

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 423**

51 Int. Cl.:

B03C 1/00 (2006.01)

B03C 1/10 (2006.01)

C12N 13/00 (2006.01)

G01N 27/00 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/539 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.11.2017 PCT/US2017/060224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.05.2018 WO18085781**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2017 E 17867404 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.07.2021 EP 3535058**

54 Título: **Sistemas y procedimiento para retener sustancias en líquidos a grane**

30 Prioridad:

07.11.2016 US 201615345271

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

21.02.2022

73 Titular/es:

**WAVESENSE, INC (100.0%)
15339 Barranca Parkway
Irvine, CA 92618, US**

72 Inventor/es:

FEISTEL, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

MARTÍN SANTOS, Victoria Sofia

ES 2 895 423 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

5 Sistemas y procedimiento para retener sustancias en líquidos a grane

Antecedentes de la Invención

10 La presente invención se refiere a sistemas y procedimientos para identificar, separar y aislar analitos de interés, o impurezas sospechosas de estar presentes en una muestra líquida pero en cantidades típicamente demasiado bajas para detectarlas utilizando mecanismos de la técnica anterior. La invención se refiere además a sistemas y procedimientos para la detección y retención de analitos de interés, basados en parte en la reducción del volumen de la muestra en la que se cree que están presentes tales partículas, junto con la separación magnética de tales
15 analitos de interés.

Las técnicas de separación que son capaces de identificar macromoléculas biológicas específicas, células y similares (denominadas colectivamente como "partículas biológicas") son bien conocidas en la técnica y se usan ampliamente con fines analíticos y de purificación en investigación biológica, tecnología biomédica y aplicaciones de diagnóstico. En general, tales técnicas de separación se basan en una o más propiedades físicas y/o químicas de la
20 partícula biológica de interés que se busca identificar para capturar o aislar la partícula objetivo en una posición o área fija. Entre las propiedades que se han utilizado para facilitar la identificación y el aislamiento de partículas biológicas, se incluyen la densidad, el tamaño, la hidrofobicidad, la carga eléctrica y los grupos químicos de superficie operativos para reaccionar y unirse con otros materiales y/o agentes inmunológicos.

Ejemplos de tales técnicas incluyen: centrifugación, que puede usarse para separar componentes celulares basándose en su densidad relativa; cromatografía líquida, que implica hacer pasar una muestra por una columna de partículas empaquetadas que tienen una química de superficie y/o porosidad definidas, que son operativas para interactuar y retener las partículas biológicas de interés; y electroforesis en gel, que es operativa para separar macromoléculas biológicas mediante la aplicación de un campo eléctrico, que a su vez afecta la movilidad de tales moléculas para moverse a través del gel en una o dos dimensiones basadas en la relación carga - masa de la macromolécula de interés.

También se aplica con frecuencia en técnicas de separación microfluídicas, que operan según el principio de manipulación y control de fluidos, generalmente en el intervalo de microlitros a picolitros, en redes de canales de diferentes diámetros, que oscilan en general entre 5 y 500 μm . Estas dimensiones reducidas se eligen selectivamente de modo que las partículas de una muestra de fluido, o las partículas suspendidas en la muestra de fluido, se vuelvan de tamaño comparable con el propio aparato microfluídico. En una escala reducida, los fluidos se dirigen, mezclan, separan o manipulan de otro modo para lograr sistemas de multiplexión, automatización y alto rendimiento. La microdinámica de fluidos puede permitir el análisis y el uso de muestras de volúmenes mucho menores, así como también cantidades correspondientemente menores de cualquier producto químico y reactivo utilizado con ellos, y tienen la capacidad de procesar y analizar muestras con una menor manipulación de la muestra.

Además de tales técnicas, se han utilizado sistemas y procedimientos para detectar macromoléculas biológicas y células de interés usando partículas magnéticas que funcionan para interactuar con un campo magnético aplicado. En una aplicación típica, las partículas magnéticas llevarán un ligando en sus superficies que permite que la partícula se una específicamente a una macromolécula biológica de interés. En la aplicación, tales partículas magnéticas se añaden a una muestra y se les permite unirse con la macromolécula de interés, después de lo cual se aplica un campo magnético que permite que las partículas magnéticas y las macromoléculas unidas de interés se separen del resto de la muestra. La macromolécula capturada de interés luego se mide mediante detección, como con la emisión basada en fluorescencia, y se puede utilizar junto con el análisis de citometría de flujo.

Las referencias que son ejemplos del estado de la técnica con respecto a la separación de macromoléculas biológicas, células y similares se establecen en las siguientes patentes concedidas y en las solicitudes de patente publicadas:

- Patente de los Estados Unidos de América N°. 6,479,302 B1, titulada METHOD FOR THE IMMUNOLOGICAL DETERMINATION OF AN ANALYTE [MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN INMUNOLÓGICA DE UN ANALITO], concedida el 12 de noviembre de 2002 a nombre de Bernd Dremel.
- Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América No. 2006/0223178 A1, titulada DEVICES AND METHODS FOR MAGNETIC ENRICHMENT OF CELLS AND OTHER PARTICLES [DISPOSITIVOS Y MÉTODOS PARA EL ENRIQUECIMIENTO MAGNÉTICO DE CÉLULAS Y OTRAS PARTÍCULAS], publicada el 05 de octubre de 2006 a Barber et al.

- 5 • Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América N°. 2007/0166835 A1, titulada MULTIPLEX ASSAYS USING MAGNETIC AND NON - MAGNETIC PARTICLES [ENSAYOS MULTIPLEX UTILIZANDO PARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y NO MAGNÉTICAS], publicada el 19 de julio de 2007 a nombre de Mark N. Bobrow.
- 10 • Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América N°. 2010/0047766 A1, titulada ANALYTE MANIPULATION AND DETECTION [MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ANALITOS], publicada el 25 de febrero de 2010 a nombre de Barrault et al.
- 15 • Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América N°. 2010/0233675 A1, titulada ANALYTE MANIPULATION AND DETECTION [MANIPULACIÓN Y DETECCIÓN DE ANALITOS], publicada el 16 de septiembre de 2010 a nombre de Barrault et al.
- 20 • Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América N°. 2012/0132593 A1, titulada SYSTEMS AND METHODS FOR MAGNETIC SEPARATION OF BIOLOGICAL MATERIALS [SISTEMAS Y MÉTODOS PARA LA SEPARACIÓN MAGNÉTICA DE MATERIALES BIOLÓGICOS], publicada el 31 de mayo de 2012 a nombre de Murthy et al.
- 25 • Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América N°. 2012/0270331 A1, titulada MICROFLUIDIC SYSTEM AND METHOD FOR AUTOMATED PROCESSING OF PARTICLES FROM BIOLOGICAL FLUID [SISTEMA Y MÉTODO DE MICROFLUIDOS PARA EL PROCESAMIENTO AUTOMÁTICO DE PARTÍCULAS DE FLUIDOS BIOLÓGICOS], publicada el 25 de octubre de 2012 a nombre de Achrol et al.
- 30 • Solicitud de Patente publicada de los Estados Unidos de América N°. 2016/0184737 A1, titulada NEW PROCESS AND SYSTEM FOR MAGNETIC SEPARATION [NUEVO PROCESO Y SISTEMA DE SEPARACIÓN MAGNÉTICA], publicado el 30 de junio de 2016 a nombre de Oscarsson et al.

30 A pesar de la eficacia general de las metodologías mencionadas anteriormente, a menudo el analito de interés, a pesar de estar presente en una muestra, se encuentra en cantidades demasiado bajas para detectarse utilizando tales técnicas de la técnica anterior. En este sentido, estos procedimientos a menudo son incapaces de concentrar o enriquecer una muestra lo suficiente como para permitir el análisis de componentes raros que puedan estar presentes en la muestra. Además, tales metodologías pueden resultar en pérdidas inaceptables de componentes raros, como puede ocurrir a través de una separación o degradación ineficiente de las partículas biológicas de interés. Quizás bien conocidos y ejemplares de las deficiencias asociadas con el hallazgo de analitos raros y difíciles de identificar es la identificación de células tumorales circulantes (CTC), como se explica con más detalle en el siguiente enlace: https://en.wikipedia.org/wiki/Circulating_tumor_cell on the Wikipedia website.

40 Por ejemplo, el flujo microfluídico a través del diseño, como se muestra en la figura 1, es bien reconocido como ineficiente y lento. Tal y como se analizó anteriormente, el diseño habitual de microfluidos implica un trazado 10 que define una vía 12 a través de la cual fluye una muestra de fluido, como se indica la dirección A. Múltiples analitos 14 presentes en una muestra de fluido, así como analitos de interés 16 que se buscan detectar, se hacen pasar más allá de las barreras, canales de flujo, rejillas y similares, representados con el número 18, por lo que las barreras físicas proporcionadas por tal estructura 18 son operativas para controlar selectivamente la velocidad y la posición por la cual los analitos fluyen a través del sistema. El mejor procedimiento tarda 15 horas para procesar 7,5 ml de sangre completa y produce solo un 40% de recuperación.

50 Estos procedimientos no son adecuados para aplicaciones a escala comercial, como la detección de células cancerosas en pacientes. Véase por ejemplo, Miyamoto, D.T., et al. Nat. Rev. Clin. Oncol. 11, 401 - 412 (2014). "Los estudios han demostrado que el uso del chip HB-Chip sobre el chip CTC tiene varias ventajas para capturar las células tumorales circulantes. Primero, el HB - Chip tiene la capacidad de filtrar la sangre a velocidades de flujo más altas que el chip CTC a la vez que mantiene su eficiencia. A velocidades de flujo bajas, alrededor de 0,12 ml/h, la eficiencia de captura de la célula para el Chip-HB promedia el 79 %, mientras que los dispositivos de cámara plana, como el chip CTC, promedian el 29 %. Cuando las velocidades de flujo alcanzan hasta 0,48 ml / h, el Chip-HB gestiona una eficiencia de captura de células de más del 40 %, mientras que la eficiencia promedio de un chip CTC a esta tasa es de alrededor de 8 %".

60 Con respecto a los inconvenientes asociados con las técnicas de separación magnética, en las figuras 2 a 5 se muestra cómo tales técnicas de separación magnética son ineficaces para extraer y aislar eficazmente la partícula / macromolécula biológica de interés. Tal y como se mencionó anteriormente, la capacidad para acoplar partículas paramagnéticas para capturar los analitos de interés es bien conocida en la técnica, y como se muestra en la figura 2, se muestra un recipiente 20 con una muestra de líquido a granel que contiene múltiples analitos 22 y partículas paramagnéticas 24 que se unen al analito de interés. Basada en la capacidad de atraer las partículas paramagnéticas a través de la aplicación de un campo magnético, sirve así como base para separar dichas partículas junto con los analitos de interés unidos; sin embargo, la aplicación de campos magnéticos de la técnica anterior a tal sistema es subóptima.

