

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 660**

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 16154770 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 3067431**

54 Título: **Dispositivo que incluye componentes sanguíneos para separar moléculas o partículas diana de muestras**

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:
01.04.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 751 660 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 que incluye componentes sanguíneos para separar moléculas o partículas diana de muestras

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a un dispositivo para la separación de moléculas o partículas diana de dicha muestra. Más específicamente, la invención se refiere a un dispositivo que permite la separación y concentración eficaces de moléculas o partículas diana de muestras que contienen proteínas de fibrinógeno antes de su detección y análisis.

10

Descripción de las técnicas relacionadas

En bioensayos, la capacidad de extraer, concentrar y purificar la(s) molécula(s), partícula(s) o analito(s) diana de diversas muestras (es decir, preparación de la muestra) representa una etapa crítica y un desafío como etapa de requisito previo para la detección y análisis eficaces de la diana. La etapa de preparación de la muestra es la etapa principal limitante de la velocidad en bioensayos en lo que se refiere al límite de detección, la reproducibilidad y las interferencias con otros compuestos de dicha(s) partícula(s) o analito(s). Los procedimientos de preparación de muestras existentes normalmente implican prolongadas etapas de pipeteo manual o robótico complejo que incluyen largas rondas de centrifugación. Estos procedimientos no solo son lentos, costosos y laboriosos, sino que también pueden representar un riesgo para la salud del personal del laboratorio que exige la 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 aún más complejo y se ofrecen múltiples soluciones. Actualmente, están usándose 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 convencional aplicable para múltiples muestras y dianas que sea fácil de implementar, compatibles con la automatización y la integración de reactivos y que impliquen un tiempo de manipulación mínimo, sigue siendo todavía un requisito no resuelto en las ciencias biológicas y el entorno de diagnóstico. Además, la normalización de metodologías de flujo de trabajo de muestras es un requisito importante principalmente en entornos de diagnóstico regulados.

15

20

25

30

35

40

45

Una ilustración típica de la complejidad de la preparación de la muestra es la detección de moléculas o partículas diana del medio sanguíneo complejo. La detección de agentes infecciosos (bacterias, hongos) de la sangre a niveles de detección bajos es particularmente compleja. A nivel clínico, la detección de infección de la sangre (es decir, septicemia) 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. De hecho, la septicemia representa la causa más común de muerte en las unidades de cuidados intensivos. Además, debido a la detección deficiente de microorganismos de la sangre, la identificación tardía o la falta de la misma del agente infeccioso y/o la ausencia o la demora en las pruebas de sensibilidad a antibióticos, muchas modalidades de tratamiento con antibióticos se inician solo empíricamente sin una cobertura de diagnóstico adecuada. La necesidad médica del diagnóstico de septicemia para la detección temprana, la identificación rápida de microorganismos y las pruebas de sensibilidad a antibióticos y el tratamiento adecuado de los pacientes están todavía sin resolver. En momentos de desarrollo creciente de resistencia de microorganismos (por ejemplo, microorganismos nosocomiales), son cruciales nuevas metodologías para el diagnóstico rápido y preciso de la septicemia para disminuir la morbimortalidad. Finalmente, otra fuente de infecciones por septicemia son las transfusiones de sangre. La detección eficaz de microorganismos de la sangre, componentes sanguíneos y derivados sanguíneos es de gran importancia para la prevención de contaminaciones.

50

55

El uso de hemocultivos, ya sea como hemocultivos en botellas o hemocultivos en agar, sigue siendo el método de elección habitual (de referencia) para detectar e identificar agentes infecciosos en pacientes con bacteriemia y septicemia.

Un problema importante en la detección de células bacterianas en la sangre es la capacidad de detectar números de células de tan solo 1 unidad formadora de colonias (UFC) por mililitro. En este contexto, el volumen de sangre que debe procesarse a un nivel de detección de este orden de magnitud debe consistir por tanto en varios mililitros (5 - 10 ml) de la muestra de sangre. "Buscar una aguja en un pajar", el gran desafío en el diagnóstico de infección de la sangre se basará en la disponibilidad de tecnologías eficaces y fáciles de implementar que permitan la extracción y purificación de biomarcadores de infección específicos de microorganismos viables o su contenido genético en ácidos nucleicos.

60

65

Tal como se informa, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional WO95/15397 y WO2009/015484, se usan metodologías de centrifugación múltiple o filtración en combinación con etapas específicas de lisis de la pared/membrana celular para enriquecer los microorganismos diana de muestras de sangre y fluidos corporales. Además de la baja eficacia de enriquecimiento, otra limitación de tales metodologías de centrifugación es su incompatibilidad con flujos de trabajo de análisis de laboratorio automatizados de rutina. Para superar las limitaciones de procedimiento de la centrifugación, se han introducido partículas magnéticas recubiertas con grupos de afinidad dirigidos contra microorganismos diana. Usando una fuerza magnética, las partículas capturan las dianas sobre sus superficies, lo que da como resultado la fácil separación de las dianas de la sangre. Sin embargo, existen algunas desventajas importantes para una amplia aplicación de grupos de afinidad sobre perlas magnéticas para

capturar bacterias viables. En primer lugar, el espectro de microorganismos patógenos consiste en una larga lista de bacterias Gram negativas y Gram positivas y numerosas especies de hongos; no hay grupos de afinidad genéricos disponibles que cubran todas las clases de microorganismos. Además, muchos de estos microorganismos están encapsulados, un fenómeno que facilita su supervivencia y disposición en la sangre. En segundo lugar, se ha demostrado que los microorganismos no siempre flotan libremente en el torrente circulatorio, sino que más bien están asociados o secuestrados en algunas células sanguíneas así como de plaquetas. En el caso del *Staphylococcus aureus*, por ejemplo, las plaquetas de interacción y el secuestro adicional de las bacterias por las plaquetas es un factor de virulencia importante que permite que las bacterias escapen del sistema de defensa del huésped.

Una alternativa al enriquecimiento directo de microorganismos viables a partir de muestras de sangre consiste en el uso de biomarcadores moleculares (secuencias génicas específicas de ácido nucleico) y técnicas de amplificación de ácido nucleico posteriores inmediatas, como la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). El método abre nuevas posibilidades para ofrecer resultados más rápidos. Sin embargo, el nivel de detección (sensibilidad) a menudo es más bajo que el de los métodos basados en cultivos. La sensibilidad limitada de los métodos moleculares está relacionada principalmente con la gran cantidad de ADN de fondo de las células eucariotas (glóbulos blancos) en la muestra de sangre. Puede lograrse un aumento de la sensibilidad de los métodos basados en PCR extrayendo los ácidos nucleicos eucariotas de la muestra de sangre o concentrando específicamente el ADN del microorganismo (procariota). En este sentido, el documento EP-A-1.400.589 divulga un método de separación del ADN procariota del lisado sanguíneo que comprende la etapa de unión específica del ADN procariota con al menos una proteína o polipéptido, seguido por la separación del complejo así formado. Dentro del mismo alcance, el documento EP-A-1.861.495 describe un método para aislar específicamente ácidos nucleicos de células microbianas proporcionadas en una muestra mixta que comprende además células eucariotas superiores. Esta invención divulga el uso de nucleasas, especialmente nucleasas que degradan ADN, para degradar ácidos nucleicos en presencia de uno o varios agentes caotrópicos y/o uno o varios tensioactivos en sangre completa, permitiendo de ese modo extraer ácidos nucleicos eucariotas de los lisados sanguíneos. Ambos métodos están limitados por los complejos protocolos y las etapas de procesamiento oportunas, es decir, medio día antes de obtener ácidos nucleicos bacterianos purificados. Además, estos métodos muestran un límite de detección de 100 UFC/ml que todavía es considerablemente menor que la sensibilidad del método de hemocultivo 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 es cuestionable la relevancia de los métodos moleculares para detectar bacterias y hongos. De hecho, la detección de ADN circulante en sangre no se correlaciona necesariamente con los métodos de hemocultivo que detectan microorganismos viables. Para "mantener" dicha correlación, algunos enfoques proponen la identificación de los agentes infecciosos usando métodos basados en moléculas a partir de hemocultivos positivos. Sin embargo, la relevancia clínica de tales enfoques sigue siendo limitada porque todavía se requiere el método de cultivo prolongado. Esta cuestión es incluso de mayor importancia, ya que los métodos moleculares, en la inmensa mayoría de los casos, no proporcionan información sobre el espectro de sensibilidad antimicrobiano de la bacteria, basándose todavía este último en los enfoques de cultivo tradicionales.

Conociendo estas deficiencias, el desarrollo de nuevos métodos que permitan la detección e identificación rápida y confiable de microorganismos en la sangre sigue siendo una cuestión muy relevante. Además, la detección de agentes infecciosos en sangre presentada en el presente documento es un ejemplo típico para ilustrar la complejidad de los procedimientos de preparación de muestras y su gran importancia en bioensayos en general y en diagnósticos médicos en particular. Los ensayos para determinar la presencia de moléculas o partículas diana en una variedad de muestras, incluyendo muestras de alimentos, clínicas, ambientales y experimentales, son cada vez más importantes.

El documento EP 0 587 398 A1 divulga un método de ensayo de fibrinógeno en una muestra de ensayo usando un reactivo seco que comprende una proteína que tiene actividad de trombina, al menos un aditivo y partículas magnéticas.

El documento WO 94/28168 A1 divulga un método de realización de un ensayo cuantitativo de fibrinógeno que una química de reactivos secos en combinación con un campo magnético rotacional y que tiene una excelente correlación con el Fibrometer.

El documento WO 2007/089948 A2 describe un aparato para el suministro percutáneo de un sellante que comprende al menos dos depósitos de fluido.

Los documentos JP 2000 262499 A y JP 3 292760 B2 divulgan un tubo de recogida de sangre que acelera el tiempo de coagulación sanguínea e impide la precipitación de fibrina tras la centrifugación.

El documento FR 2 281 768 A1 divulga un tubo de recogida de sangre para contener fluidos biológicos tales como sangre y plasma.

El documento DE 38 03 463 A1 describe un método semicuantitativo para determinar la cantidad de calcio en una muestra de sangre.

5 Bosniak y Armstrong, 2004. *Biol Bull.* 207(2):172 divulga que el cangrejo cacerola americano puede utilizar la coagulación de sangre para inmovilizar microbios que invaden heridas para impedir su dispersión sistémica en el huésped.

10 El documento WO 2005/021799 A2 divulga un método para extraer patógenos infecciosos de una muestra que comprende las etapas de crear agregado de fibrina que confina los patógenos e introducir un reactivo de lisis de fibrina para exponer los patógenos para su análisis.

Sumario de la invención

15 La presente invención proporciona un dispositivo de recogida de muestras para separar agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y/o proteínas de una muestra que comprende: (i) un código de identificación; (ii) un recipiente de tipo tubo para contener la muestra; y (iii) una formulación de reactivos secos en el recipiente, pudiendo funcionar el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable los agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y/o proteínas tras la exposición de la muestra a trombina o una enzima similar a trombina dentro del dispositivo en presencia de fibrinógeno que es nativo para la muestra y/o añadido artificialmente, en el
20 que la formulación comprende trombina o una enzima similar a trombina, y la formulación comprende además fibrinógeno.

