

del aglomerado de fibrina polimerizada en un medio líquido que permite la lisis del dicho aglomerado de fibrina, recuperando de ese modo las dichas moléculas o partículas diana.

- 5
14. Método según las reivindicaciones 13 y 11, en el que una etapa de recuperación (e) se consigue sumergiendo la tapa (2) de cierre en un recipiente (6) de resuspensión que contiene un medio (7) líquido de resuspensión.
- 10
15. Método según las reivindicaciones 13 y 12, en el que la etapa de recuperación (e) se consigue añadiendo un medio (7) líquido de resuspensión al recipiente (1).
16. Método según la reivindicación 10, en el que el tamaño del aglomerado de fibrina es como mucho 1/10 del volumen de muestra inicial.
- 15
17. Método según la reivindicación 13, en el que el volumen del medio líquido de resuspensión de la etapa (e) es como mucho 1/10 del volumen de muestra inicial.
18. Dispositivo o método según cualquiera de las reivindicaciones 1 - 17, en el que las dichas moléculas o partículas diana comprenden bacterias, virus, levaduras, células, proteínas, péptidos o ácidos nucleicos.

20

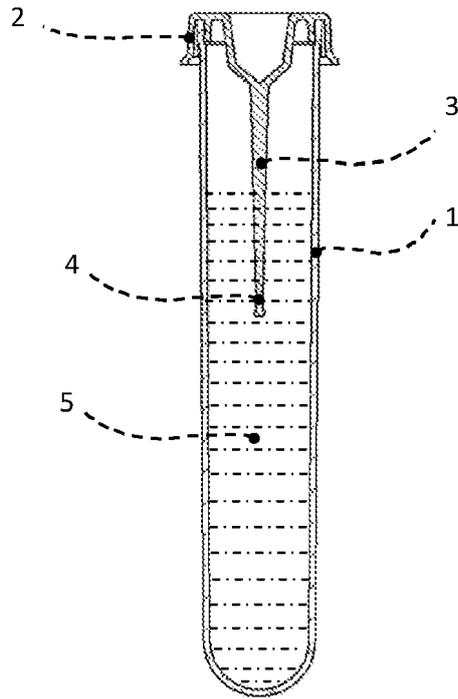
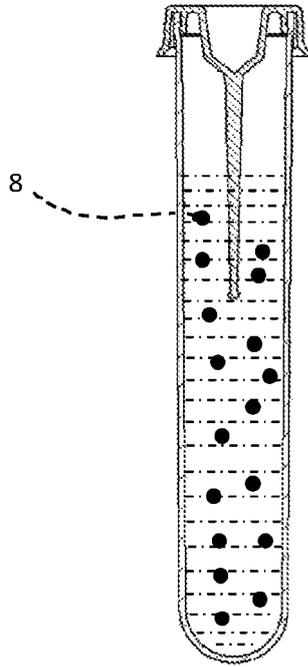
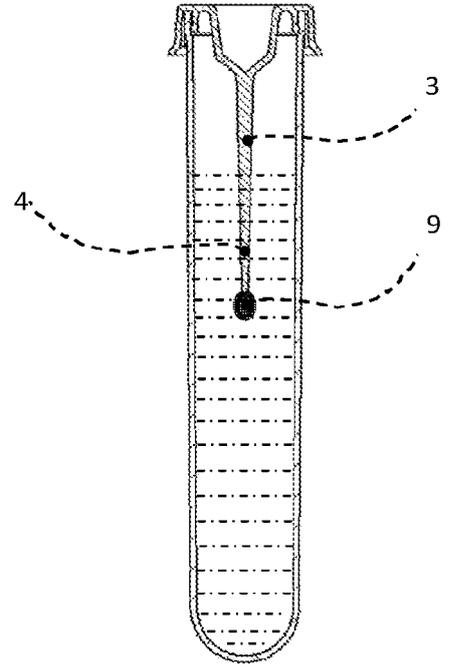


Figura 1



(a)



(b)