En relación con respecto a la figura 3, que utiliza un pequeño imán 30 que produce un pequeño campo magnético estático 32 alrededor de un área seleccionada del dispositivo 20 de recolección de muestras, es fácilmente reconocible que enfocar el objetivo [o interés] en un área pequeña usando un pequeño campo magnético estático no es efectivo. Debido a la pérdida exponencial de la intensidad del campo magnético con la distancia desde la fuente magnética, una fuente magnética pequeña, tal como 30, no puede proyectar un campo magnético 32 suficiente para penetrar en toda la muestra. Un enfoque de este tipo se basa en la difusión aleatoria del objetivo en las fuerzas de atracción del campo magnético 32. Este enfoque está además en desventaja debido a la necesidad de transferir el objetivo a un recipiente de reacción mucho más pequeño para su posterior análisis.

Alternativamente, como se muestra en la figura 4, el uso de un imán más grande 34 para producir un campo magnético 36 correspondientemente más grande que penetra en todo el volumen de la muestra atrae inherentemente el objetivo a un área de captura proporcionalmente grande que complica o frustra los intentos de consolidar objetivos raros tal como 24 en un volumen adecuado para cámaras de análisis. En este sentido, el campo magnético 36 y la subsiguiente zona de captura tienen un área de superficie demasiado grande para aislar y concentrar de eficazmente el analito 24 buscado.

Con referencia ahora a la figura 5, se muestra una técnica de separación magnética adicional mediante la cual una fuente magnética 40 se sumerge en una muestra para aumentar la eficacia del campo magnético 42 para atraer al analito de interés (es decir, macromolécula o célula biológica) 24; sin embargo, el desafío de transferir el objetivo 24 desde el imán 40 y resuspender el analito de interés en un recipiente de volumen mucho más pequeño puede dar como resultado la pérdida, daño y/o degradación de la partícula biológica de interés.

Para solucionar esta deficiencia, la técnica anterior se ha basado en dispositivos y procedimientos mecánicos de tipo envoltura o funda mediante los cuales se coloca una funda entre la fuente magnética y el objetivo de tal manera que el objetivo se adhiera a la superficie de la funda, lo que permite retirar el imán. Inevitablemente, este enfoque hace que el analito de interés se extienda sobre una gran área de superficie, lo que a su vez requiere el retiro del analito de interés de la vaina usando un volumen de lavado, creando así una solución diluida del analito.

Incluso después de que las técnicas más efectivas se usan para enriquecer o elevar al máximo la concentración de la población de partículas biológicas de interés en una muestra determinada, el volumen de la muestra sigue siendo demasiado grande para permitir una investigación precisa y exhaustiva de si la partícula está o no presente, y mucho menos en qué grado. Por ejemplo, de una muestra de espécimen de 7,5 ml, con el fin de realizar la PCR (es decir, la reacción en cadena de polimerasa para el análisis de secuencias cortas de ADN o ARN), se requiere una reducción de volumen de 60x a 1500x en la medida en que se sabe que la PCR tiene un volumen de trabajo de 0,005 a 0,125 ml, y un volumen máximo de 0,20 ml.

De manera similar, los portaobjetos de microscopio típicamente suelen tener un volumen de trabajo de aproximadamente 0,002 a 0,007 ml y un volumen máximo de 0,020 ml, y requerirían una reducción de volumen de 1071x a 3750x de una muestra de 7,5 ml para alcanzar un volumen manejable. Aún más, para las pruebas realizadas en micropocillos, cada micropocillo tiene habitualmente un volumen de trabajo de 0,075 a 0,200 ml, y un volumen máximo de 0,36 ml. Por lo tanto, se requeriría una reducción de volumen de 37,5x a 100x para que la muestra sea adecuada.

En consecuencia, existe una necesidad sustancial en la técnica de sistemas y procedimientos que puedan detectar, separar y aislar de manera efectiva los analitos objetivo de interés, y en particular macromoléculas biológicas y células de interés que puedan estar presentes en cantidades muy bajas, por lo que una muestra o espécimen grande, a granel, se reduce tanto en volumen hasta un volumen de trabajo aceptable y el analito de interés de interés se concentra o enriquece en la misma.

Existe una necesidad adicional de tales sistemas y procedimientos que puedan utilizar procedimientos magnéticos y otros procedimientos de enriquecimiento para aumentar la concentración o la presencia de un analito objetivo de interés en una muestra que se reduzca de un primer volumen grande o masivo a un volumen de trabajo aceptable. Tales sistemas y procedimientos mejorados son además, preferiblemente de un diseño simple, fáciles de operar, pueden producir resultados altamente precisos y reproducibles, son relativamente económicos y eficientes en tiempo y son excepcionalmente efectivos para detectar, separar y aislar analitos objetivo de interés de una manera que se minimice la pérdida de la muestra y/o la posible contaminación o degradación del analito de interés.

Breve resumen

La presente invención aborda específicamente y alivia las deficiencias anteriormente identificadas en la técnica. En este sentido, la presente invención se refiere a un sistema y al uso de este sistema para detectar la presencia de un analito de interés dentro de una muestra líquida a través de la retención del analito de interés dentro de un volumen sustancialmente reducido de la muestra de fluido, que a su vez facilita enormemente la capacidad de detectar el analito en comparación con los medios convencionales.

Para lograr ese fin, se proporciona un conjunto [montaje] de cámara de muestras que es operativo para recibir una muestra de fluido a granel y finalmente concentrar o enriquecer un analito objetivo de interés dentro de un volumen sustancialmente reducido la muestra de fluido. Según una realización preferida, el conjunto de cámara de muestras comprende la combinación de un depósito de muestras a granel que se puede interconectar operativamente con al menos un vértice. Tales componentes están configurados preferiblemente de modo que el depósito tenga un volumen mayor que el de al menos un vértice unido al mismo. Además, se proporciona una cápsula magnética que es operativa para acoplarse con la parte de vértice del conjunto de cámara de la muestra e impartirle un campo magnético. A este respecto, la cápsula magnética está diseñada preferiblemente para poder posicionarse axialmente alrededor del vértice para aplicar una fuerza de atracción magnética en su interior.

En uso, se introduce una muestra líquida que contiene un analito de interés en el depósito de la muestra a granel, junto con materiales paramagnéticos que son operativos para unirse selectivamente con el analito de interés que se busca detectar. En este sentido, se cree que el analito de interés puede tomar cualquiera de una variedad de moléculas, sustancias químicas, agentes físicos y similares, y en particular puede incluir materiales biológicos, y en particular macromoléculas biológicas, células y similares, colectivamente denominadas partículas biológicas.

La muestra líquida con partículas paramagnéticas específicas para el analito de interés se introduce en el depósito de la muestra a granel y el vértice se interconecta posteriormente al mismo para definir el conjunto de la cámara de muestras. En una realización preferida, se captura un volumen de aire u otro gas dentro del conjunto de cámara de muestras para facilitar la capacidad de la muestra líquida contenida en el mismo para mezclarse completamente y permitir que circule completamente a través del conjunto de cámaras de muestras, interconectadas de manera para permitir que las partículas paramagnéticas se unan con el analito objetivo de interés.

De acuerdo con una realización preferida, la cantidad de aire o gas que se permite que permanezca dentro de la cámara de muestras puede variar entre el 10% y el 50% del volumen total, y en una realización más altamente preferida puede variar entre el 40% y el 20%. En una forma de realización sumamente preferida, la cantidad de aire o gas presente en el conjunto de cámara de muestras varía del 25 % al 35 %. Al mismo tiempo que o después de la etapa de mezclado, la cápsula magnética está interconectada con el vértice y es operativa para impartir fuerzas magnéticamente atractivas a la misma para reaccionar, extraer y retener los materiales paramagnéticos dentro del interior del vértice. En virtud de la atracción magnética, una parte sustancial, y preferiblemente al menos la mayoría de los materiales paramagnéticos, así como el analito de interés unido a los mismos, se retendrán dentro del vértice.

Además, en virtud del volumen reducido del vértice en relación con el depósito de muestras a granel, la cantidad de muestra líquida dentro de la cual están contenidas las partículas paramagnéticas retenidas (y por lo tanto el analito de interés) se reduce sustancialmente con respecto al volumen total de la muestra introducida en el conjunto de cámara de muestras. Al reducir el volumen, así como enriquecer la presencia del analito de interés en el mismo, el analito de interés se identifica y cuantifica más fácilmente y más fácilmente en relación con los procedimientos de la técnica anterior.

En refinamientos adicionales de la invención, se contempla que dos o más vértices desmontables puedan interconectarse con el depósito de muestras, con cada vértice respectivo acoplable con una cápsula magnética dedicada para facilitar la capacidad de retener partículas paramagnéticas, y posiblemente detectar dos o más analitos de interés diferentes dentro de una sola muestra de fluido.

Además, se contempla que, dependiendo del tipo de analito que se busca detectar, se pueden realizar modificaciones en la cantidad del aire o gas contenido dentro del conjunto de cámara de muestras, el tipo de gas usado, por ejemplo, 5 % de CO₂, la duración del mezclado, el tipo de mezcla y la intensidad de tal mezclado, todo lo cual se puede controlar selectivamente. Además, se contempla que ciertas reacciones operativas para facilitar la detección de un analito de interés pueden producirse dentro del conjunto de cámara de muestras mediante de la introducción de aditivos químicos, tales como detergentes, tampones, conservantes, catalizadores tales como enzimas, restos detectables y muchos otros bien conocidos por los expertos en la materia.

Aún más, en la medida deseada, el conjunto de cámara de muestras se puede someter operativamente a energía térmica, tal como calentamiento, energía electromagnética, incluida radiación ultravioleta o infrarroja, microondas y similares, y/o energía o fuerzas mecánicas, tales como ultrasonido, centrifugación y similares. En ese sentido, la presente invención contempla cualquier fuerza o energía que se desee para facilitar la mezcla o para inducir una reacción deseada para facilitar:

- 1) la capacidad de un analito de interés para reaccionar finalmente con una partícula magnética; y
- 2) quedar retenido dentro de un vértice puede ser desplegado.