25 En las reivindicaciones también se definen aspectos adicionales de la invención. La divulgación en la siguiente descripción proporciona tanto información relacionada con contenido cubierto por las definiciones de las reivindicaciones como información adicional relacionada con contenido que no está cubierto por las reivindicaciones. En la siguiente divulgación, donde se hace referencia a realizaciones, tales realizaciones deben entenderse como realizaciones de la divulgación en general, mientras que el alcance de la invención se define en las reivindicaciones. La descripción de cualquier contenido no cubierto por las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

30 La solicitud divulga un método para la preparación y el procesamiento de muestras, dando como resultado una separación eficaz de moléculas o partículas diana de un medio líquido complejo circundante. Este método permitirá además recuperar dicha(s) diana(s) altamente concentrada(s) en un medio de tampón controlado, en un volumen que es preferiblemente al menos 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, la ventaja del método divulgado es la capacidad para alcanzar una tasa de concentración de 1/100 a 1/1000 del volumen de muestra inicial. La(s) diana(s) así concentrada(s) puede(n) procesarse después muy fácilmente a través de etapa(s) adicional(es) de purificación
35 y/o analizarse directamente usando metodologías del estado de la técnica.

40 El método de preparación de muestras divulgado está adaptado particularmente para usarse con diversas fuentes de muestra y un amplio espectro de tamaños de volumen. Además, la separación según la invención permite separar de manera específica o inespecífica la(s) partícula(s) o molécula(s) diana de volúmenes de muestra complejos usando selección por tamaño y/o afinidad.

45 Por consiguiente, esta solicitud divulga un método de preparación de muestras que presenta por tanto la ventaja de usarse universalmente para prácticamente cualquier tipo de muestra y diana.

50 Basándose en el método divulgado, esta solicitud divulga además un dispositivo de recogida de muestras que puede usarse muy fácilmente de forma manual o integrarse con sistemas automatizados del estado de la técnica que hacen que este método de preparación de muestras se integre por tanto fácilmente en los flujos de trabajo de laboratorio de rutina.

55 La base técnica del método de preparación de muestras divulgado se basa en la observación de los inventores sobre la posibilidad de separar eficazmente microorganismos diana, como partículas bacterianas o fúngicas, normalmente de muestras de sangre mediante la conversión, de manera controlada y normalizada, de fibrinógeno a fibrina a través de la coagulación controlada de la muestra de sangre usando la enzima de trombina para atrapar dichas partículas diana dentro de una red de fibrina que se retraerá rápidamente para formar un pequeño gránulo dentro del recipiente de sangre. A medida que se forma el gránulo, la muestra de sangre circundante puede decantarse, lo que lleva a la separación de las dianas atrapadas dentro de este pequeño gránulo. En una segunda etapa, el gránulo puede lisarse para recuperar las dianas de su trampa de fibrina dentro de un pequeño volumen de un tampón controlado. Mediante este procedimiento, el tamaño más pequeño del gránulo es un factor clave que es
60 necesario controlar, ya que determinará la tasa de concentración del método divulgado.

65 Por consiguiente, por muestra de sangre quiere decirse sangre completa, plasma rico en plaquetas y plasma o suero pobre en plaquetas. La sangre según la divulgación, también puede referirse obviamente a sustitutos de sangre o muestra compuesta artificialmente constituida por componentes sanguíneos, aditivos sanguíneos o cualquier otro componente que imite las funciones sanguíneas. Los ejemplos típicos de tales componentes sanguíneos y que habitualmente se usan en transfusiones de sangre incluyen concentrados de plaquetas, concentrados 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 como muestras de septicemia, muestras de sangre compuestas o sustitutos sanguíneos, esta deficiencia puede compensarse añadiendo factores de coagulación, incluyendo fibrinógeno, a dicha muestra de sangre como componente obligatorio para poder separar partículas o moléculas diana según la invención.

Aunque la solicitud divulga preferiblemente un método de separación de microorganismos o moléculas o partículas infecciosas de una muestra de sangre, un experto en la técnica reconoce que la muestra de sangre en el presente documento también puede referirse a una muestra compuesta que incluye constituyentes sanguíneos que entran en el proceso de coagulación controlada tal como se describió anteriormente.

Por consiguiente, en general, la solicitud divulga por tanto un método de separación y concentración de partículas o moléculas diana de muestras que contienen proteínas de fibrinógeno atrapando, en una primera etapa, dichas moléculas o partículas diana en una red de fibrina convirtiendo al menos parcialmente el fibrinógeno contenido en dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina. En una segunda etapa, la red de fibrina así formada forma un coágulo de fibrina que se separará del medio de muestra circundante.

En una realización, la separación según la divulgación se obtiene mediante selección por tamaño atrapando dicha partícula diana. En este procedimiento de atrapamiento, el tamaño del poro de la red de fibrina es por tanto particularmente crítico. Un tamaño de poro más pequeño conducirá de hecho a un atrapamiento más eficaz de microorganismos infecciosos pequeños como *E. coli* (2 μm) o *Chlamydia* (0,3 μm) o incluso virus. A este respecto, el control de la red de fibrina de atrapamiento puede realizarse ajustando parámetros como el pH y la fuerza iónica de la muestra y las concentraciones de calcio, fibrinógeno y trombina dentro de dicha muestra.

En una realización, la separación según la divulgación se obtiene mediante atrapamiento por afinidad de dicha partícula diana en la red de fibrina. La observación de los inventores es que partículas bacterianas como *Staphylococcus aureus* tienen una fuerte afinidad por moléculas de fibrinógeno/fibrina, lo que además facilita (potencia) su separación y concentración según el método de la invención. Al imitar la interacción de afinidad de las partículas bacterianas, la invención divulga el uso de interacciones de afinidad nativas así como inducidas para separar dianas de muestras contenidas en fibrinógeno.

La separación por afinidad inducida según una realización preferida de la divulgación se realiza con proteína(s) recombinante(s) de fibrinógeno compuesta(s) por proteína(s) de fusión de fibrinógeno que comprende(n) un dominio de resto de captura dirigido contra dichas moléculas o partículas diana. En otra realización, el atrapamiento químico se garantiza mediante un resto de unión a fibrina/fibrinógeno como una proteína de unión a fibrinógeno de *Staphylococcus aureus* y un resto de captura de sustancias como un anticuerpo dirigido contra dichas moléculas o partículas diana.

Por consiguiente, puede emplearse atrapamiento por tamaño dentro de la red de fibrina así como reacciones de unión por afinidad específica para la determinación o el aislamiento de un amplio intervalo de sustancias diana en muestras biológicas. Los ejemplos de sustancias diana son células, componentes celulares, subpoblaciones celulares (tanto eucariotas como procariontas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácido nucleico y similares.

El fibrinógeno, tal como se hace referencia en el presente documento, puede ser por tanto un fibrinógeno natural obtenido de cualquier fuente de sangre como por ejemplo sangre humana o sangre de vertebrados en general. El fibrinógeno según la invención puede ser también una molécula compuesta sintética obtenida combinando fibrinógeno natural con cualquier otra molécula de manera que se obtenga una nueva molécula con una nueva funcionalidad de afinidad, por ejemplo. En una realización preferida, la molécula así combinada se obtiene mediante una unión covalente de una molécula de fibrinógeno con otra molécula. En otra realización, la molécula así combinada es una proteína de fusión producida mediante técnicas de síntesis recombinante de proteínas del estado de la técnica.

El fibrinógeno tal como se hace referencia en el presente documento también puede ser una molécula de fibrinógeno sintetizada modificada que tendrá toda la estructura cristalina del fibrinógeno. En una realización preferida, la molécula de fibrinógeno sintetizada es una molécula modificada que tendrá una estructura, tamaño, composición y actividades de afinidad diferentes. Más particularmente, es deseable que el fibrinógeno según la invención sea una molécula de estructura simplificada (en lugar de la molécula natural de fibrinógeno grande y compleja) que todavía exprese la actividad de escisión (polimerización) por trombina y que pueda tener una reacción de unión por afinidad definida a la(s) partícula(s) o molécula(s) diana.

La solicitud divulga por tanto el uso de fibrinógeno o proteínas modificadas de fibrinógeno como vehículo para atrapar o capturar partícula(s) o molécula(s) diana. Tras la exposición de dicho fibrinógeno o proteínas modificadas de fibrinógeno a trombina las moléculas de fibrinógeno se escinden y se transforman en fibrina. Las partículas de fibrina se autopolimerizarán después para formar un pequeño coágulo en el que las dianas quedan atrapadas dando

5 como resultado por tanto la separación de la diana del volumen del líquido de muestra. El método propuesto presenta una gran ventaja cuando se compara con las técnicas del estado de la técnica, como las partículas magnéticas, por ejemplo, o cualquier otra tecnología basada en "superficie sólida". Puesto que se produce a nivel molecular, la reacción entre las dianas y el vehículo de fibrinógeno es muy rápida y eficaz y se eliminarán los problemas de unión no específica inherentes al ensayo basado en superficie.

10 Basándose en esto y en un uso particular, la presente solicitud divulga un método que permite proporcionar una solución de separación y concentración eficaces de microorganismos intactos de una muestra de sangre infectada. Un objetivo alcanzable de esto es la separación de cantidades diminutas de microorganismos de grandes volúmenes de sangre, lo que permite su concentración después en un pequeño volumen de tampón compatible con etapas de procesamiento adicionales. Otro objetivo alcanzable de esta invención es la separación de microorganismos intactos de una muestra de sangre que pueden detectarse y analizarse posteriormente mediante técnicas específicas reconocidas en la técnica. Al lograrse, en cambio, este método abre muchas posibilidades en la detección y el diagnóstico rápidos y eficaces de infecciones del torrente circulatorio usando métodos de cultivo rápidos así como ensayos de tipo molecular rápidos y más sensibles.

15 Por tanto, queda claro a partir de la descripción anterior que el fibrinógeno según la divulgación puede ser nativo para la muestra (es decir, muestras de sangre completa) o puede añadirse artificialmente a dicha muestra.

20 Basándose en esto y en un uso particular, la presente solicitud divulga un método para separar molécula(s) o partícula(s) diana de una muestra compuesta, que comprende las etapas de:

(a) Añadir fibrinógeno a dicha muestra.

25 (b) Atrapar dichas moléculas o partículas diana en una red de fibrina convirtiendo el fibrinógeno añadido en dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina.

(c) Retraer dicha red de fibrina para formar un coágulo de fibrina.

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

Una muestra compuesta según la invención puede incluir, muestras de sangre, derivados sanguíneos o componentes sanguíneos, pero también puede referirse a cualquier muestra libre de fibrinógeno como por ejemplo, pero sin limitarse a, muestras clínicas (como orina, esputo y frotis), de alimentos y ambientales.

35 Por consiguiente, la invención divulga además un dispositivo de recogida de muestras para separar moléculas o partículas diana 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, pudiendo funcionar el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas diana tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a trombina dentro de dicho dispositivo.

40 El dispositivo según la divulgación puede ser un depósito o tubo de reacción convencional diseñado para alojar una muestra de fluido que es necesario examinar después para determinar la existencia de partícula(s) o molécula(s) diana como por ejemplo para partícula(s) patógenas (bacterias, virus, etc.) o molécula(s) diana (ADN, ARN o proteínas, etc.). El dispositivo de la divulgación incluirá además formulaciones de reactivo estables que conducirán a la formación del coágulo de fibrina y a la separación de dianas tal como se describió anteriormente en el presente documento. Preferiblemente, el dispositivo incluye una zona de reacción que contiene sus formulaciones de reactivo estables almacenadas que incluyen factores de coagulación, como moléculas de fibrinógeno y agentes que promueven la coagulación como enzimas de trombina. Un dispositivo de este tipo permitirá el aislamiento y la detección cuantitativos de dianas como agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y proteínas en un kit de prueba, con un número de copias extremadamente bajo de cualquier muestra biológica compleja. El hecho de que el dispositivo divulgado permita recoger la muestra y al mismo tiempo separar y concentrar eficazmente partículas o moléculas diana de dicha muestra simplificará considerablemente las etapas de procesamiento de la muestra necesarias y dará como resultado además una reducción de los potenciales riesgos de infección y riesgos de contaminación.

