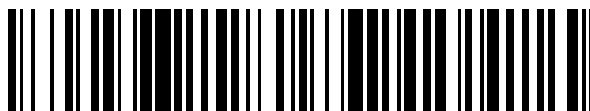


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 393**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/553 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2011 E 16190239 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 3138927**

54 Título: **Analito objetivo de separación que usa campos magnéticos alternativos**

30 Prioridad:

21.04.2010 US 326588 P
12.08.2010 US 855147

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.07.2020

73 Titular/es:

DNAE GROUP HOLDINGS LIMITED (100.0%)
Ugli Campus, Block C, Centre House, 56 Wood Lane, London W12 7SB , GB

72 Inventor/es:

DRYGA, SERGEY A;
ESCH, VICTOR C;
SAUL, RICHARD G y
MCDOWELL, ANDREW F

74 Agente/Representante:

SÁNCHEZ SILVA, Jesús Eladio

ES 2 774 393 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

Analito objetivo de separación que usa campos magnéticos alternativos

5 Campo de la invención

La divulgación generalmente se refiere al uso de partículas magnéticas y campos magnéticos alternos para separar un analito objetivo de una muestra.

10 Antecedentes

Muchos procedimientos de laboratorio y clínicos emplean reacciones de afinidad bioespecíficas. Tales reacciones se utilizan comúnmente en pruebas de diagnóstico de muestras biológicas, o para la separación de una amplia gama de sustancias objetivo, especialmente entidades biológicas tales como células, virus, proteínas, ácidos nucleicos y similares. Hay varios métodos disponibles para analizar o separar las sustancias objetivo mencionadas anteriormente en base a la formación compleja entre la sustancia de interés y otra sustancia a la que se une específicamente el objetivo. La separación de los complejos del material no unido puede lograrse gravitacionalmente, por ejemplo, mediante sedimentación o, alternativamente, mediante centrifugación de partículas finamente divididas o microesferas acopladas a la sustancia objetivo. Si se desea, tales partículas o microesferas pueden hacerse magnéticas para facilitar la etapa de separación límite/libre. Las partículas magnéticas son bien conocidas en la técnica, al igual que su uso en reacciones inmunes y otras reacciones de afinidad bioespecíficas. Véase, por ejemplo, Whitehead y otros (US 4,554,088) y Hunter y otros (Immunoassays for Clinical Chemistry, pp. 147-162, eds., Churchill Livingstone, Edinborough, 1983). Generalmente, cualquier material que facilite la separación magnética o gravitacional puede emplearse para este propósito. Más recientemente, la superioridad de los imanes para realizar tales separaciones ha llevado a su uso en muchas aplicaciones.

Un problema con los protocolos de separación magnética es que las microesferas magnéticas deben agregarse en exceso a una muestra para garantizar una cantidad suficiente de unión de microesferas a un analito objetivo en la muestra, lo que produce de esta manera una muestra que contiene un porcentaje muy alto de partículas magnéticas que no se unen a los analitos objetivo, así como también a entidades objetivo no específicas. Las entidades objetivo no específicas pueden, por ejemplo, unirse a una eficiencia mucho menor, por ejemplo, el 1% del área superficial, mientras que un objetivo de interés puede cargarse al 50 % o casi el 100 % del área superficial disponible o sitios antigénicos disponibles. Sin embargo, incluso 1 % de carga puede ser suficiente para impartir la fuerza necesaria para atrapar en una celda de flujo de gradiente magnético o cámara de muestra.

La presencia de partículas magnéticas que no se unen a los analitos objetivo y entidades objetivo no específicas en la superficie que incluye los complejos objetivo/de partículas magnéticas interfieren con la capacidad de separar con éxito el objetivo de interés de los componentes restantes de la mezcla y las partículas magnéticas no unidas. La captura magnética de la mezcla resultante, y el contacto cercano de partículas magnéticas entre sí y los objetivos marcados, dan como resultado la formación de agregado que es difícil de dispensar y que puede ser resistente o inadecuado para las etapas de procesamiento o análisis posteriores.

Existe la necesidad de métodos para separar los analitos objetivo de una muestra.

45 Resumen

La presente divulgación generalmente se refiere al uso de partículas magnéticas que tienen un resto de unión específica al objetivo y campos magnéticos alternos para separar un analito objetivo de una muestra. Los métodos de la invención permiten la captura rápida (menos de 1 hr) y eficiente de analitos objetivo de una muestra al tiempo que eliminan la unión no específica y reducen el ruido de fondo resultante del exceso de partículas magnéticas no unidas a los analitos objetivo. Los métodos de la invención implican poner en contacto una muestra con partículas magnéticas que incluyen los primeros restos específicos para un analito objetivo, lo que forma de esta manera complejos objetivo/partículas en la muestra, hacer fluir la muestra a través de un canal que incluye los segundos restos a al menos una superficie del canal, aplicar campos magnéticos alternos a la muestra que fluye para dar como resultado que los complejos objetivo/partícula se acerquen a la superficie para unir los segundos restos y las partículas no unidas que permanecen libres en la muestra, unir los complejos objetivo/partículas a los segundos restos y eliminar las partículas no unidas y analitos no unidos de la muestra. Una ventaja particular de los métodos de la invención es la captura y el aislamiento de bacterias y hongos directamente de muestras de sangre a bajas concentraciones que están presentes en muestras clínicas (tan bajas como 1 UFC/ml de bacteria en una muestra de sangre).

En ciertas formas de realización, las partículas magnéticas libres y los complejos objetivo/partícula interactúan numerosas veces con la superficie del canal de flujo. Los objetivos se unen debido a la interacción específica entre el analito objetivo y la segunda en la superficie del canal de flujo, y las partículas magnéticas libres no se unen, y por lo tanto continúan fluyendo a través del canal de flujo.

Los métodos de la invención pueden implicar además eluir los complejos objetivo/partícula unidos de los segundos restos en la superficie del canal. Los métodos de la invención pueden implicar además analizar los complejos objetivo/partícula

5 eluidos. El objetivo puede analizarse por una multitud de tecnologías existentes, tal como RMN en miniatura, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), marcado fluorescente y visualización mediante observación microscópica, hibridación fluorescente *in situ* (FISH), pruebas de sensibilidad a los antibióticos basadas en el crecimiento y una variedad de otros métodos que pueden realizarse con objetivo purificado sin contaminación significativa de otros componentes de la muestra. En las formas de realización particulares, el análisis implica hacer fluir los complejos objetivo/partícula en un instrumento de RMN.

10 El analito objetivo se refiere al objetivo que se capturará y aislará por los métodos de la invención. El objetivo puede ser una bacteria, un hongo, una proteína, un ácido nucleico, un receptor, un ligando, una célula, un virus o cualquier molécula conocida en la técnica. En una forma de realización particular, el objetivo es una bacteria.

15 Los métodos de la invención no dependen y no están limitados por el tipo de muestra. Cualquier muestra que incluya un objetivo detectable puede usarse con los métodos de la invención. La muestra puede ser una muestra biológica (por ejemplo, un tejido humano o fluido corporal), una muestra agrícola o una muestra ambiental (por ejemplo, una muestra de agua o suelo). En ciertas formas de realización, la muestra es una muestra de sangre.

20 El primer y segundo restos de unión específica al objetivo dependerán del objetivo a capturar. Los restos pueden ser cualquiera de los restos de captura conocidas en la técnica, tal como un anticuerpo, un aptámero, un fago, un ácido nucleico, una proteína, un receptor o un ligando. En las formas de realización particulares, los restos de unión específica al objetivo son anticuerpos. En ciertas formas de realización, los anticuerpos son específicos para las bacterias. En otras formas de realización, los anticuerpos son específicos para hongos o virus. En ciertas formas de realización, el primer y segundo restos son iguales. En las formas de realización alternativas, el primer y segundo restos son diferentes.

25 La generación de campos magnéticos alternos puede lograrse mediante cualquier método conocido en la técnica. En ciertas formas de realización, los campos magnéticos alternos resultan del canal que se posiciona entre el primer y el segundo conjunto de imanes, en los que el canal permanece estacionario y el primer y segundo conjuntos de imanes se mueven para alternar cerca del canal, lo que produce de esta manera los campos magnéticos alternos. En otras formas de realización, los campos magnéticos alternos resultan del canal que se posiciona entre el primer y el segundo conjuntos de imanes, en el que el primer y el segundo conjuntos de imanes permanecen estacionarios y el canal se mueve para alternar su proximidad al primer y segundo conjuntos de imanes, lo que produce de esta manera los campos magnéticos alternos.

30 Otro aspecto de la invención proporciona métodos para detectar un analito objetivo en una muestra que incluye poner en contacto una muestra con partículas magnéticas que incluyen los primeros restos específicos para un analito objetivo, lo que forma de esta manera complejos objetivo/partícula en la muestra, hacer fluir la muestra a través de un canal que incluye los segundos restos unidas a al menos una superficie del canal, aplicar campos magnéticos alternos a la muestra que fluye para dar como resultado que los complejos objetivo/partícula se acerquen a la superficie del canal para unir los segundos restos y las partículas no unidas que permanecen libres en la muestra, unir los complejos objetivo/partícula a los segundos restos, eliminar las partículas no unidas y los analitos no unidos de la muestra, eluir los complejos objetivo/partícula de los segundos restos y detectar los complejos objetivo/partícula.

Breve Descripción de los Dibujos

45 La Figura 1 proporciona una configuración ilustrativa de una celda de flujo y un primer y segundo conjuntos de imanes para generar campos magnéticos alternos.

La Figura 2, panel A, proporciona un diagrama de proceso ilustrativo para la implementación de métodos de la invención para la separación de bacterias de la sangre. El panel B proporciona una vista ampliada de un complejo objetivo/partículas magnéticas.