La invención que aquí se presentada proporciona así un sistema simple, universal y escalable para retener objetivos raros disueltos, suspendidos o dispersos en grandes volúmenes de líquidos sin depender de flujos de trabajo complejos, dinámica de precisión de fluidos y tiempos de trabajo excesivos asociados con la técnica anterior. La invención es útil para extender el límite inferior de detección, asociado con los procedimientos de separación magnética de la técnica anterior al aumentar en gran medida el volumen de muestra que puede procesarse

fácilmente de una vez utilizando una cámara de muestras única provista de un solo vértice o pluralidad de vértices y campo (s) magnético (s) enfocado (s) externos al vértice o vértices. La invención también se puede usar en aplicaciones no analíticas para aumentar la eficiencia para eliminar impurezas de una solución a granel o para recuperar materiales raros de alto valor tales como catalizadores dispersos usados en procesos industriales.

5

Breve descripción de los dibujos

10 Estas y otras características y ventajas de las diversas realizaciones descritas en el presente documento se comprenderán mejor con respecto a la siguiente descripción y figuras, en las que los números similares se refieren a partes similares en todas partes y en los que:

15 La figura 1 ilustra un procedimiento de microfluidos representativo de la técnica anterior para separar un analito de interés de una muestra de fluido a granel.

La figura 2 ilustra un recipiente con una muestra de fluido a granel que contiene múltiples analitos y analitos de interés que se unen a partículas paramagnéticas.

20 La figura 3 ilustra el recipiente de la figura 2 con una muestra de fluido a granel que contiene múltiples analitos y analitos de interés que se unen a partículas paramagnéticas en la proximidad de una fuente magnética que produce un pequeño flujo magnético.

25 La figura 4 ilustra el recipiente de la figura 2 con una muestra de fluido a granel que contiene múltiples analitos y analitos de interés que se unen a partículas paramagnéticas en la proximidad de una fuente magnética que produce un gran flujo magnético.

30 La figura 5 ilustra el recipiente de la figura 2 con una muestra de fluido a granel que contiene múltiples analitos y analitos de interés que se unen a partículas paramagnéticas que además tienen una fuente magnética sumergida en la misma, que produce un gran flujo magnético.

La figura 6 es una vista en perspectiva despiezada de los componentes ejemplares del sistema de la presente invención.

35 La figura 7 es una vista en sección transversal despiezada de los componentes del sistema de la figura 6 que tiene una muestra de fluido a granel colocada dentro de su componente de depósito de muestras a granel.

40 La figura 8 es una vista en sección transversal de los componentes del sistema de la figura 7, en la que los componentes están interconectados operativamente entre sí para analizar una muestra de fluido a granel.

45 La figura 9 es una vista en sección transversal despiezada de los componentes del sistema de la figura 8, en la que una parte de los analitos de interés presentes en la muestra de fluido a granel se muestra separada y retenida magnéticamente dentro del componente del vértice mediante la cápsula magnética adjunta del sistema.

La figura 10 es una vista en sección transversal despiezada del vértice y la cápsula magnética de la figura 9 que ilustra la extracción del vértice de la cápsula magnética.

50 La figura 11 es la vista en sección transversal de la figura 8, que ilustra la cámara de muestras que contiene la muestra en movimiento rotacional durante un intervalo de mezclado.

55 La figura 12, la vista en sección transversal de la figura 11, que ilustra la cámara de muestras interconectada y el conjunto de cápsula magnética con la muestra en movimiento, durante un intervalo de retención del objetivo.

La figura 13 es una vista en perspectiva despiezada de los componentes ejemplares de una segunda realización del sistema de la presente invención.

60 La figura 14 es una vista en sección transversal de los componentes del sistema de la figura 13, en la que los componentes están interconectados operativamente entre sí para analizar una muestra de fluido de orina.

Descripción detallada

La descripción detallada que se expone a continuación pretende ser una descripción de la realización actualmente preferida de la invención, y no pretende representar la única forma en la que se puede implementar o realizar la presente invención. La descripción establece las funciones y secuencias de etapas para practicar la invención. Debe entenderse, sin embargo, que las funciones y secuencias iguales o equivalentes pueden lograrse mediante diferentes realizaciones y que también se pretende que estén incluidas dentro del alcance de la invención.

Con referencia ahora a las figuras 6 a 12, e inicialmente a la figura 6, se muestra un sistema 100 para su uso para facilitar la detección, separación y aislamiento de un analito de interés que se sospecha que está presente en una muestra de fluido a granel. Según el sistema 100, se proporciona un depósito de muestras a granel 102 que es operativo para interconectarse con un vértice 120. El depósito de muestras 102 incluye un interior 104 que define un volumen para recibir la muestra de fluido a granel. El depósito de muestras 102 incluye además un extremo proximal 108 configurado con un collar u otra estructura de tipo similar para interconectarse con el vértice 120, que se describe con más detalle a continuación. En la realización mostrada, el extremo más distal 106 puede configurarse para tener una configuración generalmente troncocónica [ahusada] para facilitar el uso del depósito de muestras en otras aplicaciones de separación, tales como reacciones de centrifugación o precipitación.

Con respecto al vértice 120, el mismo está provisto de una superficie de acoplamiento proximal 124 operativa para interconectarse con 108 del depósito de muestra 102. El vértice 120 incluye además una parte interior 122 que define un volumen que es menor que el del volumen 104 definido dentro del interior del depósito de muestras 102. El extremo más distal 126 del vértice 120 también puede asumir una configuración troncocónica para ayudar con otras aplicaciones, tales como la centrifugación, para usarse en la separación de materiales contenidos en el mismo, que también se describen con más detalle a continuación.

El sistema 100 incluye además una cápsula magnética 130 que incluye al menos uno, y preferiblemente una pluralidad de imanes dispuestos radialmente alrededor de un canal interior 132. A este respecto, el canal 132 funciona para recibir axialmente el vértice 120 e impartir un flujo magnético hacia el interior para su uso para facilitar la retención de un analito objetivo de interés mediante el uso de partículas paramagnéticas que se discute más detalladamente a continuación.

Si se muestra con que tiene estructuras de tubos de ensayo convencionales, se debe entender que el depósito de muestras 102 y el vértice 120 que se pueden interconectar con él pueden tomar cualquiera de una variedad de formas y tamaños, y no necesariamente deben tomar las estructuras cilíndricas como se muestra. A este respecto, siempre que el vértice esté diseñado para tener un volumen interior más pequeño que el del depósito de muestra 102 y además sea operativo para acoplarse con una cápsula magnética 130 de modo que esta última pueda impartir un flujo magnético a la misma, todas las variaciones en las formas y tamaños se deben considerar para estar bien dentro del nivel de habilidad del experto en la materia.

Además, se contempla que el sistema 100 puede incluir dos o más vértices que pueden interconectarse con el depósito de muestra a granel 102 en diferentes ubicaciones, según se desee, para separar analitos diferentes y/o retener secuencialmente uno o más analitos de interés, según se desee. Asimismo, se entiende que los materiales usados para fabricar los componentes, 102, 120 y 130 del sistema 100 pueden tomar cualquiera de una variedad bien conocida en la técnica, que puede incluir ciertos plásticos, artículos de vidrio y similares, como puede ser bien adecuado para una aplicación de separación particular. De nuevo, la elección de los materiales para su uso en una aplicación particular está dentro de la habilidad del experto en la materia.

Con referencia ahora a la figura 7, se muestra el uso del sistema 100 en la etapa inicial de un proceso para separar un analito de interés de interés que se sospecha que está presente en una muestra de fluido a granel. Tal y como se ilustra, una muestra de fluido que contiene múltiples analitos 22 es recibida dentro del depósito de muestras a granel 102. Adicionalmente, se incluyen materiales paramagnéticos que son operativos para unirse con un analito de interés que se sospecha que está presente dentro de la muestra de fluido.

El uso de partículas magnéticas y la capacidad para diseñar las mismas de manera que tales partículas se unen específicamente con un analito de interés de interés, son bien conocidos y comprendidos fácilmente en la técnica, tal y como se señala en los "antecedentes", e incluye todos y cada uno de los mecanismos, tales como el uso de ligandos, receptores, quelatos, parejas de enlace y cualquier otro mecanismo conocido en la técnica para facilitar la formación de un complejo entre las partículas paramagnéticas y el analito de interés. El complejo formado por una partícula paramagnética y el analito de interés de interés a través de un ligando se representa por 24 en las figuras como se muestra.

Tal muestra a granel puede tomar cualquiera de una variedad de muestras líquidas que podrían incluir un analito de interés que se pretende detectar y, si se desea, separar y aislar posteriormente. Por consiguiente, debe entenderse que el analito de interés podría incluir cualquier tipo de molécula, partícula, sustancia y similares. Se contempla particularmente que el analito de interés, acoplado a la partícula paramagnética 24 incluirá macromoléculas biológicas, tales como segmentos de ADN, ARN, proteínas, péptidos, estructuras intracelulares, tipos específicos de células tales como células cancerosas y similares, todas las cuales se denominan colectivamente partículas biológicas. A este respecto, se contempla que el sistema 100 y los procedimientos de uso del mismo serán particularmente adecuados para aplicaciones de ciencias de la vida en las que se buscan detectar tipos específicos

de partículas biológicas raras que de otro modo serían significativamente difíciles de encontrar.

La figura 7 muestra además la posición y orientación del vértice 120 que se puede acoplar con el depósito de muestras a granel 102 una vez que la muestra de fluido a granel se recibe en su interior. Es importante destacar que, en virtud de la interconexión entre el vértice 120 y el depósito de muestras 102, un volumen de aire o gas, contenido dentro del interior 122 del vértice 120 se introducirá en la cámara de muestras una vez que esos componentes 102, 120 estén interconectados.

Actualmente, se cree que el volumen de aire capturado dentro de la cámara de la muestra, definido por los volúmenes interiores 122 y 104 como se muestra en la figura 8, estará presente en una cantidad que oscila entre el 10 % y el 50 % del volumen total de la cámara de muestras. En una realización más altamente preferida, el aire / gas estará presente en el intervalo de 20 % a 40 % del volumen total, y en una realización más altamente preferida varía de 25 % a 35 % del volumen total. En este sentido, la inclusión del espacio para aire y/o gas es crucial para permitir una mezcla adecuada dentro de la cámara de la muestras, para permitir que los materiales paramagnéticos con el analito de interés unido a los mismos circulen completamente por toda la cámara de la muestras y, en última instancia, se sometan al campo magnético impartido por la cápsula magnética 130, que se analiza con más detalle a continuación.