50 Por consiguiente, un aspecto principal de la invención se refiere a un dispositivo de recogida de muestras para separar moléculas o partículas diana de una muestra

60 En las reivindicaciones dependientes se exponen realizaciones diferentes. El contenido de las reivindicaciones y todas las combinaciones reivindicadas se incorpora como referencia en esta descripción y sigue siendo parte de la divulgación aunque se abandonen las reivindicaciones.

65

Breve descripción de los dibujos

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

10 La figura 1 es una representación esquemática del proceso de coagulación (Ref. <http://en.wikipedia.org/wiki/Coagulation>) y que muestra la conversión de fibrinógeno en fibrina que puede usarse para lograr el objetivo principal de la invención.

La figura 2 es una representación esquemática del mecanismo de atrapamiento de molécula(s) o partícula(s) (2) diana en una red (3) de fibrina tras la exposición de una muestra que contiene fibrinógeno (1) a trombina.

15 La figura 3 es una representación esquemática de diferentes realizaciones para atrapar por afinidad molécula(s) o partícula(s) diana en una red de fibrina tras la exposición de una muestra que contiene fibrinógeno a trombina: (a) afinidad nativa de las dianas (2) que tienen un resto (4) de unión a fibrinógeno/fibrina (1); (b) captura por afinidad a través de una captura (5) de sustancias dirigida contra dicha(s) diana(s) (2) y que tiene un resto (4) de unión a fibrina/fibrinógeno (1); (c) captura por afinidad a través de una proteína de fusión de fibrinógeno (1) con un dominio (7) de resto de captura dirigido contra la(s) diana(s) (1).

20 La figura 4 es una representación esquemática de una variación del atrapamiento por afinidad de la figura 3 (b), en la que la captura por afinidad se realiza a través de captura (5) de sustancias dirigida contra dicha(s) diana(s) (2) y que tiene un resto (4') de unión a fibrina (3). En una realización preferida, la afinidad del resto (4') hacia fibrina se transformará en una forma (4) activa solo tras la etapa de exposición de la muestra a trombina.

25 Figura 5 es una representación esquemática de un procesamiento de ensayo completo desde la separación de la diana hasta la detección y en el que la(s) diana(s) (2) dentro de una muestra que contiene fibrinógeno (1) se expone(n) a una captura (5) de sustancias que comprende el resto (4) de unión a fibrina/fibrinógeno y a un marcaje (8) de sustancias que comprende un marcador (9) de detección. Tras la exposición a trombina, el complejo "diana(s)/captura de sustancias/marcaje de sustancias" se separará dentro de un coágulo de fibrina retraído. La detección de la diana se realizará directamente en el concentrado de coágulo.

30 La figura 6 es una representación esquemática del funcionamiento de un dispositivo de recogida de muestras; según la invención, el dispositivo se hace funcionar para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas diana tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a trombina dentro de dicho dispositivo.

Descripción detallada de la invención

40 Según una realización de la presente divulgación, un método para separar moléculas o partículas diana de una muestra de sangre comprende:

45 (a) Atrapar dichas moléculas o partículas diana en una red de fibrina convirtiendo al menos parcialmente el fibrinógeno contenido en dicha muestra en fibrina para formar la red de fibrina;

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

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

Por consiguiente, mediante muestra de sangre se hace referencia a sangre completa, plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas. La muestra de sangre también puede hacer referencia a suero donde, en este estado, debe añadirse fibrinógeno a dicha muestra para permitir que funcione el mecanismo de separación según la invención. La sangre según la divulgación, también puede hacer referencia obviamente a sustitutos de sangre o muestras compuestas artificialmente constituidas por componentes sanguíneos, aditivos sanguíneos o cualquier otro componente que imite las funciones sanguíneas. Los ejemplos típicos de tales componentes sanguíneos y que habitualmente se usan en transfusiones de sangre incluyen concentrados de plaquetas, concentrados 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 fibrinógenos) como, por ejemplo en algunos casos clínicos como muestras de septicemia, muestras compuestas de sangre o sustitutos sanguíneos, esta deficiencia puede compensarse añadiendo factores de coagulación, incluyendo fibrinógeno, a dicha muestra de sangre como componente obligatorio para poder separar partículas o moléculas diana según la invención.

65 Al mismo tiempo, la muestra de sangre según la divulgación también puede hacer referencia por tanto a una muestra de sangre compuesta artificialmente obtenida combinando una muestra de sangre con una muestra

deficiente en fibrinógeno. Una muestra deficiente en fibrinógeno de este tipo puede incluir muestras de cualquier fuente, tales como por ejemplo muestras biológicas, clínicas, de alimentos y ambientales. Más particularmente, la expresión muestra de sangre según la divulgación engloba una muestra de sangre compuesta artificialmente combinando factores de coagulación que incluyen al menos fibrinógenos con una muestra deficiente en fibrinógeno.

“Red de fibrina” tal como se usa en general en el presente documento se refiere al producto de un proceso en el que el fibrinógeno se escinde tras la exposición a enzima de trombina y se convierte en fibrina. Una vez que el fibrinógeno se convierte en fibrina, se produce una etapa de autopolimerización en la que los monómeros de fibrina se unen entre sí y forman una red polimérica tridimensional reticulada de forma no covalente. Además, en presencia del factor de coagulación XIII, la red de fibrina se reticulará mediante el factor XIIIa, una transglutaminasa activada mediante trombina del factor XIII. Existen otras transglutaminasas y también pueden estar implicadas en la reticulación covalente y el injerto a la red de fibrina.

“Formación y retracción de coágulo”, tal como se usa en general en el presente documento, significa el arrastre observado de la matriz de fibrina para formar un coágulo tras un tiempo determinado. En determinadas condiciones, el tamaño de este coágulo puede reducirse a lo largo del tiempo (es decir, retracción de coágulo) retirando agua del coágulo. Naturalmente, la retracción de coágulo se induce por la liberación de múltiples factores de coagulación de las plaquetas activadas atrapadas en la malla de fibrina del coágulo.

Para la formación de la red de fibrina, las concentraciones de la disolución de fibrinógeno y/o las disoluciones de trombina tienen un efecto significativo sobre la densidad de la red formada, la formación de coágulos, la reticulación y la velocidad de la matriz de fibrina final. Normalmente, 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, controlar 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 con respecto a fibrinógeno proporciona a las matrices de fibrina una red menos densa que es más adecuada para capturar dianas. Además, la proporción de la cantidad de trombina con respecto a fibrinógeno proporciona un coágulo de fibrina retraído con un tamaño más pequeño que permite alcanzar una alta tasa de concentración de las partículas o moléculas diana independientes.

El mecanismo subyacente de la 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 diana. 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 fibrinógenos como factores de coagulación clave son críticos en la formación de la red de atrapamiento de fibrina y, por consiguiente, en la creación y separación de coágulos según la divulgación. De hecho, una alta concentración de trombina y fibrinógenos conduce a una red de fibrina muy densa y un gran tamaño de coágulo que no es deseable. Sin embargo, el hallazgo es que las concentraciones más bajas de trombina y fibrinógeno conducen a la formación de una red de fibrina relajada que se retrae rápidamente para dar una pequeña formación de gránulos en el recipiente o receptáculo de muestra. Durante esta retracción, la red de fibrina atrapa las partículas o moléculas diana del volumen de la muestra, conduciendo así a su concentración y separación de dicha muestra.

Para alcanzar los efectos deseados al atrapar y separar eficazmente las partículas o moléculas diana de una muestra que contiene fibrinógeno, la concentración de dicho fibrinógeno en la muestra es preferiblemente de al menos 0-1 $\mu\text{g/ml}$. En una realización preferida, la concentración del fibrinógeno en la muestra es de entre 10 mg/ml y 10 $\mu\text{g/ml}$. También puede usarse una concentración más alta, que supere incluso los intervalos mencionados en el presente documento, pero que dé como resultado una densidad de matriz de fibrina más alta y un tamaño de coágulo retraído. En el caso de separar partículas diana usando selección por tamaño o atrapamiento por tamaño, el uso de una concentración relativamente alta de fibrinógeno es particularmente adecuado. Cuanto más pequeño es el tamaño de la(s) partícula(s) diana, mayor es la concentración de fibrinógeno solicitada. Sin embargo, la desventaja de usar concentraciones más altas de fibrinógeno es la formación de un tamaño de coágulo más grande, lo que da como resultado una tasa de concentración más baja de la(s) partícula(s) diana. Por tanto, en la práctica y en el caso de una selección por tamaño o atrapamiento por tamaño, la concentración de fibrinógeno debe optimizarse de manera que alcance la máxima eficacia de captura y al mismo tiempo un tamaño de coágulo más bajo.

A partir de la descripción anterior se entenderá que el fibrinógeno según la divulgación puede ser nativo para la muestra (es decir, muestras de sangre) o añadido artificialmente a dicha muestra. En una realización preferida, se añadirá fibrinógeno a una muestra aunque dicha muestra tenga fibrinógeno nativo, como es el caso de la sangre completa, por ejemplo. Esto será ventajoso, por ejemplo, para compensar cualquier deficiencia o variación de fibrinógeno en la concentración del fibrinógeno nativo que pueda producirse en tales muestras. En otra realización preferida, el fibrinógeno añadido a una muestra de sangre (aunque la concentración de fibrinógeno nativo sea la concentración deseada) se originará a partir de una fuente de sangre de una especie diferente a la de la muestra en consideración. Por ejemplo, si se usa una muestra de sangre completa humana, según esta realización, puede añadirse un fibrinógeno originado a partir de otro vertebrado como un animal bovino, ovino, zarigüeya o pollo a dicha muestra humana. Usando el hecho de que la reacción de fibrinógeno/trombina puede ser específica de especie, un efecto deseado al usar una fuente diferente de fibrinógeno como aditivo para una muestra con fibrinógeno nativo es

usar específicamente el fibrinógeno añadido (preferiblemente activado con la trombina de la especie relacionada) para lograr la separación de la diana a la vez que se evita (se minimiza) la interferencia del fibrinógeno nativo en el proceso de separación. Esto puede ser particularmente ventajoso ya que permitirá un control más eficaz del proceso de separación de la(s) diana(s) y evitará depender de las variaciones de fibrinógeno nativo. A mismo tiempo, en otra realización, el fibrinógeno añadido será una proteína de fibrinógeno recombinante diseñada específicamente para que no pueda escindirse por la trombina endógena de la muestra de sangre en uso.

El efecto deseado de atrapar y separar eficazmente las partículas o moléculas diana de una muestra que contiene fibrinógeno puede lograrse por consiguiente sometiendo dicha muestra a trombina o enzimas similares a trombina. A este respecto, dicha trombina puede ser una trombina exógena (añadida artificialmente a dicha muestra) o una trombina endógena (ya parte de dicha muestra) o enzimas similares a trombina. Por consiguiente, la trombina puede estar en forma activa o generarse a través de la activación de factores de coagulación como el factor X tal como se muestra en la figura 1. El origen de esta trombina y/o factores de coagulación puede ser de fuentes humanas, animales o de insectos. Por consiguiente, mediante enzimas similares a trombina se hace referencia a la familia de las serina proteasas obtenidas de fuentes sanguíneas externas y que tienen la capacidad de convertir el fibrinógeno en fibrina. Dichas enzimas se conocen bien en la técnica y habitualmente se obtienen a partir de veneno de serpiente o se producen de forma recombinante.