50 La Figura 3 es un gráfico que muestra la recuperación de bacterias de la sangre.

Descripción detallada

55 La divulgación generalmente se refiere al uso de partículas magnéticas y campos magnéticos alternos para separar un analito objetivo de una muestra. Los métodos de la divulgación implican poner en contacto una muestra con partículas magnéticas que incluyen los primeros restos específicos para un analito objetivo, lo que forma de esta manera complejos objetivo/partículas en la muestra, hacer fluir la muestra a través de un canal que incluye los segundos restos a al menos una superficie del canal, aplicar campos magnéticos alternos a la muestra que fluye para dar como resultado que los complejos objetivo/partícula se acerquen a la superficie para unir los segundos restos y las partículas no unidas que permanecen libres en la muestra, unir los complejos objetivo/partículas a los segundos restos y eliminar las partículas no unidas y analitos no unidos de la muestra. Ciertas tecnologías y principios fundamentales se asocian con la unión de materiales magnéticos a entidades objetivo y, posteriormente, la separación mediante el uso de campos magnéticos y gradientes. Tales tecnologías y principios fundamentales se conocen en la técnica y se han descrito anteriormente, tales como los descritos en Janeway (*Immunobiology*, 6^{ta} edición, Garland Science Publishing).

65 Los métodos de la divulgación implican recoger una muestra que tiene un analito objetivo en un recipiente, tal como un tubo de recolección de sangre (por ejemplo, Vacutainer) en el caso de sangre. En ciertas formas de realización, se agrega

una solución que previene o reduce la agregación de factores de agregación endógenos, tal como la heparina en el caso de la sangre.

5 Los métodos de la invención no dependen y no están limitados por el tipo de muestra. Cualquier muestra que incluya un objetivo detectable puede usarse con los métodos de la invención. La muestra puede ser una muestra biológica (por ejemplo, un tejido humano o fluido corporal), una muestra de alimentos, una muestra agrícola o una muestra ambiental (por ejemplo, una muestra de agua o suelo).

10 Las muestras biológicas ilustrativas incluyen tejido humano o fluido corporal. Un tejido es una masa de células conectadas y/o material de matriz extracelular, por ejemplo, tejido de la piel, tejido de vías nasales, tejido del SNC, tejido neural, tejido ocular, tejido hepático, tejido renal, tejido placentario, tejido de la glándula mamaria, tejido placentario, tejido gastrointestinal, tejido musculoesquelético, tejido genitourinario, médula ósea y similares, derivados, por ejemplo, de un ser humano u otro mamífero e incluye el material de conexión y el material líquido en asociación con las células y/o tejidos. Un fluido corporal es un material líquido derivado, por ejemplo, de un humano u otro mamífero. Tales fluidos corporales incluyen, pero no están limitados a, mucosa, sangre, plasma, suero, derivados séricos, bilis, flema, saliva, sudor, líquido amniótico, líquido mamario, orina, esputo y líquido cefalorraquídeo (LCR), tal como lumbar o LCR ventricular. Una muestra también puede ser un aspirado con aguja fina. Una muestra también puede ser un medio que contiene células o material biológico. En las formas de realización particulares, la muestra es sangre.

20 Las muestras agrícolas ilustrativas incluyen cualquier material vegetal que se interroge por un método de la presente invención. Una muestra agrícola incluye, pero no se limita a semillas o tejido vegetal. Las semillas incluyen una sola semilla, un lote de semillas, una porción de una semilla o un raspado de semillas. El tejido vegetal incluye, pero no está limitado a, cualquier parte de la planta, tales como hojas, flores, raíces o pétalos. El tejido vegetal también puede incluir una perforadora de hojas.

25 Los métodos de la invención pueden usarse para detectar cualquier analito objetivo. El analito objetivo se refiere a la sustancia en la muestra que se capturará y aislará por los métodos de la invención. El objetivo puede ser una bacteria, un hongo, una proteína, una célula (tales como una célula cancerosa, un glóbulo blanco, una célula infectada por virus o una célula fetal que circula en la circulación materna), un virus, un ácido nucleico (por ejemplo, ADN o ARN), un receptor, un ligando, una hormona, un fármaco, una sustancia química o cualquier molécula conocida en la técnica. En ciertas formas de realización, el objetivo es una bacteria patógena. En otras formas de realización, el objetivo es una bacteria gram positiva o gram negativa. Las especies bacterianas ilustrativas que pueden capturarse y aislarse mediante los métodos de la invención incluyen *E. coli*, *Listeria*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Shigella*, *Borrelia*, *Campylobacter*, bacilo, *Salmonella*, estafilococo, enterococo, neumococo, estreptococo y una de sus combinaciones.

35 Luego, la muestra se mezcla con partículas magnéticas que incluyen un resto de unión específica al objetivo para generar una mezcla que se incuba de manera que las partículas se unan a un objetivo en la muestra, tal como una bacteria en una muestra de sangre. La mezcla se deja incubar durante un tiempo suficiente para permitir que las partículas se unan al analito objetivo. El proceso de unión de las partículas magnéticas a los analitos objetivo asocia un momento magnético con los analitos objetivo y, por lo tanto, permite que los analitos objetivo se manipulen a través de las fuerzas generadas por los campos magnéticos sobre el momento magnético adjunto.

45 En general, el tiempo de incubación dependerá del grado deseado de unión entre el analito objetivo y las microesferas magnéticas (por ejemplo, la cantidad de momento que se uniría convenientemente al objetivo), la cantidad de momento por objetivo, la cantidad de tiempo de mezcla, el tipo de mezcla, los reactivos presentes para promover la unión y el sistema químico de unión que se emplea. El tiempo de incubación puede ser de unos 5 segundos a unos pocos días. Los tiempos de incubación ilustrativos varían de aproximadamente 10 segundos a aproximadamente 2 horas. La unión se produce en una amplia variedad de temperaturas, generalmente entre 15 °C y 40 °C.

50 Los métodos de la invención pueden realizarse con cualquier tipo de partícula magnética. La producción de partículas magnéticas y partículas para usar con la invención se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Giaever (US 3,970,518), Senyi y otros (US 4,230,685), Dodin y otros (US 4,677,055), Whitehead y otros (US 4,695,393), Benjamin y otros (US 5,695,946), Giaever (US 4,018,886), Rembaum (US 4,267,234), Molday (US 4,452,773), Whitehead y otros (US 4,554,088), Forrest (US 4,659,678), Liberti y otros (US 5,186,827), Own y otros (US 4,795,698), y Liberti y otros (WO 91/02811).

60 Las partículas magnéticas generalmente se dividen en dos grandes categorías. La primera categoría incluye partículas que son permanentemente magnetizables o ferromagnéticas; y la segunda categoría incluye partículas que demuestran un comportamiento magnético masivo solo cuando se someten a un campo magnético. Los últimos se denominan partículas magnéticamente sensibles. Los materiales que muestran un comportamiento magnéticamente sensible a veces se describen como superparamagnéticos. Sin embargo, los materiales que exhiben propiedades ferromagnéticas masivas, por ejemplo, óxido de hierro magnético, pueden caracterizarse como superparamagnéticos cuando se proporcionan en cristales de aproximadamente 30 nm o menos de diámetro. Los cristales más grandes de materiales ferromagnéticos, por el contrario, conservan las características del imán permanente después de la exposición a un campo magnético y tienden a agregarse a partir de entonces debido a la fuerte interacción partícula-partícula. En ciertas formas de realización, las partículas son microesferas superparamagnéticas. En ciertas formas de realización, la partícula

magnética es un hierro que contiene partículas magnéticas. En otras formas de realización, la partícula magnética incluye óxido de hierro o platino de hierro.

5 En ciertas formas de realización, las partículas magnéticas incluyen al menos aproximadamente 10 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 20 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 30 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 40 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 50 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 60 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 70 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 80 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 90 % de microesferas superparamagnéticas en peso, al menos aproximadamente 95 % de microesferas superparamagnéticas en peso, o al menos aproximadamente 99 % de microesferas superparamagnéticas en peso. En una forma de realización particular, las partículas magnéticas incluyen al menos aproximadamente 70 % de microesferas superparamagnéticas en peso.

15 En ciertas formas de realización, las microesferas superparamagnéticas tienen menos de 100 nm de diámetro. En otras formas de realización, las microesferas superparamagnéticas son de aproximadamente 150 nm de diámetro, son de aproximadamente 200 nm de diámetro, son de aproximadamente 250 nm de diámetro, son de aproximadamente 300 nm de diámetro, son de aproximadamente 350 nm de diámetro, son de aproximadamente 400 nm de diámetro, son de aproximadamente 500 nm de diámetro, o son aproximadamente 1.000 nm de diámetro. En una forma de realización particular, las microesferas superparamagnéticas tienen un diámetro de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 250 nm.

25 En ciertas formas de realización, las partículas son microesferas (por ejemplo, nanopartículas) que incorporan materiales magnéticos, o materiales magnéticos que se han funcionalizado, u otras configuraciones como se conocen en la técnica. En ciertas formas de realización, pueden usarse nanopartículas que incluyen un material polimérico que incorpora material(es) magnético(s), tal(es) como material(es) de nanometal. Cuando ese/esos material(es) o cristal(es) de nanometal, tal como el Fe_3O_4 , son superparamagnéticos, pueden proporcionar propiedades ventajosas, tales como ser capaces de magnetizarse por un campo magnético externo y desmagnetizarse cuando el campo magnético externo se ha retirado. Esto puede ser ventajoso para facilitar el transporte de muestras dentro y fuera de un área donde la muestra se procesa sin una agregación indebida de microesferas.