Asimismo, el tipo de aire y/o gas que queda para llenar el volumen restante del conjunto de cámara de muestras cuando el depósito de muestras 102 está interconectado con el vértice 120 se puede elegir de forma selectiva para una aplicación particular. Por ejemplo, se pueden utilizar gases inertes como el nitrógeno o el helio en ciertas aplicaciones en las que se podría producir el riesgo de oxidación en el analito de interés que se pretende detectar. Se cree que los tipos y volúmenes de gases usados de este modo se encuentran dentro del ámbito de un experto en la materia.

Como comprenderán fácilmente los expertos en la materia, dependiendo del tipo particular de analitos de interés que se pretenda detectar, se pueden realizar numerosos parámetros y ajustes para facilitar la capacidad de los materiales paramagnéticos para unirse al analito objetivo de interés y/o facilitar la capacidad del analito de interés para sea detectado más fácilmente y rápidamente a través de la interacción con las partículas paramagnéticas. Con este fin, debe entenderse que la muestra de fluido a granel introducida en el depósito de muestras 102 como se muestra en la figura 7 se puede mezclar adicionalmente con otros materiales, como agentes químicos, aditivos, detergentes, tampones, conservantes, catalizadores (tales como enzimas y similares), una o más restos detectables y/o agentes formadores de complejos que pueden ser adecuados para una prueba particular o para la detección de un analito particular.

Además, se apreciará que la cápsula magnética 130 también se diseñará para impartir un flujo magnético o campo suficientemente al rededor del vértice 120, que se discutirá más detalladamente a continuación, para crear así una fuerza magnética lo suficientemente fuerte como para interactuar, atraer y retener las partículas magnéticas unidas al analito de interés 24. Con este fin, se cree que una amplia variedad de disposiciones de imanes puede ser diseñada fácilmente por un experto en la materia, por lo que los elementos magnéticos dispuestos dentro de la cápsula magnética 130 están orientados para dirigir un campo magnético dentro del interior 122 del vértice 120. Por ejemplo, se contempla que una serie de elementos magnéticos pueden estar dispuestos radialmente alrededor de la cápsula magnética 130 y orientarse de manera que sus polos impartan el campo magnético deseado al interior 12 del vértice 120.

Además se contempla que se puedan utilizar una variedad de imanes de tipo de anillo e imanes con múltiples orientaciones polares para impartir el grado deseado y necesario de fuerza magnética para atraer y retener las partículas magnéticas complejadas con el analito de interés de interés 24. Para ello, se contempla que los tipos de imanes, la fuerza magnética de los imanes, la orientación de los imanes con respecto a las dimensiones interiores 122 del vértice 120, la viscosidad de la muestra de fluido que se está analizando y el tipo y la concentración de las partículas paramagnéticas utilizadas para una aplicación particular, se elegirán todas selectivamente para lograr un grado óptimo de detección del analito de interés 24.

Con referencia ahora a la figura 8, se muestra el vértice 120 como interconectado con el depósito de muestras a granel 102. La interconexión entre el vértice 120 y el depósito de muestras 102 define un conjunto de cámara de muestras como se observa. En tal configuración, se permite que la muestra de fluido que contiene ambos analitos el complejo partícula paramagnética: analito de interés 24 circule libremente dentro de las partes interiores combinadas 104 y 122 de los componentes interconectados, 102, 120. Mientras se encuentra en tal configuración, la cápsula magnética 130 se coloca axialmente sobre el vértice 120 a través de la inserción del vértice 120 a través de la abertura axial 132, como se muestra.

Basándose en su proximidad, los elementos magnéticos dispuestos dentro de la cápsula magnética 130 impartan selectivamente un flujo magnético que es operativo para retener el complejo partícula paramagnética: analito de interés 24 como se muestra. A este respecto, en virtud de la atracción entre el campo magnético y las partículas magnéticas, una parte sustancial, y preferiblemente al menos una mayoría de tales partículas que tienen el analito de interés unido a las mismas 24, se retendrán dentro del vértice 120.

Tal y como apreciarán fácilmente los expertos en la materia, para retener los materiales paramagnéticos dentro del vértice 120, se contempla que el interior del vértice 120 puede tratarse en la superficie con receptores, ciertos materiales y similares para permitir así que los materiales paramagnéticos permanezcan retenidos una vez atraídos magnéticamente a los mismos. Los expertos en la materia también fácilmente comprenderán otras modificaciones que posiblemente podrían facilitar la capacidad de los materiales paramagnéticos para permanecer dentro del vértice 120 una vez atraídos por la acción de la cápsula magnética 130.

Una vez que estén suficientemente contenidas dentro del vértice 120, las partículas paramagnéticas que tienen el analito de interés unido 24 a las mismas continuarán siendo retenidas en el mismo, siempre y cuando la cápsula magnética 130 sea operativa para impartir el campo magnético de retención, como se muestra en la figura 9. Cuando está en tal configuración, el vértice 120 puede retirarse del depósito de muestra a granel 102 para retirar así sustancialmente el analito de interés del líquido de la muestra a granel. El analito de interés retenido 24, capturado dentro del vértice 120, puede separarse y aislarse adicionalmente retirando la cápsula magnética 130 y permitiendo que el analito de interés sea resuspendido en un volumen mínimo de fluido o se procese en seco, según la aplicación específica, como se muestra en la figura 10.

Un aspecto adicional de la presente solicitud que se cree que es importante para obtener resultados óptimos incluye varias consideraciones con respecto a los posibles tiempos de incubación, los intervalos de mezcla, la intensidad del mezclado y la aplicación de energía mecánica, térmica y/o electromagnética al conjunto de cámara de muestras para no solo mejorar la capacidad de los materiales paramagnéticos para unirse al analito objetivo de interés, sino también para permitir que el complejo formado por el material paramagnético y el analito de interés 24 circulen dentro del conjunto de cámara de la muestras y finalmente se sometan a las fuerzas magnéticas de retención impartidas por la cápsula magnética 130. Con ese fin, y tal y como se explicó anteriormente, se pueden agregar numerosos agentes a la muestra de líquido a granel junto con las partículas paramagnéticas para maximizar el potencial de que se pueda detectar un analito de interés dado.

Por ejemplo, en la medida en que se busque identificar una partícula biológica específica, como un orgánulo o un tipo específico de segmento de ADN, los detergentes y las enzimas digestivas pueden desplegarse para facilitar la capacidad de un espécimen que contiene células para lisarse o de otro modo digerirse para que se pueda acceder a las estructuras intracelulares y las macromoléculas. De manera similar, tal y como se explicó anteriormente, el volumen de aire que queda dentro del conjunto de cámara de la muestra puede elegirse selectivamente para facilitar un mayor o menor grado de mezcla, y por lo tanto la circulación de los materiales paramagnéticos dentro y fuera del interior 122 del vértice 120.

Aún más, se contempla que la energía mecánica, tal como ultrasonido, energía térmica, tal como calor o refrigeración, y energía electromagnética, tal como radiación ultravioleta o infrarroja, microondas y similares, puedan desplegarse selectivamente para facilitar una reacción dentro del conjunto de cámara de muestras o, de otro modo, mejorar la capacidad de las partículas paramagnéticas para interactuar con las fuerzas magnéticas proporcionadas por la cápsula magnética 130.

Con ese fin, y como se muestra en las figuras 11 y 12, si se requiere un intervalo de mezcla para asegurar la formación del complejo de unión del analito de interés y las partículas paramagnéticas de unión, el conjunto de cámara de muestras se puede poner en movimiento de manera que el líquido y el aire contenidos en el interior del conjunto de cámara de muestras llene finalmente la parte del vértice de la cámara de la muestra. Como se ilustra, el conjunto de cámara de muestras definido por la interconexión del depósito de muestra a granel 102 y el vértice 120 puede girar en el sentido de las agujas del reloj que se muestra en la figura 11 para asumir la configuración invertida de la figura 12. Sin embargo, Como deberían comprender fácilmente los expertos en la materia, el movimiento del conjunto de cámara de muestras puede tomar cual quiera de una variedad de formas, incluyendo balanceo, agitación, compresión, separados del movimiento rotacional o además de él, como se muestra, o puede incluir combinaciones de los movimientos que se deseen para una aplicación particular.

De hecho, se contempla expresamente que debe producirse cierta actividad de mezcla para garantizar que el líquido y el aire contenidos dentro del montaje de cámara de la muestra permitan que tanto el líquido como el aire llenen alternativamente el interior 122 del vértice 120 y, en consecuencia, permitan que las fuerzas magnéticas de la cápsula magnética 130 impartan el efecto de retención. Del mismo modo, tal actividad de mezclado, ya sea de rotación, balanceo, agitación, compresión o combinaciones de las mismas, necesariamente hará que el líquido retroceda desde el vértice 120 y luego sea reemplazado por aire y/o gas, que a su vez elimina la tensión superficial del líquido y cualquier analito de fondo no unido 22 que pueda interferir con la detección del complejo deseado de la partícula paramagnética y el analito de interés 24.

Aún más, se contempla que el grado y el tipo de mezclado se elegirán selectivamente para una aplicación particular, y puede implicar mezclar solo el espécimen con partículas paramagnéticas dentro del conjunto de cámara de muestras por una primera duración sin ninguna aplicación del campo magnético como es impartido por la cápsula magnética 130, que se puede permitir que continúe durante un tiempo e intensidad determinadas suficientes para permitir primero que las partículas paramagnéticas formen complejos suficientes con el analito objetivo de interés y, una vez que dicha reacción se haya completado sustancialmente, entonces la cápsula magnética 130 puede ser luego introducida para aplicar selectivamente el campo magnético dentro del interior del vértice 120 para lograr el

efecto de retención descrito en la presente. En este sentido, se contempla que los sistemas y procedimientos por los cuales éstos se usan se puedan usar secuencialmente para realizar una primera etapa de mezcla de partículas paramagnéticas seguida de una segunda etapa de retención.

5 Tal y como se explicó anteriormente, se contempla que los sistemas y procedimientos de la presente invención puedan encontrar una aplicación generalizada en la detección de cualquiera de una variedad de analitos de interés, y especialmente analitos de interés que están presentes en cantidades en trazas y normalmente sean difíciles de detectar usando procedimientos de la técnica anterior. Se contemplan numerosas aplicaciones clínicas e industriales, que incluyen pero no se limitan a aplicaciones de diagnóstico, como la detección de células cancerosas, tipos específicos de antígenos, patógenos y similares; detección de contaminantes y contaminantes en sistemas acuosos y fuentes de alimentos; purificación de líquidos; fabricación y procesamiento de diversos hidrocarburos, entre otros.