En una realización preferida, la concentración de trombina es de 0,01 a 10 UI/ml y preferiblemente dentro del intervalo de 0,1 a 2 UI/ml de muestra. En la práctica, la cantidad de la trombina o enzima similar a trombina debe ajustarse más bien en correspondencia con la concentración de fibrinógeno dentro del dispositivo para obtener la estructura de red de fibrina y el tamaño de coágulo deseados. A este respecto, la cantidad de trombina es preferiblemente de menos de 20 UI de trombina por mg de fibrinógeno, preferiblemente en un intervalo de entre 0,01 y 10 UI de trombina por mg de fibrinógeno, más preferiblemente de entre 0,1 y 1 UI de trombina por mg de fibrinógeno.

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, también puede ajustarse la concentración de calcio. En la práctica, esto puede lograrse añadiendo una fuente de iones de calcio a la muestra de prueba. 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 las muestras de sangre, por ejemplo, el calcio está presente de manera natural y el ajuste de la concentración de calcio puede lograrse añadiendo adicionalmente agentes quelantes de calcio seleccionados de los grupos de GDTA, EDTA y citrato.

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 método puede implicar la etapa de añadir el factor de coagulación XIII a dicha muestra. El factor de coagulación XIII es una enzima capaz de catalizar la formación de reticulación de la matriz de fibrina después de haberse activado por trombina. Esto ayudará adicionalmente a estabilizar la estructura de la red de fibrina, acelerar la retracción del coágulo y contribuir a evaluar la porosidad de la fibrina. Tal factor XIII en sus formatos inactivo o activo (XIIIa) puede añadirse o ajustarse junto con el aditivo de fibrinógeno en un intervalo de concentración de entre 0,5 y 100 UI por ml de volumen de muestra, más preferiblemente entre 1 y 60 UI por ml de volumen de muestra, y lo más preferiblemente entre 1 y 10 UI por ml de volumen de muestra.

De la descripción anterior se deduce que el principal objetivo que puede alcanzarse a partir del método según la divulgación es concentrar eficazmente la(s) partícula(s) o molécula(s) diana de la muestra de prueba. El factor o tasa de concentración se determina en la práctica por el tamaño de coágulo. Por tanto, en una realización preferida, el tamaño del coágulo formado es de al menos 1/3 del tamaño de muestra inicial y preferiblemente el tamaño del coágulo es de menos de un 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, en una realización preferida según la invención, el coágulo se retrae para formar adicionalmente un gránulo pequeño con un tamaño que puede alcanzar valores que están entre 1/50 y 1/1000 del volumen de muestra inicial.

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

Por consiguiente, la presente solicitud divulga un método para separar molécula(s) o partícula(s) diana de una muestra que contiene fibrinógeno que incluye la etapa de someter dicha muestra a células de plaquetas activadas o lisados de células de plaquetas. En una realización preferida, dichas células de plaquetas activadas o lisado de células de plaquetas pueden estar presentes de manera nativa en dicha muestra o añadirse artificialmente a dicha muestra. La activación de plaquetas se logra preferiblemente mediante ADP a una concentración de 1 mM a 1 μM y preferiblemente entre 100 μM y 10 μM .

Para lograr una mayor tasa de retracción, en una realización preferida, las partículas magnéticas atrapadas en la red de fibrina pueden usarse como medio de retracción para comprimir y, por tanto, reducir el tamaño de coágulo. De hecho, en la práctica, se usarán partículas magnéticas para emular el papel que la plaqueta desempeña de manera natural en la retracción del coágulo de fibrina. Esta retracción puede lograrse sometiendo partículas magnéticas atrapadas dentro de un coágulo de fibrina a una fuerza magnética externa. Por consiguiente, dichas partículas magnéticas quedan atrapadas dentro del coágulo de fibrina debido a su mayor tamaño en comparación con la porosidad de la red de fibrina. En una realización preferida, las partículas magnéticas quedan atrapadas dentro del coágulo de fibrina mediante la interacción de afinidad que dichas partículas pueden tener con fibrinógeno/fibrina. Esto puede lograrse usando partículas magnéticas recubiertas con un resto de unión a fibrinógeno/fibrinógeno que puede seleccionarse de grupos de trombina, factor de coagulación XIII, proteínas de unión a fibrinógeno bacteriano y activador de plasminógeno tisular (t-PA).

Para concentrar adicionalmente moléculas o partículas diana, la invención divulga además el uso de atrapamiento por afinidad para capturar dichas dianas dentro de la red de fibrina. Las ventajas de usar atrapamiento por afinidad son dobles: (1) capturar dianas pequeñas que son difíciles o no pueden capturarse mediante atrapamiento por tamaño dentro de la red de fibrina; (2) permitir un alto nivel de concentración (es decir, un coágulo muy pequeño o más bien un gránulo) de las dianas, ya que con el atrapamiento por afinidad se requiere una menor concentración de fibrinógeno para lograr un rendimiento de captura eficaz. De hecho, con el atrapamiento por afinidad puede esperarse alcanzar una tasa de concentración que sea menor de 1/50 del volumen de muestra inicial y preferiblemente de 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 de menos de 1/1000 del volumen de muestra inicial.

Tal como se ilustra en la figura 3 (a), en una primera realización preferida, el atrapamiento por afinidad puede lograrse mediante la afinidad nativa de las dianas (2) que tienen un resto (4) de unión al fibrinógeno/fibrina (1). Un ejemplo típico de tal atrapamiento por afinidad es la captura del *Staphylococcus aureus* que se sabe que tiene una afinidad eficaz por fibrinógeno/fibrina a través de su factor A de aglutinación de proteínas de unión al fibrinógeno de superficie (ClfA). De manera más general y tal como se describe exhaustivamente en la solicitud de patente internacional WO2011/007.004, los estafilococos, los estreptococos y los enterococos portan proteínas denominadas adhesinas que pueden mediar la infección al unirse a proteínas incluyendo el fibrinógeno. En el caso de la sangre, otra ventaja del método según la divulgación es el uso de la afinidad nativa de las células sanguíneas para precipitar adicionalmente células de leucocitos y trombocitos dentro del pequeño gránulo de fibrina a la vez que los eritrocitos se mantienen sustancialmente en suspensión. Esto es particularmente importante porque los microorganismos no siempre flotan libremente en la muestra de sangre, sino que en más bien están asociados o secuestrados en los leucocitos y los trombocitos. En el caso de *Staphylococcus aureus* por ejemplo, la interacción y, posteriormente, el secuestro y la supervivencia bacteriana en las plaquetas contribuyen a la virulencia, ya que permite que las bacterias escapen de las defensas del huésped. También puede usarse captura por afinidad nativa para capturar moléculas pequeñas como ácidos nucleicos que se unen fuertemente a la fibrina debido a la interacción de la carga eléctrica. En cuanto a las partículas bacterianas, la afinidad nativa puede ampliarse a pequeñas moléculas de proteínas tan pronto como dichas moléculas tengan una afinidad de interacción directa con el fibrinógeno/fibrina.

En una realización preferida, el procedimiento de separación por afinidad nativa puede adaptarse usando fibrinógenos de diferentes especies. Por ejemplo, el uso de fibrinógenos de oveja en lugar de fibrinógeno humano reducirá la tasa de captura de *Staphylococcus aureus*. Esto se debe al hecho de que el fibrinógeno de oveja muestra una baja afinidad de unión a la bacteria *Staphylococcus aureus*. En el mismo sentido, el fibrinógeno en uso dentro de la muestra puede ser un fibrinógeno recombinante o modificado diseñado para potenciar o inhibir la captura por afinidad nativa de fibrinógenos a dianas o grupos diana definidos.

Una segunda realización de captura por afinidad se ilustra en la figura 3(b). Por consiguiente, la afinidad se realiza usando una captura (5) de sustancias dirigida contra dicha(s) diana(s) (2) y que tiene a su vez un resto (4) de unión a fibrina/fibrinógeno (1). Se prefiere el uso de una captura de sustancias como medio intermedio para etiquetar las dianas en el caso en que la diana no tenga una afinidad nativa por fibrinógeno/fibrina. Un ejemplo típico de esto es la captura de especies Gram positivas que en la mayoría de los casos carecen de afinidad nativa por fibrinógeno/fibrina. Esto puede realizarse, por ejemplo, usando un anticuerpo específico frente a Gram negativas que tenga un resto de unión a fibrinógeno. Además, la captura por afinidad indirecta puede ampliarse prácticamente a cualquier partícula o molécula diana que puede incluir, pero sin limitarse a, células diana, componentes celulares, subpoblaciones celulares (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácido nucleico y similares. Para lograr esto, el resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas diana se selecciona del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente dichas moléculas o partículas diana. Además, dicho resto de captura de sustancias puede acoplarse o combinarse con un resto de unión a fibrina/fibrinógeno seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas de unión a fibrinógeno bacteriano, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo. En una realización preferida, dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dicho resto de captura de sustancias están unidos covalentemente.

Una tercera realización de captura por afinidad se ilustra en la figura 3(c). Por consiguiente, la afinidad se realiza usando la proteína de fusión de fibrinógeno (1) con un dominio (7) de resto de captura dirigido contra la(s) diana(s) (1). El uso 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. Desde este punto de vista, la molécula de fibrinógeno puede obtenerse a medida o diseñarse específicamente para capturar específicamente y luego separar un grupo o grupos específicos de dianas. Además, la proteína recombinante o modificada de fibrinógeno puede diseñarse para evitar la(s) interacción/interacciones nativa(s) y/o potenciar la interacción específica con 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 recuperar las moléculas o partículas diana unidas de la red de fibrina durante una etapa de lisis, tal como se describirá más adelante. En una realización preferida, el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática o hidrolítica. En la realización más preferida, el sitio de degradación es un sitio de degradación enzimática, que se escinde por una enzima seleccionada del grupo que consiste en plasmina y metaloproteinasa de la matriz.

En una realización preferida y tal como se ilustra en la figura 4, la captura por afinidad se realiza a través de una captura (5) de sustancias dirigida contra dicha(s) diana(s) (2) y que tiene un resto (4') de unión a fibrina (3) específico sin ninguna afinidad por los fibrinógenos, como el uso del activador de plasminógeno de tipo tisular como un resto de unión a fibrina. En una realización preferida, la afinidad del resto (4') por la fibrina se transformará en una forma (4) activa solo después de la etapa de exposición de la muestra a trombina, como en el caso del uso del factor XIII como resto de unión a fibrina.