35 Se pueden emplear uno o más o varios nanometales diferentes, tales como Fe_3O_4 , FePt o Fe, en una configuración de núcleo-cubierta para proporcionar estabilidad, y/o varios otros como se puede conocer en la técnica. En muchas aplicaciones, puede ser ventajoso tener un nanometal que tenga un momento saturado por volumen tan alto como sea posible, ya que esto puede maximizar las fuerzas relacionadas con el gradiente y/o puede mejorar una señal asociada con la presencia de las microesferas. También puede ser ventajoso que la carga volumétrica en una microesfera sea lo más alta posible, por la misma razón o razones similares. Para maximizar el momento proporcionado por un nanometal magnetizable, puede proporcionarse un cierto campo de saturación. Por ejemplo, para las partículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 , este campo puede ser del orden de aproximadamente 0,3 T.

40 El tamaño de la microesfera que contiene nanometal puede optimizarse para una aplicación particular, por ejemplo, maximizar el momento cargado sobre un objetivo, maximizar la cantidad de microesferas en un objetivo con una detectabilidad aceptable, maximizar el movimiento inducido por la fuerza deseada y/o maximizar la diferencia en el momento adjunto entre el objetivo marcado y los objetivos no específicamente unidos o agregados de microesferas o microesferas individuales. Si bien se hace referencia a la maximización mediante el ejemplo anterior, se contemplan otras optimizaciones o alteraciones, tales como minimizar o afectar de cualquier otra manera considerablemente las condiciones.

50 En una forma de realización ilustrativa, se produce una microesfera de polímero que contiene 80 % en peso de partículas superparamagnéticas de Fe_3O_4 , o, por ejemplo, 90 % en peso de partículas superparamagnéticas superiores, al encapsular las partículas superparamagnéticas con un recubrimiento de polímero para producir una microesfera que tiene un diámetro de aproximadamente 250 nm.

55 Las partículas magnéticas para usar con los métodos de la invención tienen un resto de unión específica al objetivo que permite que las partículas se unan específicamente al objetivo de interés en la muestra. El resto específica del objetivo puede ser cualquier molécula conocida en la técnica y dependerá del objetivo a capturar y aislar. Los ejemplos de restos de unión específica al objetivo incluyen ácidos nucleicos, proteínas, ligandos, anticuerpos, aptámeros y receptores.

60 En las formas de realización particulares, el resto de unión específica al objetivo es un anticuerpo, tal como un anticuerpo que se une a una bacteria particular. Las metodologías generales para la producción de anticuerpos, que incluyen los criterios a tener en cuenta al elegir un animal para la producción de antisueros, se describen en Harlow y otros (Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory, págs. 93-117, 1988). Por ejemplo, un animal de tamaño adecuado, tales como cabras, perros, ovejas, ratones o camellos, se inmuniza mediante la administración de una cantidad de inmunógeno, tal como la bacteria objetivo, eficaz para producir una respuesta inmune. Un protocolo ilustrativo es el siguiente. El animal se inyecta con 100 microgramos a 100 miligramos de antígeno resuspendido en adyuvante, por ejemplo, el adyuvante completo de Freund, en dependencia del tamaño del animal, seguido tres semanas más tarde con una inyección

subcutánea de 100 microgramos a 100 miligramos de inmunógeno con adyuvante en dependencia del tamaño del animal, por ejemplo, el adyuvante incompleto de Freund. Se administran inyecciones subcutáneas o intraperitoneales adicionales cada dos semanas con adyuvante, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund, hasta que se alcanza un título adecuado de anticuerpo en la sangre del animal. Los títulos ilustrativos incluyen un título de al menos aproximadamente 1:5000 o un título de 1:100.000 o más, es decir, la dilución que tiene una actividad detectable. Los anticuerpos se purifican, por ejemplo, mediante purificación por afinidad en columnas que contienen resina de proteína G o resina de afinidad específica del objetivo.

La técnica de inmunización *in vitro* de linfocitos humanos se utiliza para generar anticuerpos monoclonales. Las técnicas para la inmunización *in vitro* de linfocitos humanos son bien conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Inai, y otros, *Histochemistry*, 99 (5): 335 362, mayo de 1993; Mulder y otros, *Hum. Immunol.*, 36 (3): 186 192, 1993; Harada, y otros, *J. Oral Pathol. Med.*, 22 (4): 145 152, 1993; Stauber y otros, *J. Immunol. Methods*, 161 (2): 157 168, 1993; y Venkateswaran, y otros, *Hybridoma*, 11 (6) 729 739, 1992. Estas técnicas pueden usarse para producir anticuerpos monoclonales reactivos con antígenos, que incluyen los anticuerpos monoclonales IgG e IgM específicos de antígeno.

Cualquier anticuerpo o fragmento del mismo que tenga afinidad y sea específico para la bacteria de interés está dentro del alcance de la divulgación proporcionada en este documento. Las microesferas inmunomagnéticas contra *Salmonella* se proporcionan en Vermunt y otros (*J. Appl. Bact.* 72: 112, 1992). Las microesferas inmunomagnéticas contra *Estafilococo dorado* se proporcionan en Johnne y otros (*J. Clin. Microbiol* 27: 1631, 1989). Las microesferas inmunomagnéticas contra *Listeria* se proporcionan en Skjerve y otros (*Appl. Env. Microbiol* 56: 3478, 1990). Las microesferas inmunomagnéticas contra *Escherichia coli* se proporcionan en Lund y otros (*J. Clin. Microbiol.* 29: 2259, 1991).

Los métodos para unir el resto de unión específica al objetivo a la partícula magnética se conocen en la técnica. El recubrimiento de partículas magnéticas con anticuerpos se conoce bien en la técnica, véase, por ejemplo, Harlow y otros (*Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988), Hunter y otros (*Immunoassays for Clinical Chemistry*, pp. 147-162, eds., Churchill Livingstone, Edinborough, 1983) y Stanley (*Essentials in Immunology and Serology*, Delmar, pp. 152-153, 2002). Tal metodología puede modificarse fácilmente por un experto en la técnica para unir otros tipos de restos de unión específica al objetivo a las partículas magnéticas. Ciertos tipos de partículas magnéticas recubiertas con un resto funcional están disponibles comercialmente en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

En ciertas formas de realización, se agrega una solución tampón a la muestra junto con las microesferas magnéticas. Un tampón ilustrativo incluye Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato a una concentración de aproximadamente 75 mM. Se ha descubierto que la composición del tampón, los parámetros de mezcla (velocidad, tipo de mezcla, tal como rotación, agitación, etc., y temperatura) influyen en la unión. Es importante mantener la osmolalidad de la solución final (por ejemplo, Sangre + tampón) para mantener una alta eficacia del marcado. En ciertas formas de realización, los tampones usados en los métodos de la invención se diseñan para prevenir la lisis de las células sanguíneas, facilitar la unión eficiente de objetivos con microesferas magnéticas y reducir la formación de agregados de microesferas. Se ha encontrado que la solución tampón que contiene 300 mM de NaCl, Tris-HCl 75 mM pH 8,0 y Tween 20 al 0,1 % cumple con estos objetivos de diseño.

Sin que se limite por ninguna teoría o mecanismo particular de acción, se cree que el cloruro de sodio es el principal responsable del mantenimiento de la osmolalidad de la solución y de la reducción de la unión no específica de la microesfera magnética a través de la interacción iónica. El Tris(hidroximetil)aminometano clorhidrato es un compuesto amortiguador bien establecido que se usa con frecuencia en biología para mantener el pH de una solución. Se ha encontrado que la concentración de 75 mM es beneficiosa y suficiente para una alta eficiencia de unión. Igualmente, Tween 20 se usa ampliamente como un detergente suave para disminuir la unión no específica debido a las interacciones hidrófobas. Diversos ensayos usan Tween 20 a concentraciones que varían de 0,01 % a 1 %. La concentración de 0,1 % parece ser óptima para el marcado eficiente de bacterias, mientras se mantienen intactas las células sanguíneas.

Un enfoque alternativo para lograr una alta eficiencia de unión mientras se reduce el tiempo requerido para la etapa de unión es usar un mezclador estático u otros dispositivos de mezcla que proporcionen una mezcla eficiente de muestras viscosas a altas velocidades de flujo, tal como a 5 ml/min. En una forma de realización, la muestra se mezcla con tampón de unión en una proporción de, o aproximadamente, 1:1, mediante el uso de un conector de interfaz de mezcla. La muestra diluida luego fluye a través de un segundo conector de interfaz de mezcla donde se mezcla con nanopartículas específicas del objetivo. Se pueden acoplar conectores de interfaz de mezcla adicionales que proporcionan la mezcla de muestras y nanopartículas específicas de antígeno aguas abajo para mejorar la eficiencia de unión. El caudal combinado de la muestra marcada se selecciona de manera que sea compatible con el procesamiento aguas abajo. En este punto del proceso, la mezcla incluye complejos objetivo/de partículas magnéticas, partículas magnéticas no unidas y los componentes restantes de la mezcla. Las técnicas anteriores para aislar complejos objetivo/de partículas magnéticas implican aplicar un campo magnético a la mezcla para capturar los complejos en una superficie. Los componentes de la mezcla que no se unen a las partículas magnéticas no se verán afectados por el campo magnético y permanecerán libres en la mezcla.

El tipo de separación magnética descrito anteriormente produce una captura eficiente de un analito objetivo y la eliminación de la mayoría de los componentes restantes de una mezcla de muestra. Sin embargo, tal proceso produce

una muestra que contiene un porcentaje muy alto de partículas magnéticas que no se unen a los analitos objetivo debido a que las partículas magnéticas típicamente se agregan en exceso, así como también las entidades objetivo no específicas. Las entidades objetivo no específicas pueden unirse con una eficiencia mucho menor, por ejemplo, el 1 % del área superficial, mientras que un objetivo de interés puede cargarse al 50 % o casi el 100 % del área superficial disponible o los sitios antigénicos disponibles. Sin embargo, incluso el 1 % de carga puede ser suficiente para impartir la fuerza necesaria para atrapar en una celda de flujo de gradiente magnético o cámara de muestra.