15 Un ejemplo ilustrativo de la utilidad de la presente invención se apreciará fácilmente en el contexto del diagnóstico de cáncer. En este sentido, el tratamiento y el manejo de los pacientes con cáncer se basa cada vez más en la doctrina de la medicina de precisión. En lugar de tratamientos basados en promedios poblacionales, el tratamiento y la prevención de enfermedades tienen en cuenta la variabilidad individual en los genes. Por lo tanto, esta doctrina examina los genes subyacentes y la expresión génica causante del cáncer y predice el tratamiento y manejo óptimos del paciente. Dado que el cáncer es una enfermedad que es específica de un órgano o tejido, la validez analítica de los resultados de las pruebas genéticas se basa en la presunción de que el resultado de la prueba es rastreable a un tipo de célula específica que se origina en un órgano o tejido específico.

25 Siempre que sea posible, es deseable evaluar la variabilidad genética individual mencionada anteriormente usando los llamados procedimientos de biopsia líquida para evaluar la presencia de células tumorales en los fluidos corporales. Los procedimientos de biopsia líquida emplean técnicas de muestreo mínimamente invasivas que generalmente no involucran procedimientos quirúrgicos para extraer una muestra de tejido corporal. Por ejemplo, los fluidos corporales tales como la sangre, la orina, la saliva, el líquido cefalorraquídeo, los fluidos pleurales y otros se pueden recolectar con un riesgo o trauma mínimo para el paciente en comparación con los procedimientos quirúrgicos. Esto es ventajoso porque estos líquidos se reponen, están fácilmente disponibles y proporcionan una metodología ideal para la vigilancia de enfermedades. Como tales, los procedimientos de biopsia líquida pueden permitir el desarrollo de modos convenientes de detección temprana (tamiz o selección) y la vigilancia de la progresión o regresión de la enfermedad en respuesta al tratamiento.

35 Una limitación de los procedimientos de biopsia líquida es la dependencia de la rara presencia de células tumorales en estos fluidos corporales. Además, la célula objetivo de interés está típicamente presente en los fluidos corporales que contienen un número y variedad comparativamente altos de células de fondo no diagnósticas que no son relevantes para el diagnóstico y enmascaran la existencia de la célula de interés. La detección temprana de enfermedades o la detección mínima de enfermedades residuales en muchos casos no es factible porque el número relativo de células de interés está por debajo del límite de detección más bajo de la técnica anterior. Esto puede remediarse en algunas aplicaciones recolectando una muestra más grande de fluido corporal; sin embargo, los intentos de la técnica anterior para usar muestras de gran volumen son engorrosos, carecen de robustez, son costosos, difíciles de automatizar y no son propicios para la comercialización a gran escala. Un objetivo de esta invención es retener analitos de interés de un volumen mayor de muestra cuyo volumen total incluye un volumen de líquido y un volumen sólido, tales como los componentes líquidos y celulares que comprenden el volumen total de muchos fluidos biológicos. Se proporciona una aplicación específica para este propósito:

Ejemplo 1: Células tumorales circulantes en 15 a 30 mililitros de sangre entera humana.

50 Se proporciona un conjunto de cámara de muestras de 60 ml mediante la interconexión entre una cámara 102 de muestras a granel que tiene un volumen interior de 58 ml y un vértice 120 que tiene un volumen interior de 2 ml.

55 Después de la extracción del vértice 120, se introducen 15 a 30 ml de sangre entera [completa] en el depósito de muestras a granel 120. Se depositan de 15 a 30 ml de sangre que contiene entre 75 y 150 mil millones de células en el depósito de muestras a granel 102, seguido de 20 ml de reactivo líquido compuesto por un tampón, acondicionadores, agentes químicos y un número adecuado de partículas paramagnéticas específicas de células de interés. Por ejemplo, un volumen promedio total de líquido combinado de 42,5 ml que ocupa el 71 % del volumen total del conjunto de cámara de muestras (SCV por sus siglas en inglés de "*specimen chamber assembly*") con un volumen total de líquido puede variar desde 35 ml (58 % de SCV) hasta 50 ml (83 % de SCV). Esto, a su vez, crea un espacio de aire promedio de 17,5 ml (29% de SCV) y un intervalo de espacio de aire de 25 a 10 ml (42 % a 17 % de SCV) dentro del conjunto de la cámara de muestras.

65 Con respecto a la composición del reactivo líquido, el tampón puede ser cualquier tampón adecuado, típicamente en el rango de pH entre 6 y 8,5. Los acondicionadores y agentes químicos pueden incluir: sales, iones metálicos, azúcares, aminoácidos, antibióticos, anticoagulantes, agentes antiespumantes, tensioactivos, fijadores y muchos otros acondicionadores o combinaciones de los mismos que se implementan comúnmente en cultivos de tejidos, inmunológica, citología, patología y hematopatología. El número de partículas paramagnéticas puede oscilar de

varios miles a varios miles de millones y se incluyen dentro del volumen total de reactivo líquido, ya sea que se agreguen por separado o al mismo tiempo que los demás componentes del reactivo líquido.

5 Después de las adiciones de muestras y reactivos líquidos al depósito de muestras a granel 102, el conjunto de cámara de muestras se vuelve a montar reemplazando el vértice desmontable 120 como se muestra en la figura 7 para formar el conjunto de cámara de la muestra.

10 El conjunto de cámara de la muestra se monta en un dispositivo de rotación horizontal y se pone en movimiento de rotación a una velocidad que produce un mezcla suficiente para formar complejos entre las células de interés y las partículas paramagnéticas específicas de la célula de interés. La duración del intervalo del mezclado debe ser suficiente para permitir que la mayoría de las células de interés se unan a las partículas paramagnéticas específicas de la célula de interés.

15 Al concluir el intervalo de mezclado, se monta una cápsula magnética 130 en el componente de vértice 120 del conjunto de cámara de la muestra. Esto se puede lograr mientras se mantiene el movimiento de rotación o interrumpiendo brevemente el movimiento de rotación para permitir el conjunto de la cápsula magnética 130 en el vértice 120 mientras está estacionario.

20 Después de montar la cápsula magnética 130, el sistema continúa su movimiento de rotación durante un tiempo suficiente para permitir que la mayoría de los complejos de partículas magnéticas específicas de la célula de interés/objetivo sean retenidas en el componente de vértice 120 del conjunto de cámara de muestras por el campo magnético producido por la cápsula magnética 130.

25 Al finalizar la duración de retención, el movimiento de rotación se detiene y todo el conjunto del sistema se retira del dispositivo de rotación. El conjunto de cámara de muestras se mantiene en una posición vertical durante un tiempo suficiente para permitir que la mayoría del líquido se drene desde el vértice 120. Una vez drenado, el conjunto de vértice / cápsula magnética 120/130 se separa y se invierte para permitir la extracción del vértice 120 de la cápsula magnética 130 sin pérdida de células de interés. A continuación, las células de interés se pueden resuspender en cualquier volumen de trabajo apropiado según sea apropiado para microscopia, PCR, secuenciación y otros tipos de análisis.

30 Independientemente de las aplicaciones de CTC, los sistemas y procedimientos de la presente invención se pueden implementar para detectar células cancerosas presentes en la orina. Con ese fin, es bien conocido por los expertos en el campo de la citología de orina, que la orina puede contener un número impredecible (si existe) de células cancerosas exfoliadas de riñón, vejiga, próstata, uretra y otros tejidos. A diferencia de la sangre, el recuento total de células en la orina puede variar de unas pocas células a muchos miles de millones si hay hematuria.

35 Además de las células de interés exfoliadas de los órganos y tejidos corporales mencionados, los componentes de la muestra de orina pueden incluir células sanguíneas (una afección conocida como hematuria), bacterias, grandes cantidades de moco, cristales y esperma. Como resultado, el desafío de detectar lesiones de bajo grado varía entre el 26 % y el 45 % (Laucirica, R., et.al. *Arch Pathol Lab Med. Vol. 134, enero de 2010. También se informó que la precisión diagnóstica de la detección de las neoplasias malignas del tracto urinario en su conjunto aumentan del 50 % al 75-90 % al evaluar volúmenes de orina más grandes y múltiples vaciados de orina (ref: Elsheikh, T, Cleveland Clinic presentation, URL: <https://www.ahn.org/sites/default/files/file/elsheikh-2.pdf>). Los estudios clínicos también han demostrado que la sensibilidad de la prueba de amplificación de ácidos nucleicos para detectar *Chlamydia trachomatis* mejoró a medida que aumentaba el volumen de la primera muestra de orina (Moneada, J., et al. *Journal of Clinical Microbiology [Revista de microbiología clínica]*, octubre de 2003, págs. 4848-4843.*

40 El volumen de orina vaciada puede variar ampliamente entre individuos y dentro de individuos. El volumen de orina también se puede determinar por vaciado o por un periodo de 24 horas. El rango normal para un vaciado de orina de 24 horas es de 800 a 2000 mililitros (ml), mientras que el volumen promedio por micción oscila entre 210 y 346 ml de hombres de 50 a 54 años de edad. Véase, por ejemplo, *Blanker, M., et. al. Voided Volumes: Normal Values and Relation to Lower Urinary Tract Symptoms in Elderly Men, A Community Based Study. Urology 57 (6), 2001 [Volúmenes anulados: valores normales y relación con los síntomas del tracto urinario inferior en hombres mayores, un estudio comunitario. Urología 57 (6), 2001.* Como resultado de esos volúmenes, los análisis de interés, tales como las células exfoliadas, pueden ser muy difíciles de detectar. En el siguiente ejemplo específico se proporciona cómo se pueden superar tales deficiencias mediante una aplicación de la presente invención:

60 **Ejemplo 2:** Aislamiento de células de interés de la orina, seguido de aislamiento de ADN de la misma muestra de orina.