Figura 2

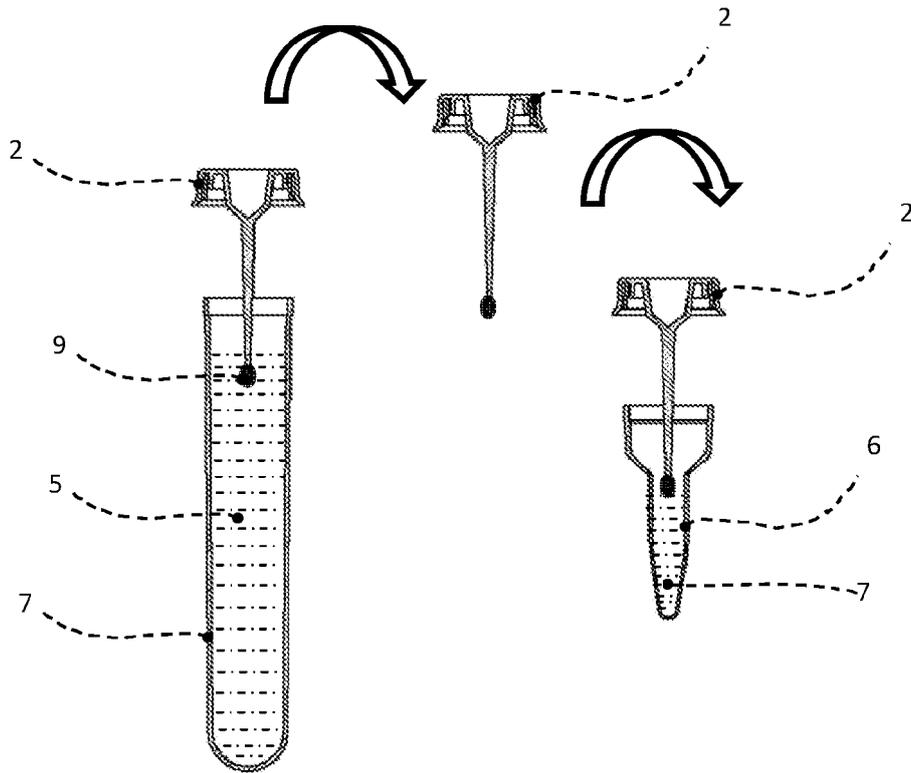


Figura 3

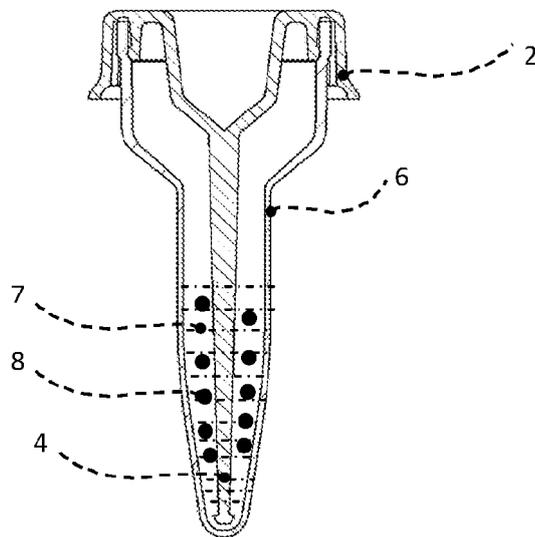