Por ejemplo, en el caso del marcado inmunomagnético de bacterias u hongos en una muestra de sangre, la muestra puede incluir: objetivos marcados a una concentración de aproximadamente 1/ml o una concentración menor de aproximadamente 10^6 /ml; microesferas de fondo a una concentración de aproximadamente 10^7 /ml a aproximadamente 10^{10} /ml; y objetivos no específicos a una concentración de aproximadamente 10/ml a aproximadamente 10^5 /ml.

La presencia de partículas magnéticas que no se unen a los analitos objetivo y entidades objetivo no específicas en la superficie que incluye los complejos objetivo/de partículas magnéticas interfiere con la capacidad de detectar con éxito el objetivo de interés. La captura magnética de la mezcla resultante, y el contacto cercano de partículas magnéticas entre sí y los objetivos marcados, dan como resultado la formación de agregado que es difícil de dispensar y que puede ser resistente o inadecuado para las etapas de procesamiento o análisis posteriores. Además, con la adición de partículas magnéticas en exceso a la muestra, puede acumularse una gran cantidad de partículas en las áreas de gradientes altos y, por lo tanto, un analito objetivo unido magnéticamente puede igualmente estar en el cuerpo de la acumulación de partículas en lugar de la localización deseada adyacente a la superficie funcionalizada donde puede producirse una unión específica. Ignorando las fuerzas intramicroesferas (esas fuerzas asociadas con la distribución del campo magnético de las microesferas individuales y las fuerzas que estos campos y los gradientes asociados tienen sobre otras microesferas), las microesferas pueden acumularse en grandes pilas amorfas. Tales fuerzas de intramarcas se producen, y por lo tanto los agregados de microesferas tienden a existir en cadenas y agregados lineales largos que se alinean con las 'líneas de campo' de las piezas de trampa magnética.

Los métodos de la invención abordan este problema al aplicar campos magnéticos alternos a la muestra a medida que fluye a través del canal. La frecuencia del campo magnético alterno se selecciona de manera que las nanopartículas magnéticas libres no puedan atravesar toda la distancia entre la parte superior e inferior de la celda de flujo antes de que cambie la dirección del campo magnético, lo que hace que las nanopartículas se muevan en la dirección opuesta. Por lo tanto, la mayoría de las nanopartículas libres no entrarán en contacto cercano con las superficies activas de la celda de flujo y se eliminarán por el flujo de líquido. El objetivo marcado, debido al mayor momento magnético, tiene mayor velocidad en el campo magnético y alcanzará una superficie de la celda de flujo antes del cambio del campo magnético, por lo que entrará en contacto cercano con la superficie. Esto, a su vez, dará como resultado un evento de unión específica y dará como resultado una captura específica del analito objetivo en la muestra (tal como una bacteria u otra célula rara) a la superficie recubierta con un segundo resto. Los componentes de la mezcla que no se unen a las partículas magnéticas no se verán afectados por el campo magnético y permanecerán libres en la mezcla.

El segundo resto específico del objetivo puede ser igual o diferente del primer resto específico del objetivo. El segundo resto puede unirse a la superficie del canal de flujo mediante los métodos descritos anteriormente en relación con la unión de los primeros restos específicos del objetivo a las partículas magnéticas.

La Figura 1 proporciona una configuración ilustrativa de una celda de flujo y un primer y segundo conjuntos de imanes para generar campos magnéticos alternos. Esta figura muestra que la celda de flujo se posiciona entre el primer y segundo conjuntos de imanes. Tanto el movimiento de la celda de flujo como el movimiento de los imanes acercan la celda de flujo a un conjunto de imanes y alejan el otro conjunto de imanes. El movimiento posterior acerca la celda de flujo a la proximidad del otro conjunto de imanes. Tales movimientos generan campos magnéticos alternos dentro de los canales de la celda de flujo que se experimentan por las partículas magnéticas no unidas y los complejos objetivo/partículas magnéticas.

En una forma de realización, una celda de flujo puede tener aproximadamente 15 mm de ancho y aproximadamente 15 mm de largo, con una región de entrada y una sección de salida, y una altura de aproximadamente 0,5 mm (Figura 1). Un caudal para tal célula puede ser de aproximadamente 100 μ l/min, aproximadamente 1 ml/min, aproximadamente 10 ml/min, o de aproximadamente 100 l/min a aproximadamente 10 ml/min o de otros intervalos en los mismos. Una configuración magnética puede ser una matriz de imanes, por ejemplo, una matriz de imanes de 7 barras, o imanes de 5 barras, o imanes de 3 barras (Figura 1). Los imanes pueden configurarse con polos de imanes alternos orientados entre sí, n-n, s-s, etc., con la cara del polo que es normal a la cara rectangular de la matriz en esta forma de realización.

En un sistema que fluye, los sucesivos encuentros de partículas magnéticas no unidas con una superficie de un canal de flujo, sin un evento de unión resultante, permitirán que las partículas magnéticas no unidas viajen a través del sistema y posteriormente fuera de la célula. El ciclo de los conjuntos de trampa de barra magnética puede optimizarse en base a las características de flujo del/de los objetivo(s) de interés. La expresión de la fuerza en un momento magnético y de la velocidad terminal para tales objetivos es la siguiente:

$$m \text{ punto (del B)} = F \quad \text{Ecuación 1}$$

$$v_t = -F/(6\eta r)$$

Ecuación 2

donde η es la viscosidad, r es el diámetro de la microesfera, F es la fuerza del vector, B es el campo del vector y m es el momento del vector de la microesfera.

5

Se puede establecer un tiempo de tránsito característico a través de la altura de la celda. Se puede establecer una frecuencia eficiente de los atractores magnéticos alternos, de manera que se puedan establecer muchas interacciones superficiales antes de la salida de la celda de flujo. En ciertas formas de realización, el tiempo de tránsito puede ser sustancialmente diferente para el objetivo de interés frente a las partículas magnéticas no unidas, o no objetivo unido no específico. En tal forma de realización, puede garantizarse que el objetivo interactúe con la superficie una cantidad máxima de veces, mientras que las partículas magnéticas no unidas o no objetivo pueden interactuar un número mínimo de veces, o no hacerlo en absoluto.

10

Debido a las características de magnetización de las partículas, las partículas magnéticas no unidas pueden formar agregados, que pueden estar en forma de cadenas lineales o aglutinamientos. Este puede ser el caso a altas concentraciones de microesferas. En todas las concentraciones, las partículas magnéticas no unidas pueden exhibir estadísticas espaciales de sustancias venenosas, y existe cierta probabilidad de que haya una microesfera vecina lo suficientemente cerca como para captursarse por las fuerzas asociadas con el campo magnético de las mismas microesferas. Al usar campos magnéticos alternos, los métodos de la invención rompen estos agregados lineales, particularmente cuando el campo de gradiente espacial de las trampas magnéticas se desplaza más rápido de lo que las partículas magnéticas no unidas pueden moverse mutuamente para reorientarse a la nueva distribución del gradiente de trampa. Las partículas organizadas en cadenas, con el eje N-S coalineado, pueden someterse rápidamente a un campo externo que produce momentos de partículas con los polos N-S desplazados 90°, y puede producir fuerzas repulsivas intrapartículas muy fuertes. El movimiento transversal de las trampas magnéticas sirve para este propósito en colaboración con, o como un paso discreto además de, la alternancia de las trampas magnéticas de una superficie a la otra.

15

20

25

En la optimización del tiempo de ciclo de las trampas magnéticas, las características de flujo de la celda pueden considerarse junto con la distribución espacial del gradiente de las trampas magnéticas. Las características de flujo pueden determinar el transporte de los materiales magnéticos desde la entrada hasta la salida de la celda, de manera que puede considerarse el flujo parabólico, el flujo de tapón o cualquier característica de flujo particular para facilitar la obtención de los patrones de deposición deseados y las interacciones deseadas con las superficies de interés.

30

En ciertas formas de realización, puede ser conveniente en diversas aplicaciones maximizar los encuentros de los complejos objetivo/de partículas magnéticas con la superficie funcionalizada del canal, minimizar la interferencia con las partículas magnéticas no unidas y/o minimizar la adhesión de las partículas magnéticas no unidas y los materiales no específicos a la superficie. Puede ser ventajoso producir una serie de tuberías, o tubos, a través de los cuales puede fluir el flujo de los materiales de muestra. A manera de ejemplo, un volumen de celda de 125 mm x 15 mm x 0,5 mm puede llenarse con tubos, alineados longitudinalmente con la dirección del flujo de la celda, de manera que haya un gran aumento en el área superficial funcionalizada y una limitación en el número de partículas magnéticas no unidas que pueden interactuar e impedir el encuentro del objetivo con la superficie. Se pueden usar estructuras planas para este propósito, en el que el volumen de la celda se construye con múltiples capas de canales de flujo más pequeños, de manera que se aumenta el área superficial y se reduce el número de partículas magnéticas no unidas disponibles para impedir que el objetivo en su camino a la superficie disminuya. En esta forma de realización, el enfoque general de ciclar las trampas magnéticas es similar al descrito anteriormente, pero las variables tales como constantes de tiempo, amplitudes y distribuciones de campo de gradiente, por ejemplo, se optimizan para la situación particular. De manera similar, en el caso del movimiento de trampa transversal para la ruptura de los agregados, el enfoque general es similar al descrito anteriormente.