65 Con referencia ahora a un conjunto de cámara de muestras de 350 ml que tiene un volumen de depósito de muestras a granel de 345 ml y un volumen de vértice de 5 ml. Para facilitar la capacidad de recolectar y analizar una muestra de tal volumen, se contempla que además de los diseños representados anteriormente y otras variaciones de los mismos que serían fácilmente comprendidos por los expertos en la materia, se muestra en las figuras 13 y 14a una realización ejemplar adicional. Como se muestra en la vista en despiece de la figura 13, los componentes

del sistema, el depósito de muestras a granel 102, el vértice 120 y la cápsula magnética 130 se proporcionan y se pueden interconectar operativamente de tal manera que el extremo distal 108 del depósito de muestras a granel 102 puede estar interconectado de manera roscada con el extremo distal 124 del vértice 120. Según las otras realizaciones explicadas anteriormente, la interconexión entre el vértice 120 y el depósito de muestras a granel 102 cooperan para definir un conjunto de cámara de muestras, como se muestra en la vista en sección transversal de la figura 14 con tales partes interconectadas. En virtud de que el cuerpo del depósito de muestras a granel tiene una forma en general esférica, el depósito 102 de muestras a granel puede así acomodar mayores volúmenes de muestras, lo que sería ideal para muestras tales como la orina, en oposición a muestras de volúmenes más pequeños, como las asociadas con análisis de sangre, como se discutió anteriormente.

Según las otras realizaciones analizadas anteriormente, la capsula magnética 130 está provista de una abertura anular 132 para ser recibida axialmente alrededor del vértice 120, como se muestra en la figura 14. De acuerdo con las realizaciones analizadas anteriormente, la cápsula magnética 130 funciona para proyectar un campo magnético dentro del interior del vértice 120, de manera que cuando las partículas paramagnéticas con el analito objetivo de interés unido a ellas circulan a través del interior 122 del vértice 120, tales materiales permanecerán retenidos en el mismo.

Después de la extracción del vértice 120, se introducen 200 ml de orina 200 en el depósito de muestras a granel que contiene un número desconocido de células, bacterias, moco y otros componentes de fondo. La adición de la muestra va seguida de 50 ml de reactivo líquido que consta de tampón, acondicionadores, agentes químicos y un número adecuado de partículas paramagnéticas específicas para las células de interés 24. Por ejemplo, un volumen total promedio de líquido combinado de 250 ml que ocupa el 71 % del volumen total del conjunto de cámara de muestras (SCV). Esto, a su vez, crea un espacio de aire promedio de 100 ml (29\ de SCV) dentro del conjunto de cámara de muestras.

Con respecto a la composición del reactivo líquido, el tampón puede ser cualquier tampón adecuado, típicamente en el intervalo de pH entre 6 y 8,5. Los acondicionadores y agentes químicos pueden incluir: sales, iones metálicos, azúcares, aminoácidos, antibióticos, anticoagulantes, agentes antiespumantes, tensioactivos, fijadores y muchos otros acondicionadores o combinaciones de los mismos comúnmente utilizados en cultivos de tejidos, inmunoquímica, citología, patología y hematopatología. El número de partículas paramagnéticas puede variar de varios miles a varios miles de millones y se incluyen dentro del volumen total de reactivo líquido, ya sea que se agreguen por separado o al mismo tiempo que los otros componentes del reactivo líquido.

Después de la adición de muestras y reactivos líquidos al depósito de muestras a granel, el conjunto de cámara de muestras se vuelve a ensamblar reemplazando el vértice desmontable como se muestra en la figura 14. En este momento no se agrega ninguna cápsula magnética al conjunto de cámara de muestras.

El conjunto de cámara de muestras definido por el depósito de muestras a granel 102 y el vértice 120 interconectados, se monta sobre un dispositivo de rotación horizontal y se pone en movimiento rotacional a una velocidad que provoca una mezcla suficiente para formar complejos entre la célula de interés y la partícula paramagnética específica de la célula de interés. La duración del intervalo de mezclado debería ser suficiente para permitir que la mayoría de las células de interés se unan a las partículas paramagnéticas específicas de la célula de interés.

Una vez concluido el intervalo de mezcla, la cápsula magnética se monta en el componente del vértice 120 del conjunto de cámara de la muestras. Esto se puede lograr a la vez que se mantiene el movimiento de rotación o interrumpiendo brevemente el movimiento de rotación para permitir el conjunto de la cápsula magnética al vértice mientras está parado.

Después de montar la cápsula magnética 130, el conjunto del sistema continúa su movimiento de rotación durante un tiempo suficiente para permitir que la mayoría de las células de interés / los complejos de partículas magnéticas específicas de interés sean retenidos en el componente de vértice del conjunto de cámara de muestras por el campo magnético producido por la cápsula magnética.

Al finalizar la duración de la retención, el movimiento de rotación se detiene y todo el sistema se retira del dispositivo de rotación. El sistema se mantiene en posición vertical durante un tiempo suficiente para permitir que la mayoría del líquido drene desde el vértice. Una vez drenado, el conjunto del vértice 120 / cápsula magnética 130 se separa e invierte para permitir la extracción del vértice 120 de la cápsula magnética 130 sin pérdida de células de interés. Las células de interés se pueden resuspender en cualquier volumen de trabajo apropiado según sea apropiado para microscopía, PCR, secuenciación y otros tipos de análisis.

Seguimiento del aislamiento de ADN:

Posteriormente a la extracción de las células de interés de la muestra de orina 200, también puede ser conveniente retener el ADN de la misma muestra para la detección de microorganismos de transmisión sexual.

5 Se añade un volumen de partículas paramagnéticas de unión al ADN, suficiente para unir una cantidad adecuada de ADN para la PCR a la muestra empobrecida de células de interés. Las partículas paramagnéticas pueden estar suficientemente concentradas para no tener un efecto de volumen apreciable sobre el sistema. Estas partículas están fácilmente disponibles de muchos fabricantes.

A continuación, el conjunto de la cámara de muestras se vuelve a montar sustituyendo el vértice 120 desmontable. En este momento no se añade ninguna cápsula magnética 130 al conjunto de cámara de muestras.

10 El conjunto de cámara de muestras se monta en un dispositivo de rotación horizontal y se pone en movimiento de rotación a una velocidad que produce una mezcla suficiente para formar complejos entre el ADN y la partícula paramagnética de unión al ADN. La duración del intervalo del mezclado debe ser suficiente para permitir que la mayoría de las células de interés se unan a partículas paramagnéticas específicas de la célula de interés.

15 Una vez concluido el intervalo de mezcla, la cápsula magnética 130 se monta en el vértice 120 del conjunto de cámara de muestras. Esto se puede lograr manteniendo el movimiento de rotación o interrumpiendo brevemente el movimiento de rotación para permitir el conjunto de la cápsula magnética en el vértice mientras está parado.

20 Después de montar la cápsula magnética 130, el conjunto del sistema continúa su movimiento de rotación durante un tiempo suficiente para permitir que la mayoría de los complejos de ADN / partículas paramagnéticas que se unen al ADN sean retenidos en el vértice 120 del conjunto de cámara de muestras por el campo magnético producido por la cápsula magnética 130.

25 Una vez completada la duración de la retención, el movimiento de rotación se detiene y todo el conjunto del sistema se retira del dispositivo de rotación. El sistema se mantiene en posición vertical durante un tiempo suficiente para permitir que la mayoría del líquido se drene desde el vértice. Una vez drenado, el conjunto de vértice / cápsula magnética se separa e invierte para permitir la extracción del vértice de la cápsula magnética sin pérdida de partículas paramagnéticas unidas al ADN. A continuación, el ADN se puede resuspender en cualquier volumen de trabajo apropiado para su uso según sea apropiado para PCR, secuenciación y otros tipos de análisis.

30 Las modificaciones y mejoras adicionales de la presente invención también pueden ser evidentes para los expertos en la materia. Por lo tanto, la combinación particular de partes y etapas descritas e ilustradas en el presente documento pretende representar solo ciertas realizaciones de la presente invención, y no pretende servir como limitante de dispositivos y procedimientos alternativos dentro del espíritu y alcance de la invención.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Sistema (100) para retener un analito de interés que se cree que está presente en una muestra de líquido a granel, dicho sistema (100) comprende:
- 10 a. un depósito de muestras a granel (102) que define un primer volumen interior (104) para recibir la muestra de líquido a granel que se sospecha que contiene el analito de interés;
 - 15 b. una pluralidad de partículas paramagnéticas (24) configuradas para unirse específicamente al analito de interés que se sospecha está presente en la muestra de líquido a granel;
 - c. al menos un vértice (120) que define un segundo volumen interior, al menos uno de los vértices (120) se puede interconectar de manera desmontable con el depósito de muestras a granel (102) de manera que el interior (122) del vértice (120) y el interior (104) del depósito de muestras a granel (102) definen un conjunto de cámara de muestras; y
 - 20 d. al menos una cápsula magnética (130) acoplable de manera desmontable con unos dedicados de al menos uno de los vértices (120), al menos una de las cápsulas magnéticas (130) configuradas para proyectar un campo magnético dentro del segundo interior (122) de al menos uno de los vértices (120) y retener magnéticamente una parte de las partículas paramagnéticas (24) distribuidas dentro de la muestra líquida a granel que contiene el analito objetivo de interés.
- 25 2. El sistema (100) de la reivindicación 1, en el que el volumen del depósito de muestras a granel (102) es mayor que el volumen del interior (122) de al menos un vértice.
3. El sistema (100) de la reivindicación 2, en el que sistema (100) incluye un único vértice (120) configurado para que sea interconectable con el depósito de muestras a granel (102) y una única cápsula magnética (130) que se puede acoplar de forma desmontable con el vértice (120).
- 30 4. El sistema (100) de la reivindicación 2, en el que el analito objetivo de interés es una partícula biológica; preferiblemente en el que la partícula biológica se selecciona del grupo que consiste de macromoléculas, proteínas, péptidos, estructuras intracelulares y tipos específicos de células; opcionalmente en el que las células comprenden células cancerosas.
- 35 5. El sistema (100) de la reivindicación 1, en el que la partícula paramagnética (24) incluye un mecanismo de unión seleccionado del grupo que consiste en un ligando, receptor, quelato y pareja de enlace configurados para formar un complejo con el analito objetivo de interés.
- 40 6. El sistema (100) de la reivindicación 1, en el que cada uno de al menos uno de los vértices (120) está moldeado para tener una forma generalmente tubular y cada una de al menos una cápsula magnética (130) está configurada para proyectar un campo magnético radialmente alrededor de la estructura tubular.
- 45 7. El sistema (100) de la reivindicación 3, en el que el vértice (120) está moldeado para tener una forma generalmente tubular y la cápsula magnética (130) está configurada para proyectar un campo magnético radialmente alrededor de la estructura tubular.
- 50 8. Sistema (100) para retener un analito objetivo de interés que se cree que está presente en una muestra de líquido a granel, en el que la muestra de líquido a granel incluye partículas paramagnéticas (24) configuradas para unirse al analito objetivo de interés en la medida en que el analito de interés esté presente, dicho sistema (100) comprende:
- a. un vértice (120) que define un primer interior (122);
 - 55 b. un depósito de muestras a granel (102) que define un segundo interior y que está configurado para recibir la muestra de líquido a granel, el vértice (120) es interconectable de manera desmontable al depósito de muestras a granel (102) de modo que cuando está interconectado, el interior (122) del vértice (120) se combina con el interior (104) del depósito de muestras a granel (102) para definir un conjunto de cámara de muestras;
 - 60 e. una cápsula magnética (130) configurada para que sea interconectable al vértice (120) y configurada para proyectar un campo magnético en el interior (122) del vértice (120), siendo el campo proyectado por la cápsula magnética (130) lo suficientemente fuerte como para retener una parte de tales partículas paramagnéticas (24) presentes en la muestra de fluido a granel dentro del interior (122) del vértice (120).
 - 65
9. El sistema (100) de la reivindicación 3, en el que cuando la muestra de líquido a granel se deposita dentro del depósito de muestras a granel (102) y el al menos uno de los vértices (120) está interconectado a la muestra del

depósito de líquido a granel, la muestra de líquido a granel ocupa del 50 % al 90 % del volumen total del conjunto de cámara de muestras; o en el que cuando la muestra de líquido a granel se deposita dentro del depósito de muestras a granel (102) y el vértice (120) está interconectado a la muestra del depósito de líquido a granel, la muestra de líquido a granel ocupa del 40 % al 80 % del volumen total del conjunto de cámara de muestras; preferiblemente en el que la muestra de líquido a granel ocupa del 65 % al 75 % del volumen total del conjunto de cámara de la muestra.