En uso, esta divulgación no solo implica un método para separar y concentrar moléculas o partículas diana, sino que también puede incluir la etapa de detectar dichas dianas tal como se ilustra en la figura 5. A este respecto, el procesamiento del ensayo incluye la etapa de captura y separación de dianas dentro de un coágulo de fibrina, seguido por la detección de dichas dianas directamente dentro del concentrado de coágulo. Esto puede lograrse, por ejemplo, exponiendo la muestra que contiene fibrinógeno (1) a una captura (5) de sustancia que comprende un resto (4) de unión a fibrina/fibrinógeno y un marcaje (8) de sustancia que comprende un marcador (9) de detección. Esto conduce a la formación de un complejo "diana(s)/captura de sustancias/marcaje de sustancias". Tras la exposición a una trombina, el complejo "diana(s)/captura de sustancias/marcaje de sustancias" se separará dentro de un coágulo (3) de fibrina retraído. La detección de la diana se realizará directamente en el concentrado de coágulo exponiendo por ejemplo el coágulo de fibrina a una fuente (10) de excitación de marcador (8), lo que da como resultado una emisión de una señal (11) de detección. En general, la metodología de detección dependerá del marcador usado y para eso pueden adoptarse metodologías de detección bien conocidas tales como fluorescencia, luminiscencia, SERS (espectroscopía Raman de superficie mejorada) y espectroscopía Raman.

Después de la formación del gránulo y la separación de la diana, en una realización preferida, el gránulo o coágulo de fibrina puede suspenderse en una solución tamponada controlada seguido por la alteración (es decir, la lisis) del coágulo para recuperar la(s) diana(s) separadas(s) del coágulo de fibrina. Un ejemplo típico de un tampón controlado es un tampón hipotónico, un tampón que contiene detergentes en combinación con fibrinolíticos como plasmina y/o agentes proteolíticos como la proteinasa K, la pronasa y la metaloproteinasa. Dicha etapa de lisis puede mejorarse añadiendo adicionalmente potenciadores de lisis de coágulos como el plasminógeno o el activador de plasminógeno. En una realización preferida, la etapa de lisis puede incluir además el uso de enzimas de degradación de ácido nucleico.

Para la implementación práctica de la invención, un segundo aspecto de la divulgación se refiere a un dispositivo de recogida de muestras para separar moléculas o partículas diana de una muestra que comprende: (i) un código de identificación; (ii) un recipiente para contener dicha muestra que puede estar en forma de un tubo que recibirá dicha muestra; y (iii) una muestra que contiene fibrinógeno en el recipiente, pudiendo funcionar el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas diana tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a trombina dentro de dicho dispositivo.

Por consiguiente, el volumen de dicho recipiente de muestra es de entre 0,1 y 100 ml y preferiblemente entre 0,1 y 10 ml. La concentración de dicho fibrinógeno en la muestra es preferiblemente de al menos 0,1 µg/ml. En una realización preferida, la concentración del fibrinógeno en la muestra es de entre 0,1 y 100 mg/ml y lo más preferiblemente entre 10 mg/ml y 10 µg/ml.

Por consiguiente, dicho dispositivo incluye además como aditivo, una trombina o enzima de trombina. A este respecto, la concentración de trombina es de 0,01 a 10 UI/ml y preferiblemente dentro del intervalo de 0,1 a 2 UI/ml de muestra. En la práctica, la cantidad de la trombina o enzima similar a trombina debe ajustarse más bien en correspondencia con la concentración de fibrinógeno dentro del dispositivo para obtener una estructura de red de fibrina y tamaño de coágulo deseados. A este respecto, la cantidad de trombina es preferiblemente de menos de 20 UI de trombina por mg de fibrinógeno, preferiblemente en un intervalo de entre 0,01 y 10 UI de trombina por mg de fibrinógeno, más preferiblemente de entre 0,1 y 1 UI de trombina por mg de fibrinógeno.

En el caso de muestras de sangre como sangre completa, por ejemplo, el dispositivo de recogida de muestras según la invención incluye 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 en polvo o fibrosos 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 la trombina derivadas de venenos de serpiente, y polifenoles que pueden activar los factores de coagulación de la sangre para promover la coagulación. Además, estos agentes promotores de la coagulación pueden añadirse, por ejemplo, individualmente o en combinación a la muestra o recubrirse dentro de la pared del recipiente de muestra. Debe ajustarse la cantidad y el proceso de dichos agentes promotores de trombina endógena de manera que se controle el proceso de coagulación y se obtenga un tamaño de coágulo de fibrina pequeño.

Además, el dispositivo según la invención 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 aditivo, partículas magnéticas. En una realización preferida, dichas partículas magnéticas dentro del dispositivo están recubiertas con un resto de unión de fibrinógeno/fibrina seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas de unión a fibrinógeno bacteriano, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo. En una realización preferida, dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dichas partículas magnéticas están unidos covalentemente.

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 de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas diana. Por consiguiente, dicho resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas diana puede seleccionarse del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente dichas moléculas o partículas diana. Además, dicho resto de captura de sustancias puede acoplarse o combinarse con un resto de unión de fibrina/fibrinógeno seleccionado del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas de unión a fibrinógeno bacteriano, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo. En una realización preferida, dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dicho resto de captura de sustancias están unidos covalentemente.

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

En la práctica, todos los aditivos descritos anteriormente pueden añadirse a la muestra tras la recogida de la muestra o pueden estar ya integrados dentro del dispositivo. En este último caso, los aditivos pueden integrarse solubilizados en una disolución tampón acuosa. Preferiblemente, dicho tampón comprende agua, cloruro de calcio, preferiblemente a una concentración de 40 mM, y cloruro de sodio, preferiblemente a una concentración de 75 mM, y tiene preferiblemente a pH de 7,3. En una realización preferida, dichos aditivos pueden incluirse dentro del dispositivo en un formato liofilizado que puede solubilizarse justo antes del uso del dispositivo tras la introducción de la muestra dentro del dispositivo.

El dispositivo así divulgado para la recogida de la muestra conducirá en funcionamiento a la formación de un pequeño coágulo de fibrina en el que quedan atrapadas partículas o moléculas diana. El factor o tasa de concentración se determina en la práctica por el tamaño de coágulo. Por tanto, la composición y el diseño del dispositivo son de manera que darán como resultado la formación de un coágulo con un tamaño que es de al menos 1/3 del tamaño de muestra inicial y preferiblemente el tamaño del coágulo es de al menos 1/10 del volumen de muestra inicial. Además, en una realización preferida según la divulgación, el coágulo se retrae para formar adicionalmente un gránulo pequeño 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 según la invención puede usarse para separar y concentrar moléculas o partículas diana que pueden seleccionarse de grupos que comprenden células diana, componentes celulares, subpoblaciones celulares (tanto eucariotas como procariotas), bacterias, virus, parásitos, antígenos, anticuerpos específicos, toxinas, proteínas, secuencias de ácido nucleico y similares.

El dispositivo de recogida de muestras según la invención puede usarse para separar y concentrar moléculas o partículas diana de diversas muestras tal como ya se ha definido. En general, esto incluye sangre completa, derivados sanguíneos, componentes sanguíneos, muestras compuestas con aditivos de factores de coagulación. A

este respecto, la muestra en el presente documento puede referirse a cualquier tipo de muestra que sea necesario someter a prueba, incluyendo muestras de alimentos, clínicas, ambientales y experimentales.

5 En la práctica, el código de identificación dentro del dispositivo puede ser por ejemplo una barra de código, color, tamaño y forma del dispositivo. Tal código de identificación puede usarse como referencia o indicador del uso y la aplicación deseados del dispositivo. De hecho, los dispositivos según la invención pueden diferenciarse según su composición, el tipo de muestra para el que usará el dispositivo y/o la(s) diana(s) que tiene(n) que separarse.

10 La figura 6 muestra un ejemplo de un procesamiento de muestra usando un dispositivo según la invención. El dispositivo puede ser un tubo de reacción convencional con una tapa de cierre y un código de identificación. El dispositivo está diseñado para recibir una muestra de fluido que es necesario examinar posteriormente para determinar la existencia de partícula(s) o molécula(s) diana como, por ejemplo, partícula(s) patógena(s) (bacterias, virus, etc.) o molécula(s) diana (ADN, ARN o proteínas, etc.). El dispositivo de la invención incluirá además formulaciones de reactivo estables que conducirán a la formación del coágulo de fibrina y a la separación de dianas.

15 Tras la recogida de la muestra dentro del dispositivo, las moléculas de fibrinógeno reaccionarán en primer lugar con las dianas dentro del tubo. En una segunda etapa, el fibrinógeno se transformará en una fibrina, lo que conduce a una polimerización y el atrapamiento de dichas dianas en la red de fibrina. La red de fibrina, en una tercera etapa, se retraerá para formar un gránulo pequeño dentro del recipiente de sangre. Cuando se forme el gránulo, la muestra circundante se decantará, lo que conducirá a la separación de las dianas atrapadas dentro de este gránulo pequeño.

20 En una etapa final, el gránulo puede lisarse para recuperar las dianas de su trampa de fibrina dentro de un pequeño volumen de un tampón controlado. Aunque la etapa de atrapamiento de dianas/formación de gránulos se realizará en un tubo cerrado durante el transporte de la muestra, por ejemplo, la separación y la lisis de los gránulos pueden realizarse fácilmente utilizando un sistema automatizado de manipulación de líquidos del estado de la técnica. Con este procedimiento, el dispositivo divulgado permitirá recoger la muestra y al mismo tiempo separar y concentrar eficazmente las partículas o moléculas diana de dicha muestra, simplificando considerablemente las etapas de procesamiento necesarias de la muestra y reduciendo adicionalmente los potenciales riesgos de infección y riesgos de contaminación.

30 Ejemplo 1. Captura de la bacteria *Staphylococcus aureus* (SA) de una muestra de componentes sanguíneos: Muestra de plasma rico en plaquetas (PRP). En una muestra de 500 µl de PRP citratado se realizan adiciones conocidas de 100 UFC de una bacteria de SA. Mediante la adición de 5 µl de trombina a una concentración de 10 UI/ml e incubación, se formó un gránulo pequeño (10 - 20 µl de tamaño). La lisis del gránulo así formado usando 100 µl de tampón de lisis (saponina al 0,01%, Tween al 0,05% y Triton X al 0,05%) y 5 µl de proteinasa K (10 UI/ml) conduce a una recuperación de entre el 90 - 100% de la bacteria de SA de la que se realizaron inicialmente adiciones conocidas en el tampón de lisis.

40 Ejemplo 2. Captura de la bacteria *Staphylococcus aureus* (SA) de una muestra de componentes sanguíneos: Muestra de plasma pobre en plaquetas (PPP). En una muestra de 500 µl de PPP citratado se realizan adiciones conocidas de 100 UFC de una bacteria de SA y se procesa usando el mismo protocolo que el del ejemplo 1. Se obtendrá el mismo rendimiento de recuperación. Sin embargo, el tamaño del coágulo de fibrina es mayor cuando se compara con el caso del PRP. Esta diferencia se debe a la baja retracción del coágulo de fibrina en el caso de la muestra de PPP. Esta retracción se garantiza en cambio por las células de plaquetas presentes dentro de la muestra de PRP.

45 Ejemplo 3. Captura de la bacteria *Staphylococcus aureus* (SA) de una muestra de componentes sanguíneos: Muestra de suero. En una muestra de 500 µl de suero citratado se realizan adiciones conocidas de 100 UFC de una bacteria de SA y se procesa usando el mismo protocolo que el del ejemplo 1. En este caso no se formará coágulo/grano debido a la falta de fibrinógeno dentro de la muestra de suero. Mediante la adición de 1,25 mg de fibrinógeno humano a la muestra se suero, se podrá formar el coágulo de fibrina y de ese modo separar la bacteria de SA de la muestra de suero.