35

40

45

Puede ser conveniente proteger la porción del flujo de muestra fuera de la celda de la trampa del campo magnético periférico para que el material magnético no tenga la oportunidad de autoagregarse antes de ingresar al campo fuerte y la zona de gradiente de la trampa. Los materiales magnéticos y el objetivo marcado también pueden quedar atrapados en tubos de flujo y otras estructuras fluidicas a través de fuerzas magnéticas en áreas no deseadas. El blindaje puede lograrse mediante el diseño apropiado de las trampas magnéticas, por ejemplo, mediante la administración de la 'ruta de retorno' del campo y/o mediante el uso de materiales de alta permeabilidad para capturar y canalizar el campo para minimizar la exposición al campo periférico.

50

55

Es posible purificar muestras y fijar objetivos de interés y luego examinar el objetivo *in situ* en la superficie, de cualquier manera adecuada conocida en la técnica, o el objetivo puede eliminarse de la superficie al eluir la superficie a través del uso de una química de enlace apropiada que puede liberarse de tal manera que el objetivo se pueda analizar en algún proceso posterior, por ejemplo, mediante el uso de un sistema de flujo similar a un citómetro, o mediante la recopilación de los objetivos individuales para otro análisis, como NAT, PCR, etc., o algún otro posprocesamiento y análisis según lo habilitado por el suministro de la entidad objetivo. En un caso ilustrativo, la muestra se analiza mediante el uso de un detector de RMN que fluye.

60

La detección de bacterias de interés puede realizarse mediante el uso de sondas de ácido nucleico siguiendo los procedimientos que se conocen en la técnica. Los procedimientos adecuados para la detección de bacterias mediante el

65

uso de sondas de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en Stackebrandt y otros (US 5,089,386), King y otros (WO 90/08841), Foster y otros (WO 92/15883), y Cossart y otros (WO 89/06699).

Un ensayo de sonda de ácido nucleico adecuado generalmente incluye tratamiento de muestra y lisis, hibridación con sonda(s) seleccionada(s), captura híbrida y detección. La lisis de la bacteria es necesaria para liberar el ácido nucleico para las sondas. Las moléculas objetivo de ácido nucleico se liberan mediante el tratamiento con cualquiera de varios agentes de lisis, que incluyen álcalis (tal como NaOH), sales de guanidina (tal como el isotiocianato de guanidina), enzimas (tal como lisozima, mutanolisina y proteinasa K) y detergentes. La lisis de las bacterias, por lo tanto, libera tanto ADN como ARN, particularmente ARN ribosómico y ADN cromosómico, los cuales pueden utilizarse como moléculas objetivo con la selección adecuada de una sonda adecuada. El uso de ARNr como la(s) molécula(s) objetivo(s) puede ser ventajoso debido a que los ARNr constituyen un componente significativo de la masa celular, lo que proporciona de esta manera una abundancia de moléculas objetivo. El uso de sondas de ARNr también mejora la especificidad para las bacterias de interés, es decir, la detección positiva sin reactividad cruzada inconveniente que puede conducir a falsos positivos o detección falsa.

La hibridación incluye la adición de las sondas de ácido nucleico específicas. En general, la hibridación es el procedimiento mediante el cual se combinan dos ácidos nucleicos parcial o completamente complementarios, en condiciones de reacción definidas, de manera antiparalela para formar enlaces de hidrógeno específicos y estables. La selección o rigurosidad de las condiciones de hibridación/reacción se define por la longitud y la composición base de la sonda/dúplex objetivo, así como también por el nivel y la geometría del emparejamiento incorrecto entre las dos cadenas de ácido nucleico. La rigurosidad también se rige por tales parámetros de reacción como temperatura, tipos y concentraciones de agentes desnaturizantes presentes y el tipo y concentración de especies iónicas presentes en la solución de hibridación.

La fase de hibridación del ensayo de la sonda de ácido nucleico se realiza con una sola sonda seleccionada o con una combinación de dos, tres o más sondas. Se seleccionan las sondas que tienen secuencias que son homólogas a secuencias de ácido nucleico únicas del organismo objetivo. En general, se utiliza una primera sonda de captura para capturar moléculas híbridas formadas. La molécula híbrida se detecta luego mediante el uso de una reacción de anticuerpos o mediante el uso de una segunda sonda detectora que puede marcarse con un radioisótopo (tal como el fósforo-32) o una marca fluorescente (tal como la fluoresceína) o una marca quimioluminiscente.

La detección de bacterias de interés también puede realizarse mediante el uso de técnicas de PCR. Una técnica de PCR adecuada se describe, por ejemplo, en Verhoef y otros (WO 92/08805). Tales protocolos pueden aplicarse directamente a las bacterias capturadas en las microesferas magnéticas. La bacteria se combina con un tampón de lisis y las moléculas objetivo de ácido nucleico recogidas se utilizan como plantilla para la reacción de PCR.

Para la detección de las bacterias seleccionadas mediante el uso de anticuerpos, las bacterias aisladas se ponen en contacto con anticuerpos específicos para las bacterias de interés. Como se señaló anteriormente, pueden utilizarse anticuerpos policlonales o monoclonales, pero en cualquier caso tienen afinidad por la bacteria particular a detectar. Estos anticuerpos se adherirán/unirán al material de la bacteria objetivo específica. Con respecto al marcado de los anticuerpos, estos se marcan directa o indirectamente con marcas usadas en otros inmunoensayos conocidos. Las marcas directas pueden incluir moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes, radiactivas, metálicas, de biotina o enzimáticas. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para combinar estas marcas con los anticuerpos u otras macromoléculas. Los ejemplos incluyen los métodos de Hijmans, W. y otros (1969), Clin. Ej. de Immunol 4, 457-, para isotiocianato de fluoresceína, el método de Goding, JW (1976), J. Immunol. Mtd. 13, 215-, para el isotiocianato de tetrametilrodamina, y el método de Ingrassia, E. (1980), Mtd. en Enzymol 70, 419-439 para enzimas.

Estos anticuerpos detectores también pueden marcarse indirectamente. En este caso, la molécula de detección real se une a un anticuerpo secundario u otra molécula con afinidad de unión por el anticuerpo antibacteriano de la superficie celular. Si se usa un anticuerpo secundario, es preferentemente un anticuerpo general para una clase de anticuerpo (IgG e IgM) de la especie animal usada para elevar los anticuerpos antibacterianos de la superficie celular. Por ejemplo, el segundo anticuerpo puede conjugarse con una enzima, ya sea fosfatasa alcalina o peroxidasa. Para detectar la marca, después de que las bacterias de interés se ponen en contacto con el segundo anticuerpo y se lavan, el componente aislado de la muestra se sumerge en una solución que contiene un sustrato cromogénico ya sea para fosfatasa alcalina o peroxidasa. Un sustrato cromogénico es un compuesto que puede escindirarse por una enzima para que resulte en la producción de algún tipo de señal detectable que solo aparece cuando el sustrato se escinde de la molécula base. El sustrato cromogénico es incoloro, hasta que reacciona con la enzima, momento en el que se produce un producto de color intenso. Por lo tanto, el material de las colonias de bacterias adheridas a la lámina de membrana se volverá de un color azul/púrpura/negro intenso o marrón/rojo, mientras que el material de otras colonias permanecerá incoloro. Los ejemplos de moléculas de detección incluyen sustancias fluorescentes, tales como el 4-metilumbeliferil fosfato, y sustancias cromogénicas, tales como el 4-nitrofenilfosfato, 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina y 2,2'-azino-di-[3-ethylbenz-sulfonato de tiazoliano (6)]. Además de la fosfatasa alcalina y la peroxidasa, otras enzimas útiles incluyen β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, α -manosidasa, galactosa oxidasa, glucosa oxidasa y hexoquinasa.

La detección de bacterias de interés mediante el uso de RMN puede lograrse de la siguiente manera. En el uso de la RMN como metodología de detección, en la que se entrega una muestra a una bobina detectora centrada en un imán, el objetivo de interés, tal como una bacteria marcada magnéticamente, puede administrarse por un medio fluido, tal como un fluido

5 sustancialmente compuesto de agua. En tal caso, el objetivo marcado magnéticamente puede pasar de una región de campo magnético muy bajo a una región de campo magnético alto, por ejemplo, un campo producido por un imán de Tesla de aproximadamente 1 a aproximadamente 2. De esta manera, la muestra puede atravesar un gradiente magnético, acercarse al imán y salir del imán. Como puede verse a través de las ecuaciones 1 y 2 anteriores, el objetivo puede experimentar una fuerza que empuja hacia el imán en la dirección del flujo de muestra que se acerca al imán, y una fuerza hacia el imán en la dirección opuesta del flujo al salir del imán. El objetivo puede experimentar una fuerza de retención que atrapa al objetivo en el imán si el flujo no es suficiente para superar la fuerza del gradiente.

10 Los campos magnéticos en una trayectoria hacia un imán pueden no ser uniformes en la dirección transversal con respecto al flujo hacia el imán. Como tal, puede haber una fuerza transversal que atrae objetivos hacia el lado de un recipiente o un conducto que proporciona el flujo de muestra al imán. Generalmente, el tiempo que le toma a un objetivo alcanzar la pared de un conducto se asocia con la velocidad terminal y es menor al aumentar la viscosidad. La velocidad terminal se asocia con la fuerza de arrastre, que puede ser indicativa de flujo lento en ciertos casos. En general, puede ser ventajoso tener una alta viscosidad para proporcionar una mayor fuerza de arrastre de manera que un objetivo tenderá a transportarse con el flujo de fluido a través del imán sin que quede atrapado en el imán o contra las paredes del conducto.