10. El sistema (100) de la reivindicación 8, en el que cuando la muestra de líquido a granel se deposita dentro del depósito de muestras a granel (102) y el vértice está interconectado a la muestra del depósito de líquido a granel, la muestra de líquido a granel ocupa del 65 % al 75 % del volumen total del conjunto de cámara de muestras.

11. Procedimiento para retener un analito de interés que se cree que está presente en una muestra de líquido a granel, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- a. proporcionar un depósito de muestras a granel (102) que define un interior (104) para recibir la muestra de líquido a granel y depositar la muestra de líquido a granel dentro del interior (104) del depósito de muestras a granel (102);
- b. poner en contacto la muestra de líquido a granel con una pluralidad de partículas magnéticas (24) operativas para unirse selectivamente con el analito objetivo de interés en la medida en que el analito de interés esté presente;
- e. proporcionar un vértice (120) que tiene un volumen interior, el vértice (120) es interconectable de manera desmontable con el depósito de muestras a granel (102) que contiene la muestra de líquido a granel y las partículas paramagnéticas (24) en la etapa b) de modo que la muestra de líquido a granel con partículas paramagnéticas (24) y cualquier analito de interés unido a las mismas, funciona para fluir y circular dentro del interior (122) de al menos un vértice (120);
- d. proporcionar una cápsula magnética (130) interconectable de manera desmontable con el vértice, cuando el vértice (120) está interconectado con el depósito de muestras a granel (102) en la etapa c), estando la cápsula magnética interconectada con el vértice (120) para proyectar un campo magnético dentro del interior (122) del vértice (120);
- e. circular suficientemente la muestra de líquido a granel con las partículas paramagnéticas (24) y cualquier analito de interés unido a las mismas dentro del interior (122) del vértice (120), mientras que la cápsula magnética (130) se acopla con el mismo durante un periodo suficiente para retener una mayoría de tales partículas paramagnéticas (24) dentro del interior (122) del vértice (120);
- f. separar el vértice (120) del depósito de muestras a granel (102) después de la etapa e);
- g. desacoplar la cápsula magnética (130) del vértice (120) separado en la etapa f); y
- h. analizar las partículas paramagnéticas (24) retenidas dentro del vértice (120) para determinar la presencia de los analitos objetivo de interés.

12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que el analito de interés es una partícula biológica; preferiblemente en el que la partícula biológica se selecciona del grupo que consiste en macromoléculas, proteínas, péptidos, estructuras intracelulares y tipos específicos de células; opcionalmente en el que las células son células cancerosas.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la muestra de líquido a granel con la pluralidad de partículas paramagnéticas (24) se hace circular mediante un procedimiento seleccionado del grupo que consiste en balanceo, agitación, rotación y compresión.

14. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la muestra de líquido a granel que contiene la pluralidad de partículas paramagnéticas (24) se somete además a energía electromagnética para facilitar la unión de las partículas paramagnéticas (24) al analito objetivo de interés, si está presente, y la retención de tales partículas paramagnéticas (24) dentro del interior (122) del vértice, seleccionándose la energía electromagnética del grupo que consiste en radiación UV, radiación infrarroja y microondas; o en el que la muestra de líquido a granel que contiene la pluralidad de partículas paramagnéticas (24) se somete a calentamiento o enfriamiento para facilitar la unión de las partículas paramagnéticas (24) al analito objetivo de interés, si está presente, y la retención de las partículas paramagnéticas (24) dentro del interior (122) del vértice (120).

15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la muestra de líquido a granel que contiene la pluralidad de partículas paramagnéticas (24) se somete a energía mecánica para facilitar la unión de las partículas paramagnéticas (24) al analito objetivo de interés, si está presente, y la retención de las partículas paramagnéticas (24) dentro del interior del vértice; preferiblemente en el que la energía mecánica es ultrasonido.

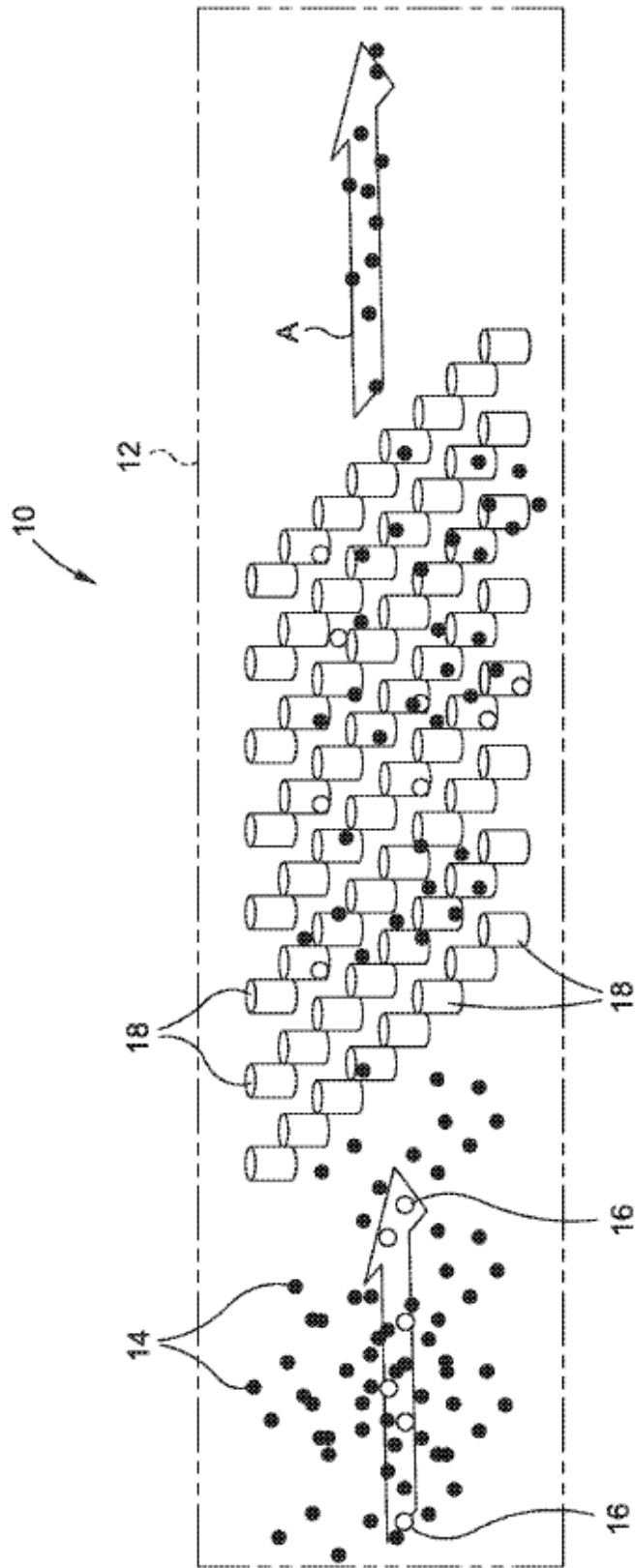


FIG. 1
(TÉCNICA ANTERIOR)

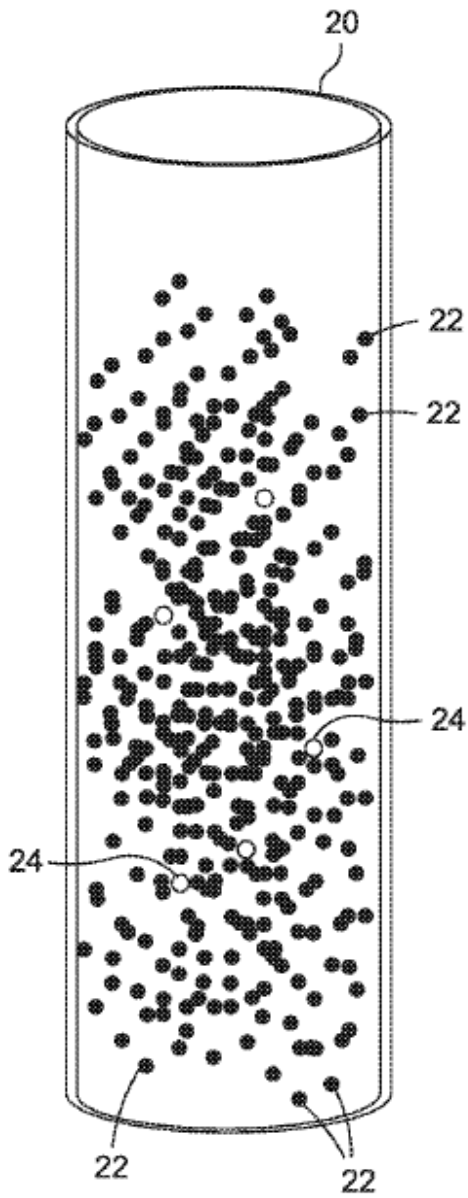


FIG. 2
(TÉCNICA ANTERIOR)