Ejemplo 4. Captura de bacterias Gram positivas y hongos de sangre completa. Recuperación de 4 ml sangre completa con adiciones conocidas de 100 UFC de los microorganismos:

Cepa/especie de microorganismos	Rendimiento
<i>S. pyogenes</i> M57	85%
<i>C. albicans</i>	92%
MRSE	83%
<i>E. faecalis</i>	70%

55 Ejemplo 5. Captura específica de bacteria de una muestra compuesta. En 1 ml de una muestra de PBS compuesto se realizan adiciones conocidas de *Staphylococcus aureus* (SA) (1000 UFC/ml) o *Citrobacter freundii* (18000 UFC/ml) a diferentes concentraciones de fibrinógeno dentro de la muestra:

60

Fibrinógeno (mg/ml)	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,08
Volumen de gránulos (tasa de concentración)	~200 μ l (1/5)					→ < 1 μ l (1/1000)
Rendimiento 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 reducirá el tamaño del gránulo (es decir, la tasa de concentración) y también el tamaño de porosidad de la red de fibrina. En tales condiciones, la tasa de captura de SA todavía es muy eficaz, mientras que la tasa de captura de *C. freundii* se reducirá considerablemente. Esta diferencia en la eficacia de captura se debe al hecho de que la bacteria SA tiene una fuerte afinidad nativa con el fibrinógeno (a través de su proteína de superficie ClfA) mientras que *C. freundii* carece de tal afinidad.

Ejemplo 6. Captura específica de bacteria de una muestra compuesta. Las mismas condiciones que para el ejemplo 5 usando *C. freundii* dentro de 1 ml de PBS compuesto como muestra con la modificación de que se añade adicionalmente a la muestra un anticuerpo dirigido contra la proteína de superficie lípido A de Gram negativas marcada con una proteína ClfA de estafilococos. En estas condiciones y tal como se muestra en la figura 3(b), el anticuerpo se unirá a *C. freundii* permitiendo su unión eficaz al fibrinógeno y, posteriormente, su separación eficaz (rendimiento de casi el 100%) dentro de un gránulo de fibrina.

Los expertos en la técnica apreciarán que pueden configurarse diversas adaptaciones y modificaciones de las realizaciones preferidas que acaban de describirse sin apartarse de la divulgación. Por tanto, ha de entenderse 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.

La presente divulgación se refiere además a los siguientes puntos:

1. Un método para separar moléculas o partículas diana de una muestra que contiene fibrinógeno, que comprende:

a. Atrapar dichas moléculas o partículas diana en una red de fibrina convirtiendo al menos parcialmente el fibrinógeno contenido en 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 del medio de muestra circundante.

2. Un método según el punto 1, en el que la concentración del fibrinógeno dentro de dicha muestra es de al menos 1 μ g/ml.

3. Un método según el punto 2, en el que la concentración de fibrinógeno dentro de dicha muestra es de al menos 10 μ g/ml.

4. Un método según el punto 1, en el que la etapa (a) incluye someter la muestra a trombina o enzimas similares a trombina.

5. Un método según el punto 4, en el que dicha trombina incluye trombina o enzimas similares a trombina exógenas.

6. Un método según el punto 4, en el que dicha trombina incluye enzima de trombina endógena.

7. Un método según el punto 5, en el que la concentración de dicha trombina exógena es de entre 0,01 y 10 UI por mililitro de muestra.

8. Un método según el punto 1, en el que la muestra contiene además el factor de coagulación XIII.

9. Un método según el punto 1, en el que la muestra contiene además calcio.

10. Un método según el punto 1, en el que la muestra contiene además agentes quelantes seleccionados del grupo de GDTA, EDTA y citrato.

11. Un método según el punto 1, en el que el volumen de coágulo es como máximo 1/3 del volumen de muestra inicial.

12. Un método según el punto 1, en el que el coágulo formado en la etapa (b) se retrae adicionalmente hasta un gránulo pequeño con un tamaño de menos de 1/10 del volumen de muestra inicial.

13. Un método según el punto 12, en el que la etapa de retracción se logra usando células de plaquetas activadas o lisado de células de plaquetas activadas dentro de dicha muestra.
- 5 14. Un método según el punto 13, en el que las plaquetas se activan con agonistas de plaquetas seleccionados del grupo de adenosina difosfato y colágeno.
15. Un método según el punto 13, en el que la etapa de retracción se realiza usando partículas magnéticas atrapadas dentro de dicha red de fibrina y sometidas a un campo magnético.
- 10 16. Un método según el punto 15, en el que las partículas magnéticas están recubiertas con un resto de unión de fibrinógeno/fibrina.
17. Un método según los puntos 1 y 7, en el que la concentración de la trombina exógena es de entre 0,01 y 1 UI por mililitro de dicha muestra.
- 15 18. Un método según el punto 1 que incluye además la etapa de lisar dicho coágulo de fibrina para recuperar dichas moléculas o partículas diana.
- 20 19. Un método según el punto 18, en el que la etapa de lisar dicho coágulo se realiza usando agentes fibrinolíticos.
20. Un método según el punto 18, en el que dicha etapa de lisis usa componentes seleccionados del grupo que consiste en citólisis, proteasas y enzimas de degradación de ácido nucleico.
- 25 21. Un método según el punto 18, en el que dicha etapa de lisis incluye el uso de detergentes.
22. Un método según el punto 1, en el que dicha muestra es una muestra de sangre.
- 30 23. Un método según el punto 22, en el que dicha muestra de sangre se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, plasma rico en plaquetas, plasma pobre en plaquetas y suero.
- 35 24. Un método según el punto 22, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de sangre compuesta artificialmente obtenida combinando una muestra de sangre con una muestra deficiente en fibrinógeno.
25. Un método según el punto 22, en el que dicha muestra de sangre es una muestra de sangre compuesta artificialmente obtenida combinando factores de coagulación con una muestra deficiente en fibrinógeno.
- 40 26. Un método según el punto 25, en el que dichos factores de coagulación son fibrinógeno.
27. Un método según el punto 1, en el que la separación en la etapa c) se obtiene por atrapamiento de selección por tamaño de dicha partícula o molécula diana dentro de la red de fibrina que tiene un tamaño de poro de entre 10 nm y 100 μm .
- 45 28. Un método según el punto 1, en el que la separación en la etapa c) se obtiene por atrapamiento por afinidad de dicha partícula diana en la red de fibrina.
29. Un método según el punto 28, en el que el atrapamiento químico se realiza mediante una afinidad nativa de dichas moléculas o partículas diana por fibrinógeno o fibrina.
- 50 30. Un método según el punto 28, en el que dicho fibrinógeno es/son una(s) proteína(s) recombinante(s).
31. Un método según el punto 28, en el que el atrapamiento químico comprende una molécula compuesta a partir de: (i) un resto de unión a fibrina/fibrinógeno y (ii) un resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas diana.
- 55 32. Un método según el punto 30, en el que dicha proteína recombinante es una proteína de fusión de fibrinógeno con un dominio de resto de captura dirigido contra dichas moléculas o partículas diana.
- 60 33. Un método según el punto 31, en el que un resto de unión a fibrina/fibrinógeno se selecciona del grupo que comprende trombina, fibronectina, proteínas de unión a fibrinógeno bacteriano, activador de plasminógeno de tipo tisular, integrinas y restos derivados de cualquier miembro de este grupo.
34. Un método según el punto 31, en el que un resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas diana se selecciona del grupo que comprende anticuerpos, ácidos nucleicos y aptámeros diseñados para reconocer específicamente dichas moléculas o partículas diana.
- 65

35. El método según los puntos 33 y 34, en el que dicho resto de unión a fibrina/fibrinógeno y dicho resto de captura de sustancias están unidos covalentemente.
- 5 36. Un dispositivo de recogida de muestras para separar moléculas o partículas diana 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, pudiendo funcionar el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable dichas moléculas o partículas diana tras la exposición de dicha muestra a trombina o una enzima similar a trombina dentro de dicho dispositivo.
- 10 37. Un dispositivo según el punto 36, en el que el volumen de dicho recipiente de muestra es de entre 0,1 y 20 ml.
38. Un dispositivo según el punto 36, en el que la concentración de fibrinógeno dentro de dicha muestra es de entre 0,1 y 100 mg/ml.
- 15 39. Un dispositivo según el punto 36, en el que dicha trombina o enzima de trombina se incluye inicialmente dentro de dicho dispositivo.
40. Un dispositivo según el punto 36, en el que dicha trombina o enzima de trombina se añade al dispositivo tras la recogida de la muestra.
- 20 41. Un dispositivo según el punto 36, que incluye además aditivos seleccionados del grupo de calcio, agentes quelantes; células de plaquetas activadas o lisado de células de plaquetas activadas y factor XIII.
42. Un dispositivo según el punto 36, que incluye además partículas magnéticas.
- 25 43. Un dispositivo según el punto 42, en el que las partículas magnéticas están recubiertas con un resto de unión de fibrinógeno/fibrina.
44. Un dispositivo según el punto 43, que comprende además moléculas que tienen: (I) resto de unión a fibrina/fibrinógeno y (II) un resto de captura de sustancias dirigido contra dichas moléculas o partículas diana.
- 30 45. Un dispositivo según el punto 36, en el que el fibrinógeno en la muestra es recombinante.
46. Un dispositivo según el punto 45, en el que el fibrinógeno en la muestra es una proteína de fusión de fibrinógeno con un dominio de resto de captura dirigido contra dichas moléculas o partículas diana.
- 35 47. Un método según cualquiera de los puntos 1-35 o un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 36-46, en el que dichas moléculas o partículas diana comprenden bacterias, virus, levaduras, proteínas, péptidos y/o ácidos nucleicos.
- 40 48. Un método para usar el dispositivo según cualquiera de los puntos 36-47 que comprende:
- 45 a. proporcionar un dispositivo de reacción del punto 36, en el que el dispositivo comprende una formulación de reactivos secos;
- 46 b. añadir una muestra biológica que comprende partículas o moléculas diana a dicho dispositivo,
- 47 c. incubar la muestra biológica en condiciones que permitan la formación de un coágulo de fibrina dentro del dispositivo,
- 50 d. retirar el líquido de muestra del dispositivo,
- e. lisar el coágulo de fibrina y liberar las partículas o moléculas diana.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Dispositivo de recogida de muestras para separar agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y/o proteínas de una muestra que comprende: (i) un código de identificación; (ii) un recipiente de tipo tubo para contener la muestra; y (iii) una formulación de reactivos secos en el recipiente, pudiendo funcionar el dispositivo para formar un coágulo de fibrina que atrapa de manera separable los agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y/o proteínas tras la exposición de la muestra a trombina o una enzima similar a trombina dentro del dispositivo en presencia de fibrinógeno que es nativo para la muestra y/o añadido artificialmente, en el que la formulación comprende trombina o una enzima similar a trombina, y la formulación comprende además fibrinógeno.
- 10
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la cantidad de trombina es de entre 0,01 y 10 UI de trombina por mg de fibrinógeno.
- 15 3. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que el volumen del recipiente de muestra es de entre 0,1 y 20 ml.
4. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la trombina o enzima similar a trombina y/o el fibrinógeno se incluye dentro del dispositivo en un formato liofilizado.
- 20 5. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la formulación de reactivos secos incluye además aditivos seleccionados del grupo de calcio, agentes quelantes, células de plaquetas activadas o lisado de células de plaquetas activadas y factor XIII.
- 25 6. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la formulación de reactivos secos incluye además partículas magnéticas.
7. Dispositivo según la reivindicación 6, en el que las partículas magnéticas están recubiertas con un resto de unión de fibrinógeno/fibrina.
- 30 8. Dispositivo según la reivindicación 7, en el que la formulación de reactivos secos comprende además moléculas que tienen: (I) resto de unión a fibrina/fibrinógeno y (II) un dominio de resto de captura dirigido contra agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y/o proteínas.
- 35 9. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fibrinógeno es recombinante.
- 40 10. Dispositivo según la reivindicación 9, en el que el fibrinógeno es una proteína de fusión de fibrinógeno con un dominio de resto de captura dirigido contra agentes infecciosos, toxinas, ácidos nucleicos y y/o proteínas.