15 Los fluidos newtonianos tienen una característica de flujo en un conducto, tal como una tubería redonda, por ejemplo, que es parabólica, de manera que la velocidad de flujo es cero en la pared y máxima en el centro, y que tiene una característica parabólica con radio. La velocidad disminuye en una dirección hacia las paredes, y es más fácil atrapar magnéticamente los objetivos cerca de las paredes, ya sea con gradientes transversales que ejercen fuerza sobre el objetivo hacia la pared del conducto, o en gradientes longitudinales suficientes para evitar el flujo objetivo en la tubería en cualquier posición. Con el fin de proporcionar una fuerza de arrastre de fluido favorable para evitar que las muestras queden atrapadas en el conducto, puede ser ventajoso tener una condición de flujo de tapón, en el que la velocidad del fluido es sustancialmente uniforme en función de la posición radial en el conducto.

20 Cuando se emplea la detección de RMN en relación con una muestra que fluye, la detección puede basarse en una perturbación de la señal de agua de RMN causada por un objetivo marcado magnéticamente (Sillerud y otros, JMR (Journal of Magnetic Resonance), vol. 181, 2006). En tal caso, la muestra puede excitarse en el momento 0, y después de algún retraso, tal como aproximadamente 50 ms o aproximadamente 100 ms, puede producirse una medición aceptable (basada en una señal de RMN detectada). Alternativamente, tal medición puede producir inmediatamente después de la excitación, con la detección continua durante un tiempo, tal como aproximadamente 50 ms o aproximadamente 100 ms. Puede ser ventajoso detectar la señal de RMN durante períodos de tiempo sustancialmente más largos después de la excitación.

25 A manera de ejemplo, la detección de la señal de RMN puede continuar durante un período de aproximadamente 2 segundos para registrar información espectral a alta resolución. En el caso del flujo parabólico o newtoniano, la perturbación excitada en el momento 0 generalmente se difumina debido a que el agua alrededor de la fuente de perturbación viaja a diferentes velocidades, en dependencia de la posición radial en el conducto. Además, la información espectral puede perderse debido a los efectos de difuminado o mezcla del movimiento diferencial del fluido de muestra durante la detección de la señal. Cuando se realiza una aplicación de detección de RMN que implica una muestra de fluido que fluye, puede ser ventajoso proporcionar un flujo de muestra en forma de tapón para facilitar el contraste de RMN conveniente y/o la detección de señal de RMN conveniente.

30 El movimiento diferencial dentro de un fluido newtoniano que fluye puede tener efectos nocivos en ciertas situaciones, tal como una situación en la que se desea la detección de RMN localizada espacialmente, como en la imagen por resonancia magnética. En un ejemplo, un objeto magnético, tal como una bacteria marcada magnéticamente, fluye a través del detector de RMN y su presencia y localización se detectan mediante el uso de técnicas IRM. La detección puede ser posible debido al campo magnético del objeto magnético, ya que este campo perturba el campo magnético del fluido en las proximidades del objeto magnético. La detección del objeto magnético se mejora si el fluido cerca del objeto permanece cerca del objeto. En estas condiciones, se puede permitir que la perturbación magnética actúe durante más tiempo en cualquier elemento de volumen dado del fluido, y los elementos de volumen del fluido de esta manera afectados permanecerán en una proximidad espacial cercana. Tal perturbación magnética más fuerte y localizada se detectará más fácilmente mediante el uso de técnicas de RMN o IRM.

35 Si se usa un fluido newtoniano para transportar los objetos magnéticos a través del detector, la velocidad de los elementos de volumen de fluido dependerá de la posición radial en el conducto de fluido. En tal caso, el fluido cerca de un objeto magnético no permanecerá cerca del objeto magnético a medida que el objeto fluye a través del detector. El efecto de la perturbación magnética del objeto sobre el fluido circundante puede difuminarse en el espacio, y la fuerza de la perturbación en cualquier elemento de volumen de fluido puede reducirse debido a que ese elemento no permanece dentro del rango de la perturbación. La perturbación más débil y menos localizada en el fluido de la muestra puede ser indetectable mediante el uso de técnicas de RMN o IRM.

40 Ciertos líquidos, o mezclas de líquidos, exhiben perfiles de flujo no parabólicos en conductos circulares. Tales fluidos pueden exhibir perfiles de flujo no newtonianos en otras formas de conducto. El uso de tal fluido puede resultar ventajoso como el fluido de detección en una aplicación que emplea un dispositivo de detección basado en RMN. Cualquier efecto ventajoso puede atribuirse a la alta viscosidad del fluido, un perfil de flujo tipo tapón asociado con el fluido y/u otras

características atribuidas al fluido que facilitan la detección. Como ejemplo, un fluido de fluidificación por cizallamiento de alta viscosidad puede exhibir un perfil de velocidad de flujo que sea sustancialmente uniforme a través de las regiones centrales de la sección transversal del conducto. El perfil de velocidad de tal fluido puede pasar a un valor cero o muy bajo cerca o en las paredes del conducto, y esta región de transición puede limitarse a una capa muy delgada cerca de la pared.

No todos los fluidos, o todas las mezclas de fluidos, son compatibles con la metodología de detección de RMN. En un ejemplo, una mezcla de glicerol y agua puede proporcionar una alta viscosidad, pero la medición de RMN se degrada debido a que se detectan señales de RMN separadas del agua y las moléculas de glicerol que forman la mezcla. Esto puede obstaculizar la sensibilidad del detector de RMN. En otro ejemplo, el componente no acuoso de la mezcla fluida se puede elegir para que no tenga señal de RMN, lo que puede lograrse mediante el uso de un componente fluido perdeuterado, por ejemplo, o mediante el uso de un componente fluido perfluorado. Este enfoque puede sufrir la pérdida de intensidad de la señal ya que una porción del fluido en la bobina de detección no produce una señal.

Otro enfoque puede ser usar un componente de fluido secundario que constituya solo una pequeña fracción de la mezcla total de fluido. Tal componente de fluido secundario de baja concentración puede producir una señal de RMN de intensidad insignificante en comparación con la señal del componente principal del fluido, que puede ser agua. Puede ser ventajoso usar un componente de fluido secundario de baja concentración que no produce una señal de RMN en el detector. Por ejemplo, puede usarse un componente de fluido secundario perfluorado o perdeuterado.

La mezcla de fluidos utilizada en el detector de RMN puede incluir uno, dos o más de dos componentes secundarios además del componente de fluido principal. Los componentes de fluido empleados pueden actuar en colaboración para producir las características de flujo de fluido deseadas, tales como alta viscosidad y/o flujo de tapón. Los componentes de fluido pueden ser útiles para proporcionar características de fluido que son ventajosas para el rendimiento del detector de RMN, por ejemplo, al proporcionar tiempos de relajación de RMN que permiten un funcionamiento más rápido o intensidades de señal más altas.

Un fluido no newtoniano puede proporcionar ventajas adicionales para la detección de objetos mediante técnicas de RMN o IRM. Como ejemplo, los objetos que se detectan pueden tener sustancialmente la misma velocidad a medida que pasan a través de la bobina de detección. Esta velocidad característica puede permitir algoritmos más simples o más robustos para el análisis de los datos de detección. Como otro ejemplo, los objetos que se detectan pueden tener una velocidad fija, conocida y uniforme. Esto puede resultar ventajoso en dispositivos donde se necesita la posición del objeto detectado en momentos posteriores, tal como en un dispositivo que tiene una cámara de secuestro o una cámara de detección secundaria aguas abajo de la bobina de detección de RMN o IRM, por ejemplo.

En una forma de realización ilustrativa, se logró con éxito el suministro de muestra dentro y fuera de un imán cilíndrico 1,7T mediante el uso de un medio de suministro de fluido que contenía goma de xantano al 0,1 % a 0,5 % en agua. Tal suministro es adecuado para proporcionar un flujo sustancialmente similar a un tapón, una alta viscosidad, tal como de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 3.000 cP, y un buen contraste de RMN en relación con el agua. La goma de xantano actúa como un fluido no newtoniano, que tiene características de un fluido no newtoniano que se conocen bien en la técnica, y no compromete las características de la señal de RMN convenientes para una buena detección en un modo de operación conveniente.

El panel A de la Figura 2, proporciona un diagrama de proceso ilustrativo para la implementación de métodos de la invención para la separación de bacterias de la sangre. La muestra se recoge en un tubo de heparina de sodio mediante punción venosa, el volumen de muestra aceptable es de 1 a 10 ml. Se añaden a la muestra partículas superparamagnéticas que tienen restos de unión específica al objetivo, seguido de incubación en una incubadora con agitación a 37 °C durante 30 -120 min.

La captura de los objetivos marcados permite la eliminación de componentes sanguíneos y la reducción del volumen de muestra de 30 ml a 5 ml. La captura se realiza mediante la inyección de la mezcla de muestra, partículas no unidas y complejos objetivo/partícula en un canal que tiene anticuerpos específicos del objetivo recubiertos en la superficie. Durante la etapa de inyección, los campos magnéticos alternos se aplican mediante un sistema mecánico que mueve los imanes permanentes de NdFeB (3 barras dispuestas en orientación opuesta) a cada lado del canal, de manera que un imán esté presente muy cerca solo en un lado del canal. La frecuencia del campo magnético alterno (1 Hz) se seleccionó para que los objetivos marcados tuvieran tiempo suficiente para alcanzar una o ambas superficies del canal varias veces, mientras que la mayoría de las microesferas libres no podrían alcanzar ninguna de las superficies del canal.

Después de la separación, los complejos objetivo/partícula se eluyeron del segundo resto en la superficie del canal y fluyeron a una máquina de RMN para su análisis. El método de detección se basa en un detector de RMN en miniatura sintonizado a la resonancia magnética del agua. Cuando la muestra es magnéticamente homogénea (sin objetivos marcados), la señal de RMN del agua es claramente detectable y fuerte. La presencia de material magnético en la bobina del detector perturba el campo magnético, lo que resulta en una reducción en la señal del agua. Uno de los principales beneficios de este método de detección es que no hay fondo magnético en las muestras biológicas, lo que reduce significativamente los requisitos de rigurosidad del procesamiento de la muestra. Además, dado que la señal detectada se genera por el agua, hay una amplificación de señal incorporada que permite la detección de una sola bacteria marcada.