Figura 4

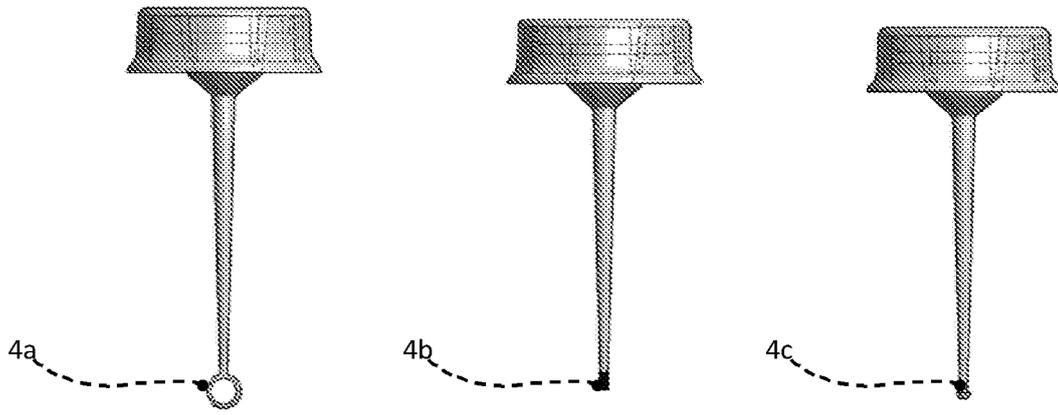


Figura 5