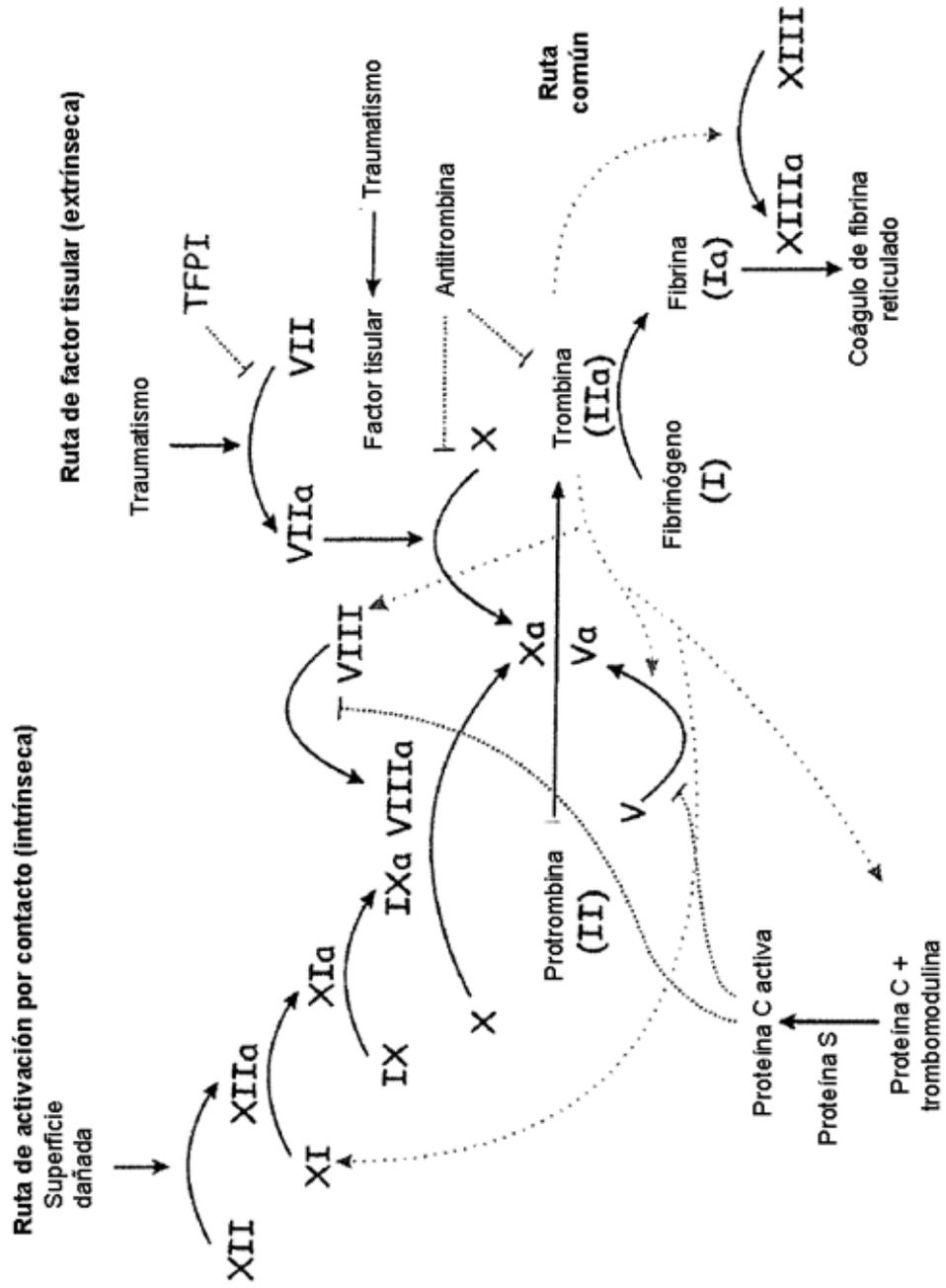


Figura 1

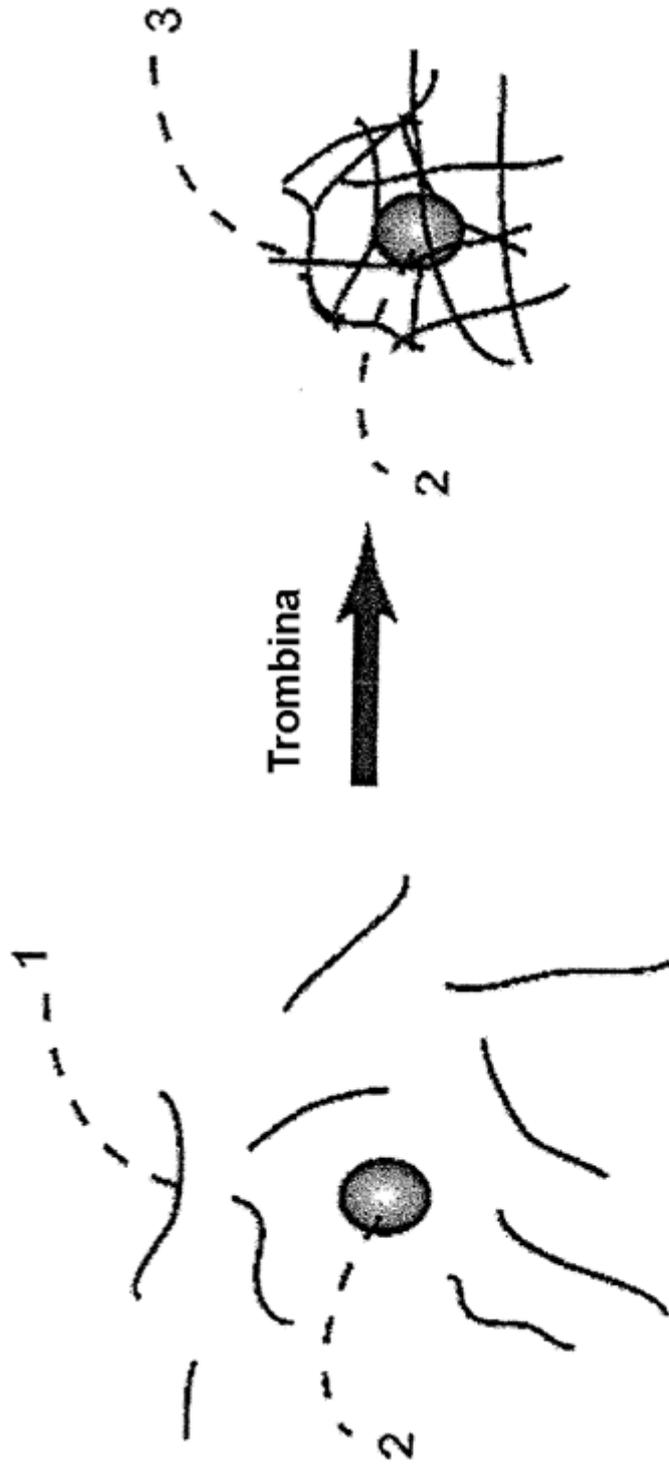


Figura 2

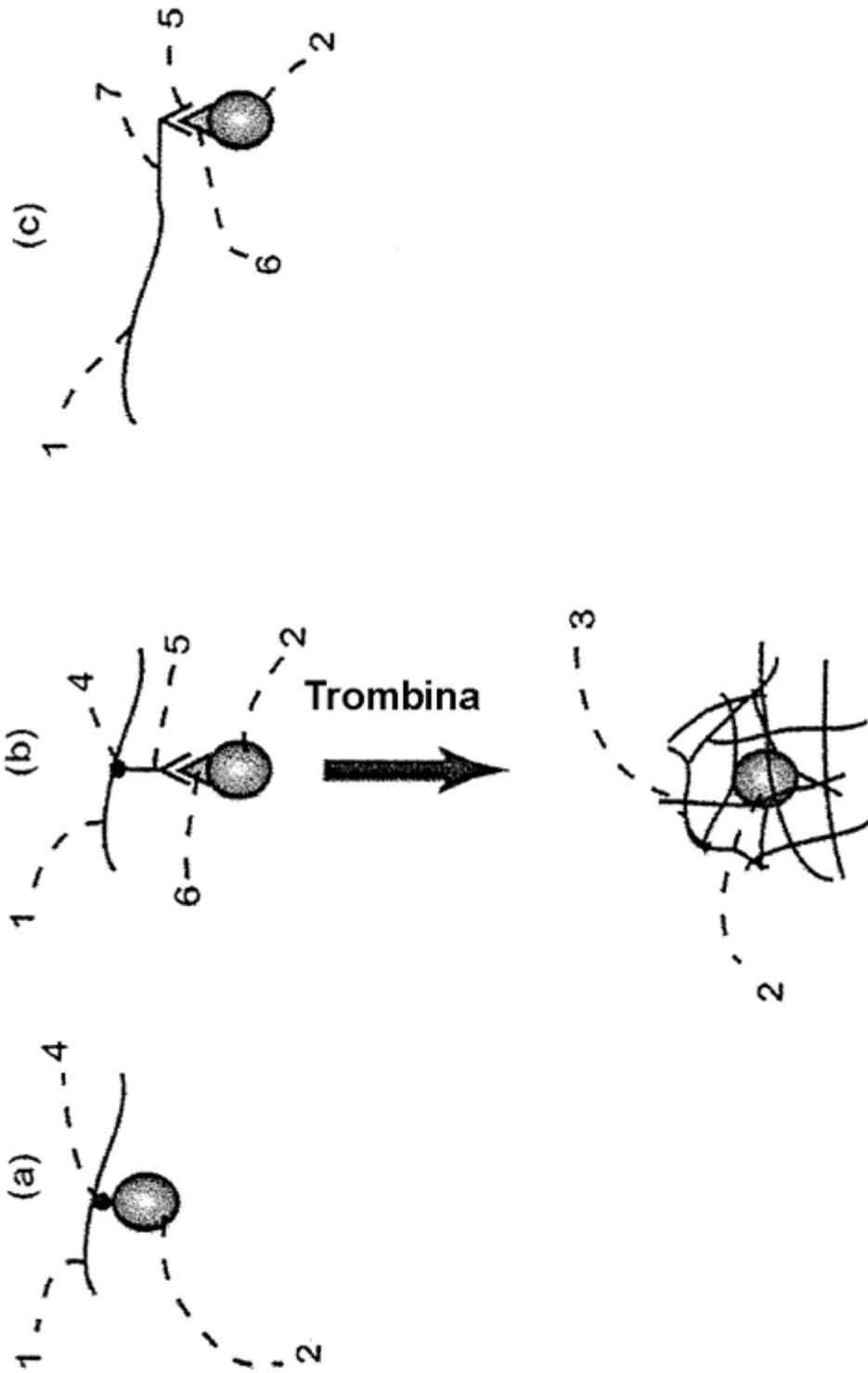


Figura 3