Mediante el uso de procedimientos descritos en este documento, se ha logrado lo siguiente: unir las partículas magnéticas que tienen restos de bacterias específicas a aproximadamente 10.000 bacterias en aproximadamente 5 ml de sangre mediante el uso de aproximadamente 5×10^9 /ml de aproximadamente microesferas de marca inmunomagnética de 250 nm de diámetro en aproximadamente 20 ml de solución de optimizadas para la unión; separar del objetivo de otros componentes de la muestra para producir una muestra de aproximadamente 5 ml de objetivos y partículas magnéticas no unidas; y eliminar prácticamente todas las partículas magnéticas no unidas para enriquecer la muestra en aproximadamente 0,5 ml con aproximadamente el 61 % de las bacterias iniciales.

Los métodos de la invención también se pueden combinar con otros protocolos de separación y aislamiento conocidos en la técnica. Particularmente, los métodos de la invención se pueden combinar con los métodos que se muestran en la solicitud de patente estadounidense en trámite y en copropiedad número de serie 12/850,203, presentada el 4 de agosto de 2010, titulada Aislar un analito objetivo de un fluido corporal.

Ejemplos

Ejemplo 1: muestra

Las muestras de sangre de voluntarios sanos se enriquecieron con concentraciones clínicamente relevantes de bacterias (1-10 UFC/ml), que incluyeron tanto cepas de laboratorio como aislamientos clínicos de las especies bacterianas que se encuentran con mayor frecuencia en las infecciones del torrente sanguíneo.

Ejemplo 2: Preparación de anticuerpos

Con el fin de generar IgG policlonal, específica para bacterias pan-grampositivas, se inmunizó una cabra mediante la administración, primero de antígenos bacterianos suspendidos en el ganglio linfático intra adyuvante completo de Freund, seguido de inyección subcutánea de antígenos bacterianos en adyuvante incompleto de Freund en intervalos de 2 semanas. Los antígenos se prepararon para la producción de anticuerpos haciendo crecer bacterias a fase exponencial ($OD_{600} = 0,4-0,8$). Después de la cosecha de la bacteria por centrifugación, la bacteria se inactivó mediante el uso de fijación de formalina en formaldehído al 4 % durante 4 horas a 37 °C. Después de 3 lavados de bacterias con PBS (15 minutos de lavado, centrifugación durante 20 minutos a 4.000 rpm), se midió la concentración de antígeno mediante el uso del ensayo BCA y el antígeno se usó a 1 mg/ml para la inmunización. Para generar IgG específica de bacterias Gram-positivas, se utilizaron varias especies bacterianas para la inoculación: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis*.

El suero inmune se purificó mediante el uso de cromatografía de afinidad en una columna de proteína G sefarosa (GE Healthcare), y la reactividad se determinó mediante el uso de ELISA. Los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con bacterias y hongos gram-negativos se eliminaron por absorción de IgG purificada con bacterias y hongos gram-negativos fijados con formalina. Los organismos fijados con formalina se prepararon de forma similar a la descrita anteriormente y se mezclaron con IgG. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, la preparación se centrifugó para eliminar las bacterias y se repitió la absorción. La preparación final de anticuerpos se aclaró por centrifugación y se usó para la preparación de microesferas magnéticas específicas de antígeno.

Ejemplo 3: Preparación de microesferas magnéticas específicas de antígeno

Las microesferas superparamagnéticas se sintetizaron al encapsular nanopartículas de óxido de hierro (5-15 nm de diámetro) en un núcleo de látex y marcadas con IgG de cabra. Las nanopartículas que contienen ferrofluido en disolvente orgánico se precipitaron con etanol, las nanopartículas se suspendieron nuevamente en solución acuosa de estireno y tensioactivo Hitenol BC-10, y se emulsionaron mediante el uso de sonicación. La mezcla se dejó equilibrar durante la noche con agitación y se filtró a través de filtros de 1,2 y 0,45 μm para lograr un tamaño de micela uniforme. Se añadieron estireno, ácido acrílico y divinilbenceno en tampón de carbonato a pH 9,6. La polimerización se inició en una mezcla a 70 °C con la adición de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ y la reacción se dejó completar durante la noche. Las partículas sintetizadas se eliminaron 3 veces con SDS al 0,1 % mediante el uso de captura magnética, se filtraron a través de filtros de 1,2, 0,8 y 0,45 μm y se usaron para la conjugación de anticuerpos.

La producción de microesferas resultó en una distribución de tamaños que puede caracterizarse por un tamaño promedio y una desviación estándar. En el caso del marcado y la extracción de bacterias de la sangre, se encontró que el tamaño promedio para un rendimiento óptimo era entre 100 y 350 nm, por ejemplo, entre 200 nm y 250 nm.

Las IgG purificadas se conjugaron con microesferas preparadas mediante el uso de química estándar. Después de la conjugación, las microesferas se suspendieron nuevamente en BSA al 0,1 % que se usa para bloquear sitios de unión no específicos en la microesfera y para aumentar la estabilidad de la preparación de la microesfera.

Ejemplo 4: unión de anticuerpos específicos del objetivo a la superficie del canal de flujo

Los anticuerpos específicos del objetivo se unieron a una superficie de un canal de flujo mediante el uso del siguiente enfoque:

1. La superficie se trató con NaOH 5 M durante 30 minutos a 37 °C, seguido de enjuague con agua y absorción de estreptavidina, para recubrir la superficie con estreptavidina y proporcionar medios para unir anticuerpos biotinilados;
2. Los anticuerpos se biotinilaron mediante el uso de destiobiotina, se purificaron para eliminar el exceso de biotina y se unieron a la superficie a través de una unión específica a estreptavidina.

El uso de destiobiotina permite la elución de anticuerpos y, por lo tanto, la bacteria objetivo unida, mediante el uso de la elución competitiva con biotina no modificada. Se pueden utilizar otros métodos de elución, tal como la quelación de Ni²⁺, la proteína de unión a GST, etc.

Ejemplo 5: Separación del objetivo de los componentes restantes de la muestra

Las células objetivo marcadas magnéticamente mediante el uso de microesferas específicas de objetivo con el exceso de microesferas libres se inyectaron en un canal que tenía anticuerpos específicos del objetivo recubiertos en la superficie. Durante la etapa de inyección, se aplicó un campo magnético alterno mediante un sistema mecánico que movió imanes permanentes de NdFeB (3 barras dispuestas en orientación opuesta) a cada lado del canal, de manera que un imán estaba presente muy cerca solo en un lado del canal. La frecuencia del campo magnético alterno (1 Hz) se seleccionó para que los objetivos marcados tuvieran tiempo suficiente para alcanzar una o ambas superficies del canal varias veces, mientras que la mayoría de las microesferas libres no podrían alcanzar ninguna de las superficies del canal.

Ejemplo 6: Elución y análisis del objetivo.

Las bacterias unidas se eluyeron con solución de biotina 35 mM en B29, seguido de captura magnética y resuspensión en el tampón de detección que contenía goma de xantano. La concentración de bacterias en las muestras se analizó en un detector de RMN de flujo continuo. Los resultados indican que el número de bacterias detectadas fue directamente proporcional al número de bacterias añadidas a la sangre (Figura 3).

REIVINDICACIONES

1. Un método para separar y analizar un analito objetivo en una muestra, el método que comprende:
 5 poner en contacto la muestra con partículas magnéticas que comprenden restos de unión específica para el analito objetivo;
 hacer fluir la muestra a través de un canal que incluye los segundos restos específicos para el analito objetivo unido a al menos una superficie del canal mientras se aplican campos magnéticos alternos a una frecuencia seleccionada de manera que las partículas magnéticas libres no puedan atravesar el ancho del canal antes de que se alternen los campos magnéticos;
 10 capturar las partículas magnéticas que se unen a dicho analito objetivo en la al menos una superficie del canal;
 enjuagar dicho canal para eliminar los componentes no unidos de dicha muestra;
 liberar las partículas magnéticas capturadas de la superficie del canal; y
 analizar el analito objetivo unido a dichas partículas magnéticas liberadas, en el que el analito objetivo no se examina in situ en la superficie.
- 15 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análisis comprende el uso de uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en lisis, hibridación, citometría, NAT, PCR y RMN.
- 20 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el analito objetivo se selecciona del grupo que consiste en una bacteria, un virus, un hongo, una célula, una proteína y un ácido nucleico.
- 25 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los campos magnéticos alternos resultan del canal que se posiciona entre el primer y segundo conjuntos de imanes, en el que el canal permanece estacionario y el primer y segundo conjuntos de imanes se mueven para alternar cerca del canal, lo que produce de esta manera los campos magnéticos alternos.
- 30 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los campos magnéticos alternos resultan del canal que se posiciona entre el primer y segundo conjuntos de imanes, en el que el primer y segundo conjuntos de imanes permanecen estacionarios y el canal se mueve para alternar su proximidad al primer y segundo conjuntos de imanes, lo que produce de esta manera los campos magnéticos alternos.
- 35 6. Un método para detectar un analito objetivo en una muestra, el método que comprende:
 poner en contacto la muestra con partículas magnéticas que comprenden restos de unión específica para el analito objetivo;
 hacer fluir la muestra a través de un canal que incluye los segundos restos específicos para el analito objetivo unido a al menos una superficie del canal mientras se aplican campos magnéticos alternos a una frecuencia seleccionada de manera que las partículas magnéticas libres no puedan atravesar el ancho del canal antes de que se alternen los campos magnéticos;
 40 capturar las partículas magnéticas que se unen a dicho analito objetivo en la al menos una superficie del canal;
 enjuagar dicho canal para eliminar los componentes no unidos de dicha muestra;
 liberar las partículas magnéticas capturadas de la superficie del canal; y
 detectar el analito objetivo unido a dichas partículas magnéticas liberadas, en el que el analito objetivo no se examina in situ en la superficie.
- 45 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los campos magnéticos alternos resultan del canal que se posiciona entre el primer y segundo conjuntos de imanes, en el que el canal permanece estacionario y el primer y segundo conjuntos de imanes se mueven para alternar la proximidad del primer y segundo conjuntos de imanes al canal, lo que produce de esta manera campos magnéticos alternos.
- 50 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que los campos magnéticos alternos resultan del canal que se posiciona entre el primer y segundo conjuntos de imanes, en el que el primer y segundo conjuntos de imanes permanecen estacionarios y el canal se mueve para alternar su proximidad al primer y segundo conjuntos de imanes, lo que produce de esta manera los campos magnéticos alternos.
- 55 9. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la detección comprende el uso de uno o más procesos seleccionados del grupo que consiste en lisis, hibridación, citometría, NAT, PCR y RMN.
- 60 10. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en el que el analito objetivo es una bacteria.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en el que la muestra es tejido humano o fluido corporal.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el fluido corporal es sangre.
- 65 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 6, en el que los restos de unión se seleccionan del grupo que consiste en anticuerpos, receptores, aptámeros, proteínas y ligandos.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que los restos de unión son anticuerpos.