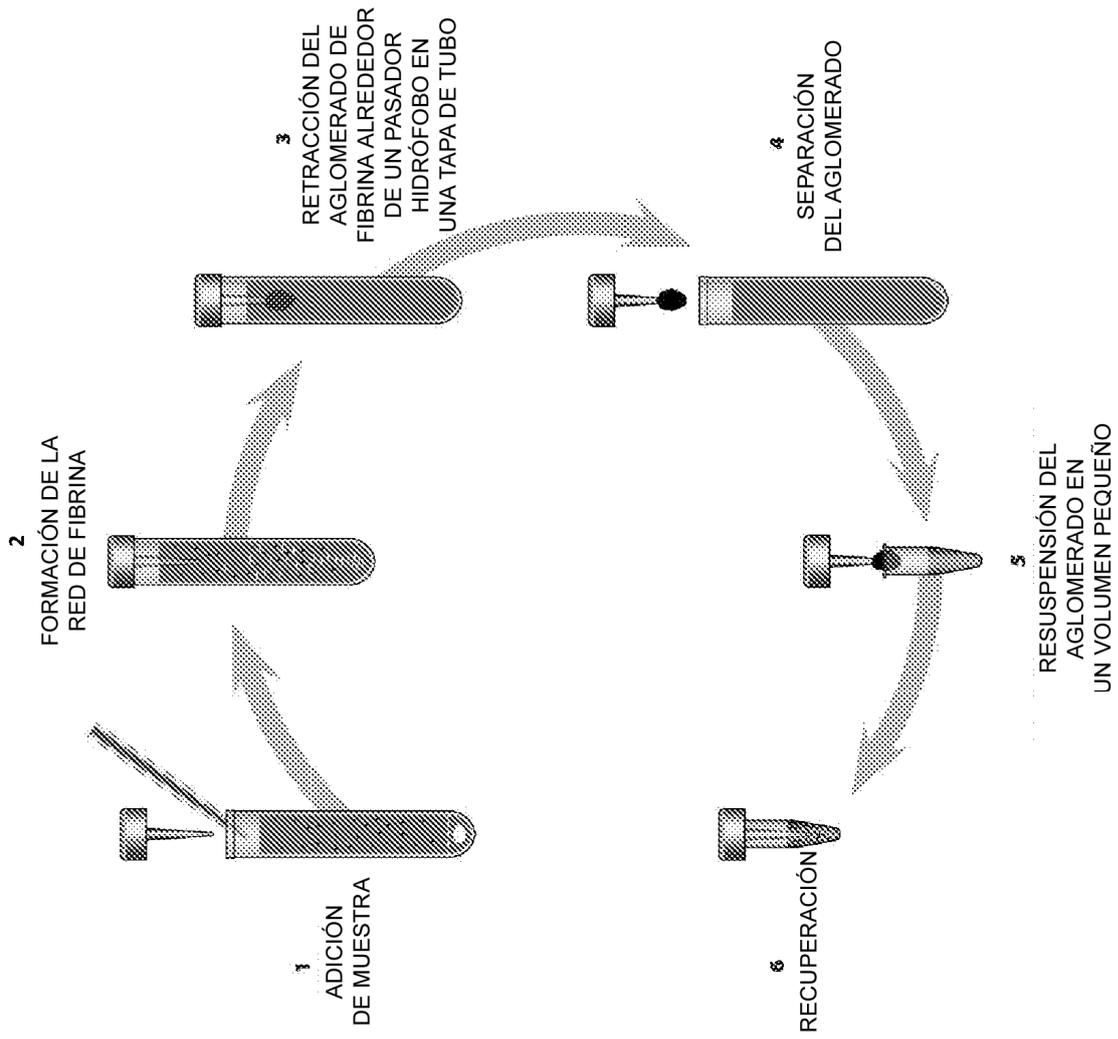


Figura 6

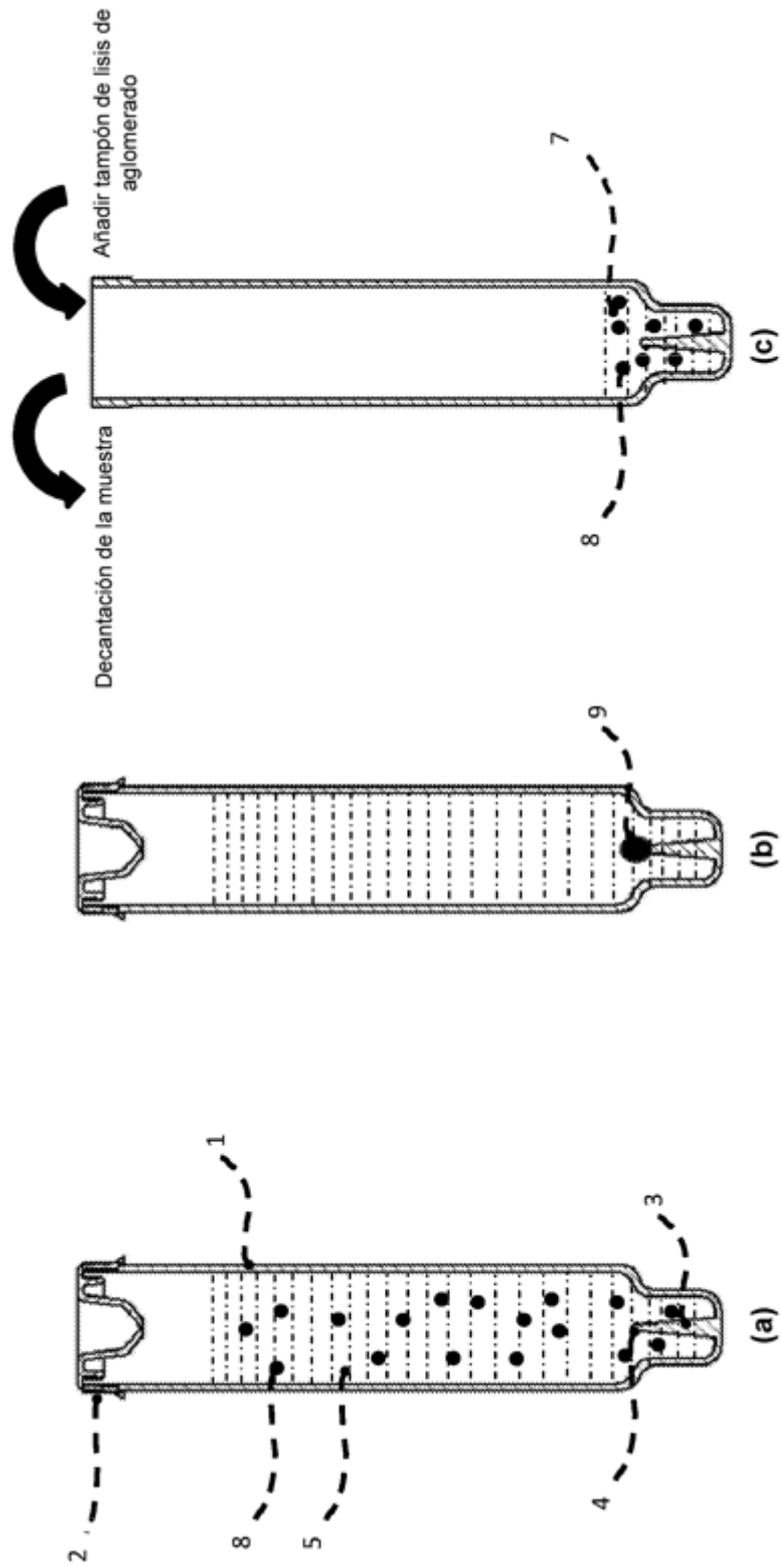


Figura 7