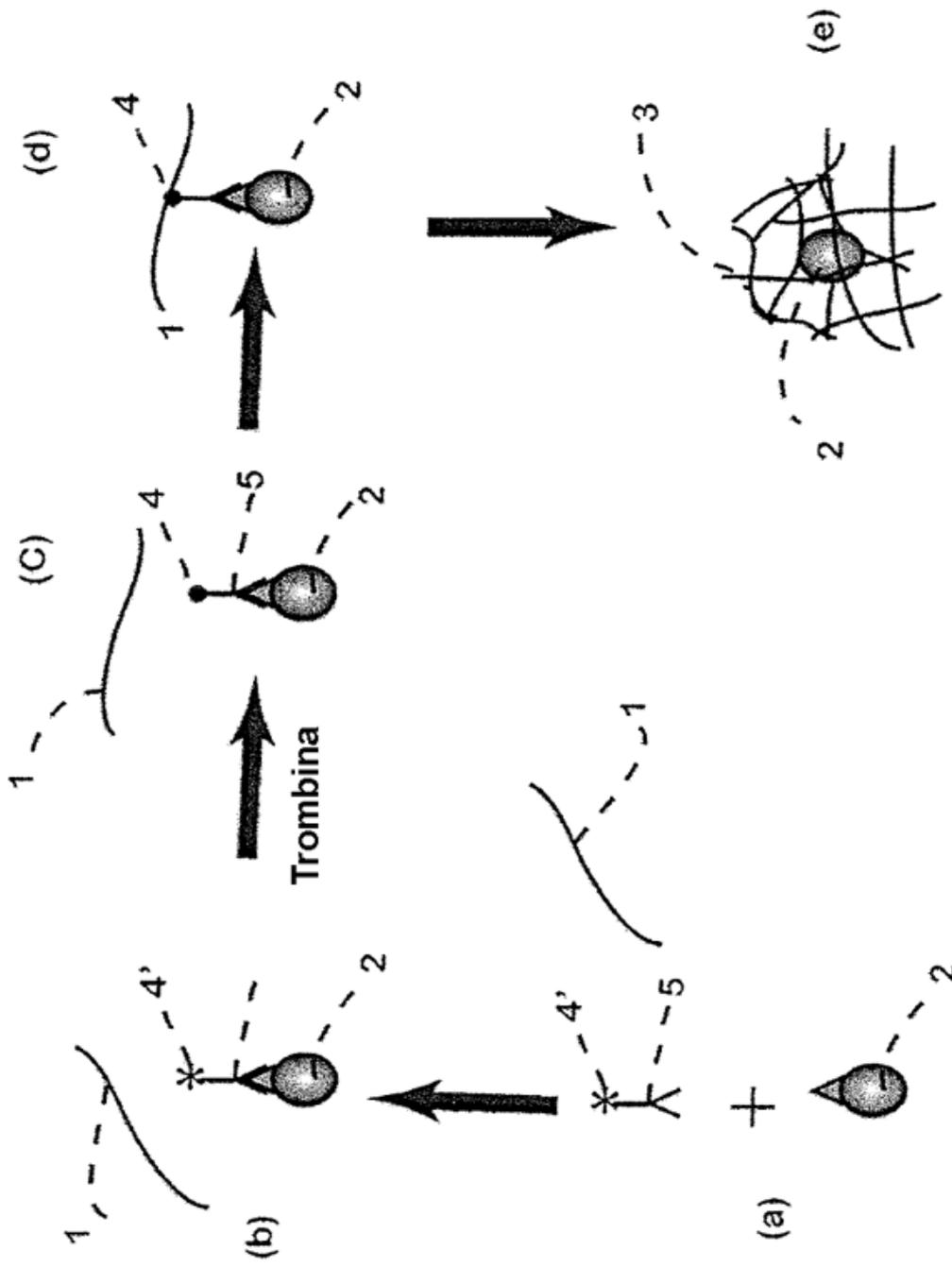


Figura 4

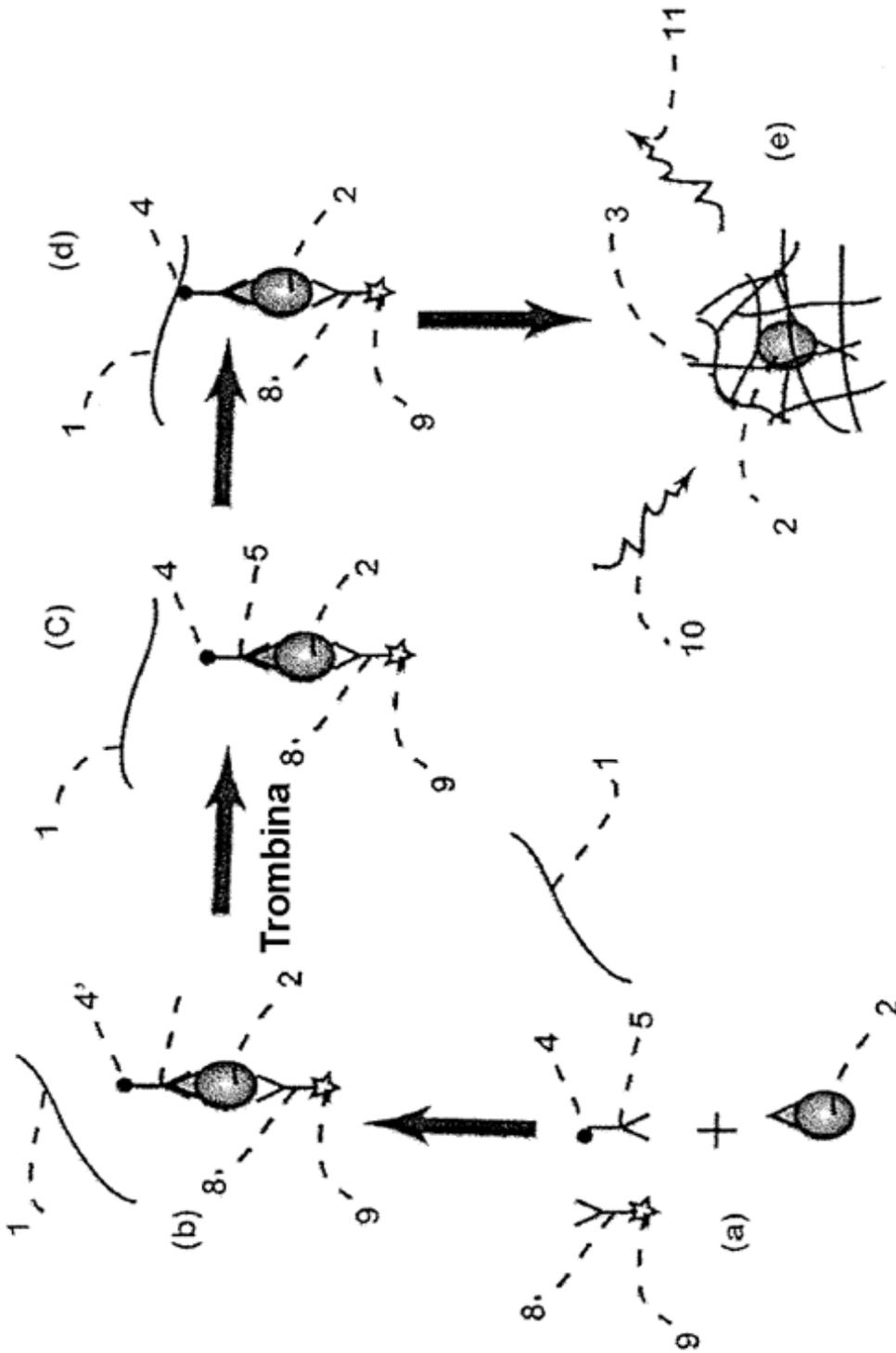


Figura 5

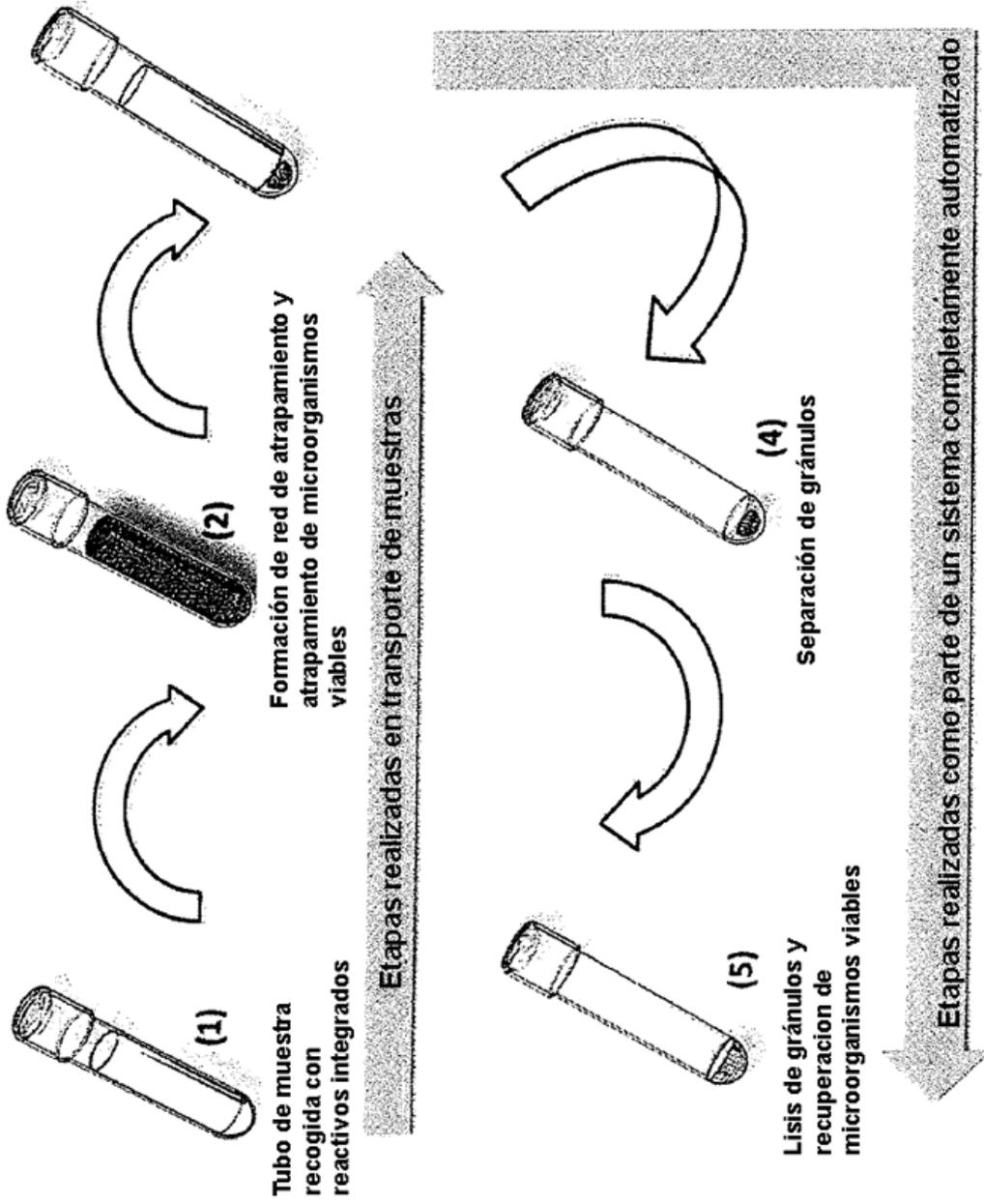


Figura 6