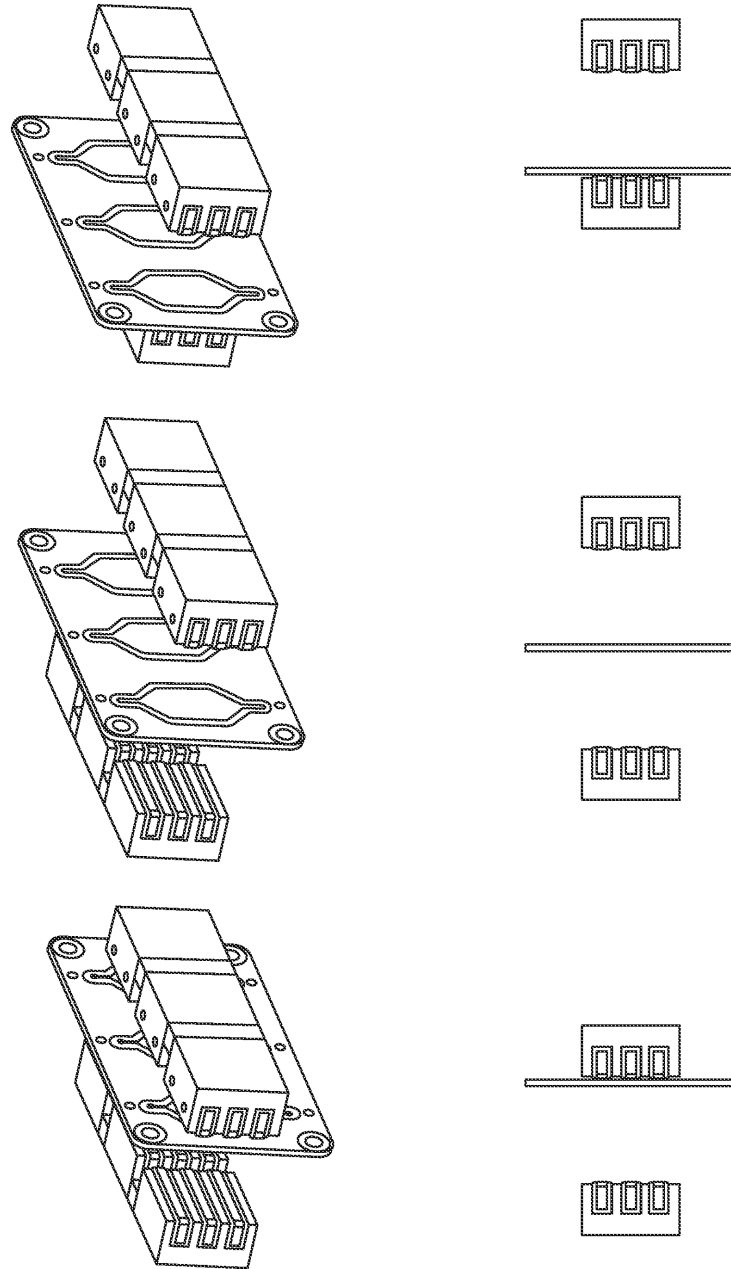


Figura 1

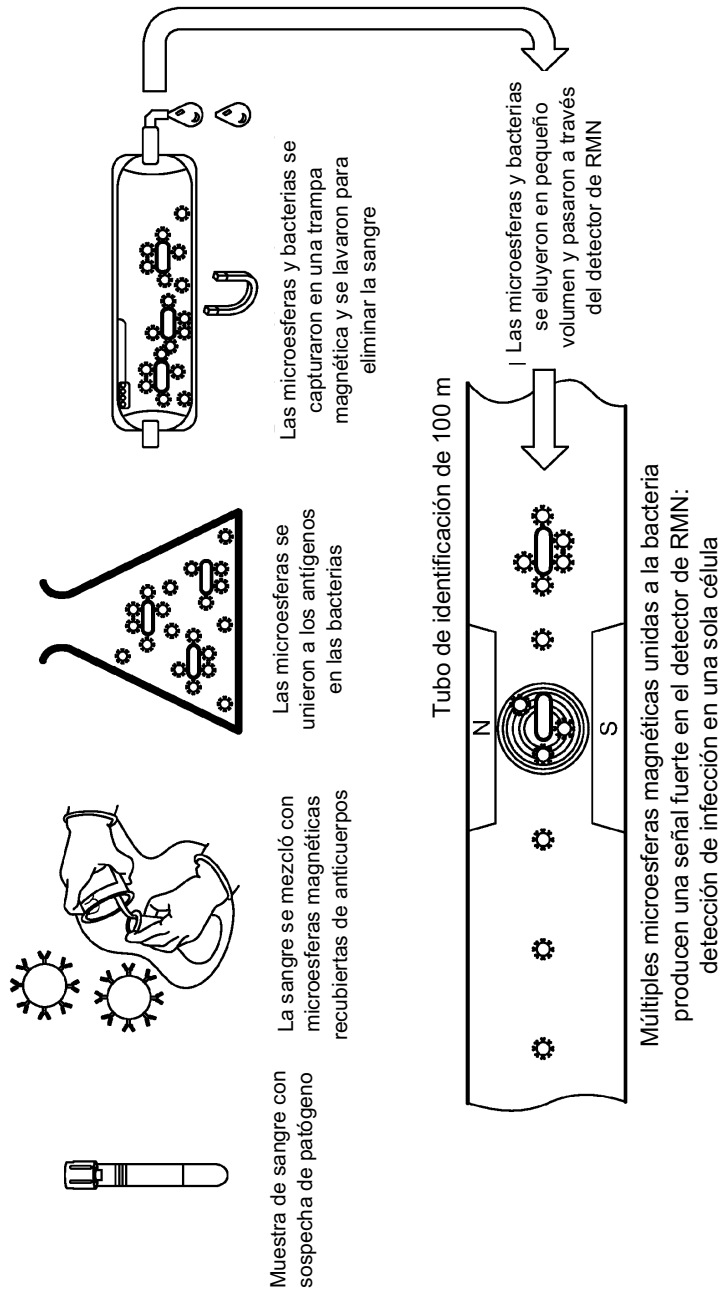


FIGURA 2 Panel A

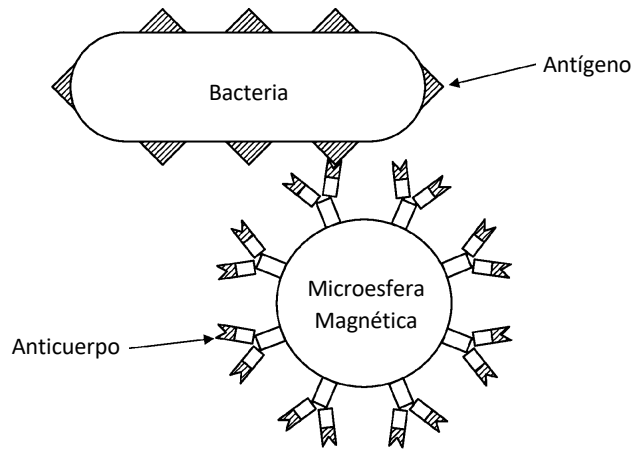


FIGURA 2 Panel B

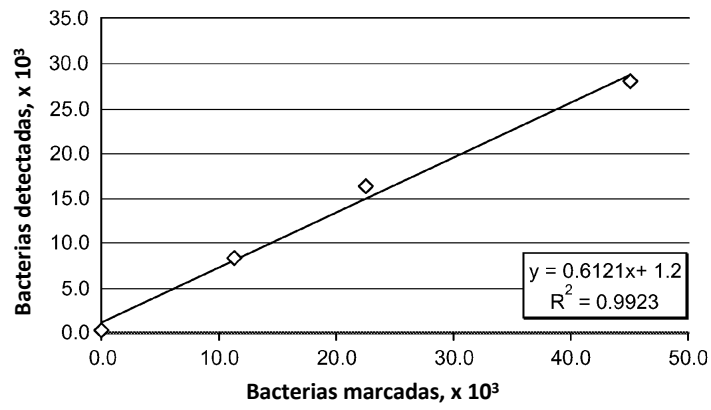


FIGURA 3