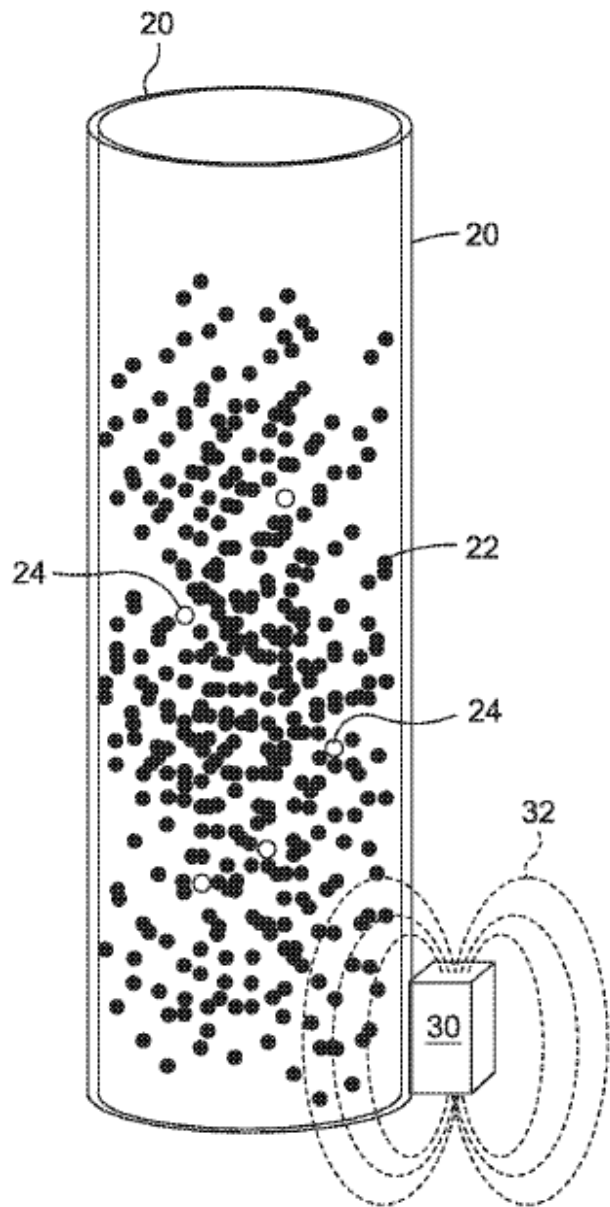


FIG. 3
(TÉCNICA ANTERIOR)

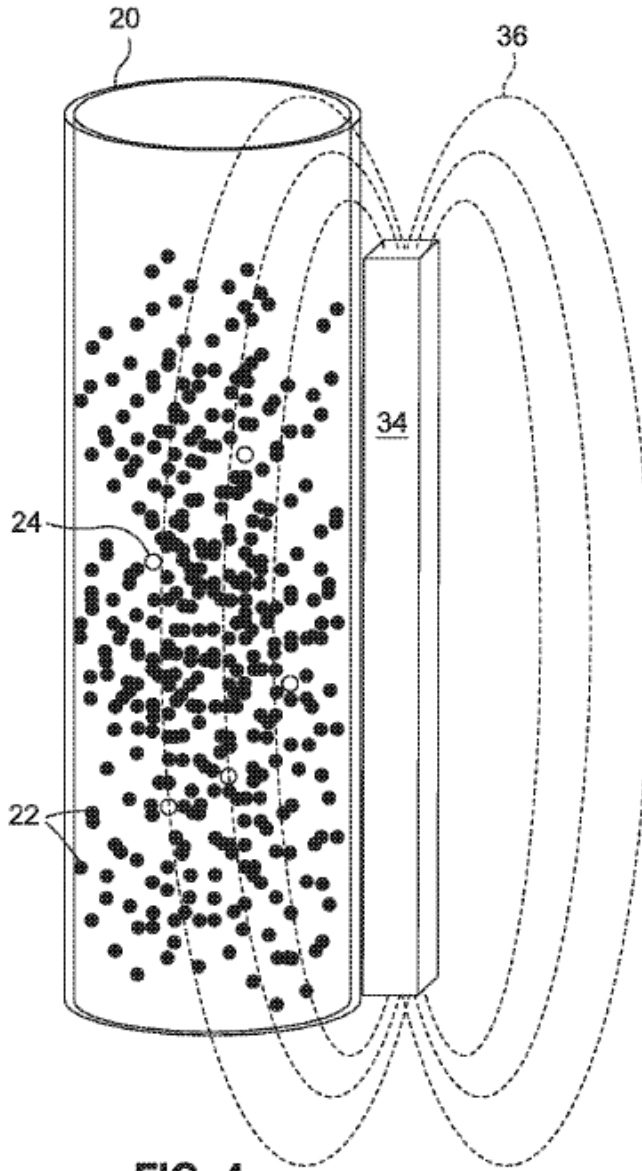


FIG. 4
(TÉCNICA ANTERIOR)

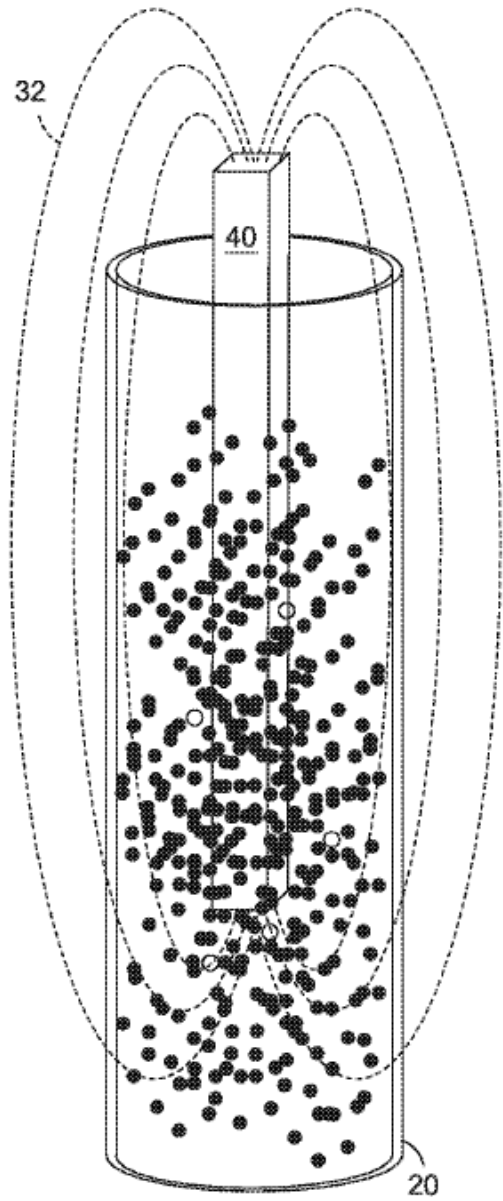
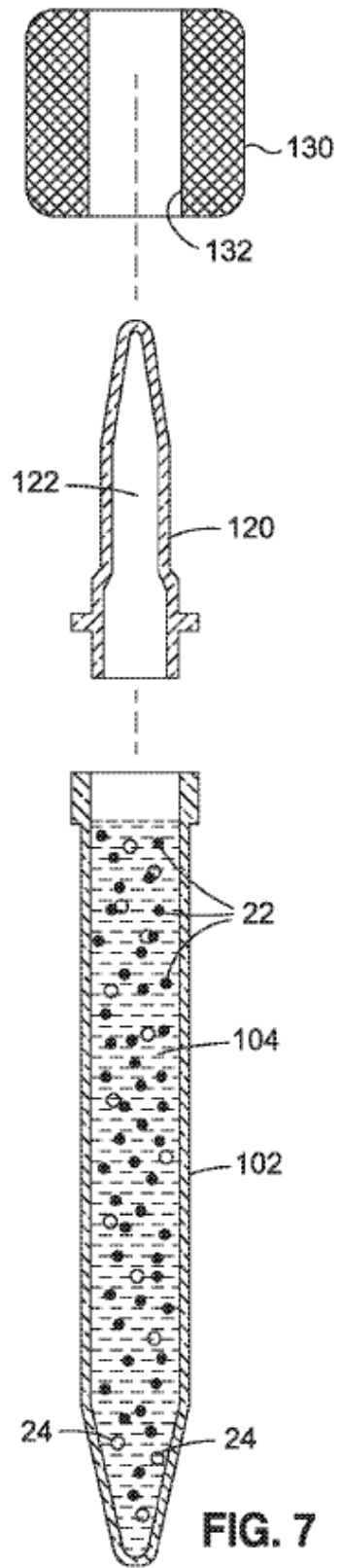
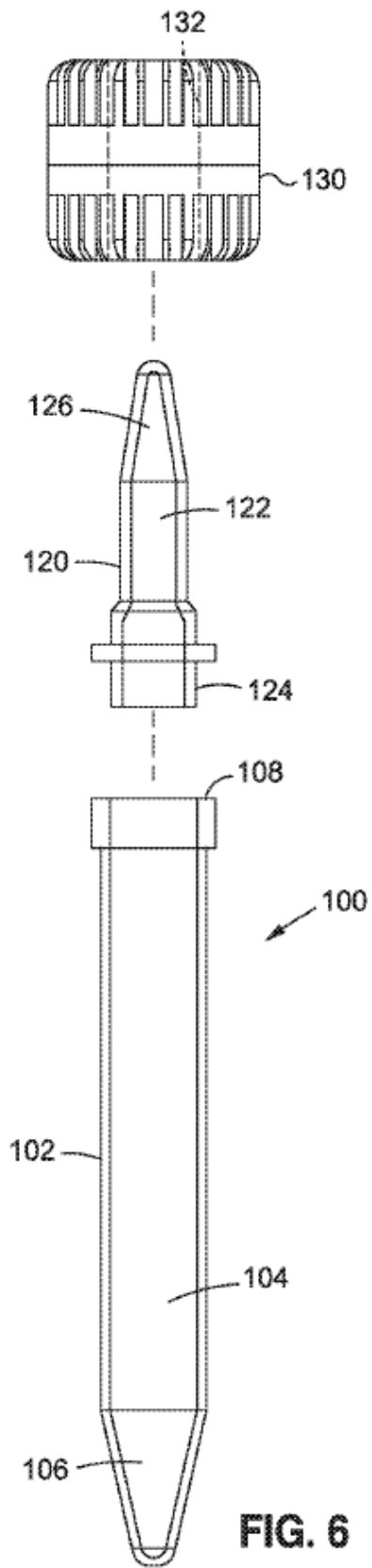


FIG. 5
(TÉCNICA ANTERIOR)



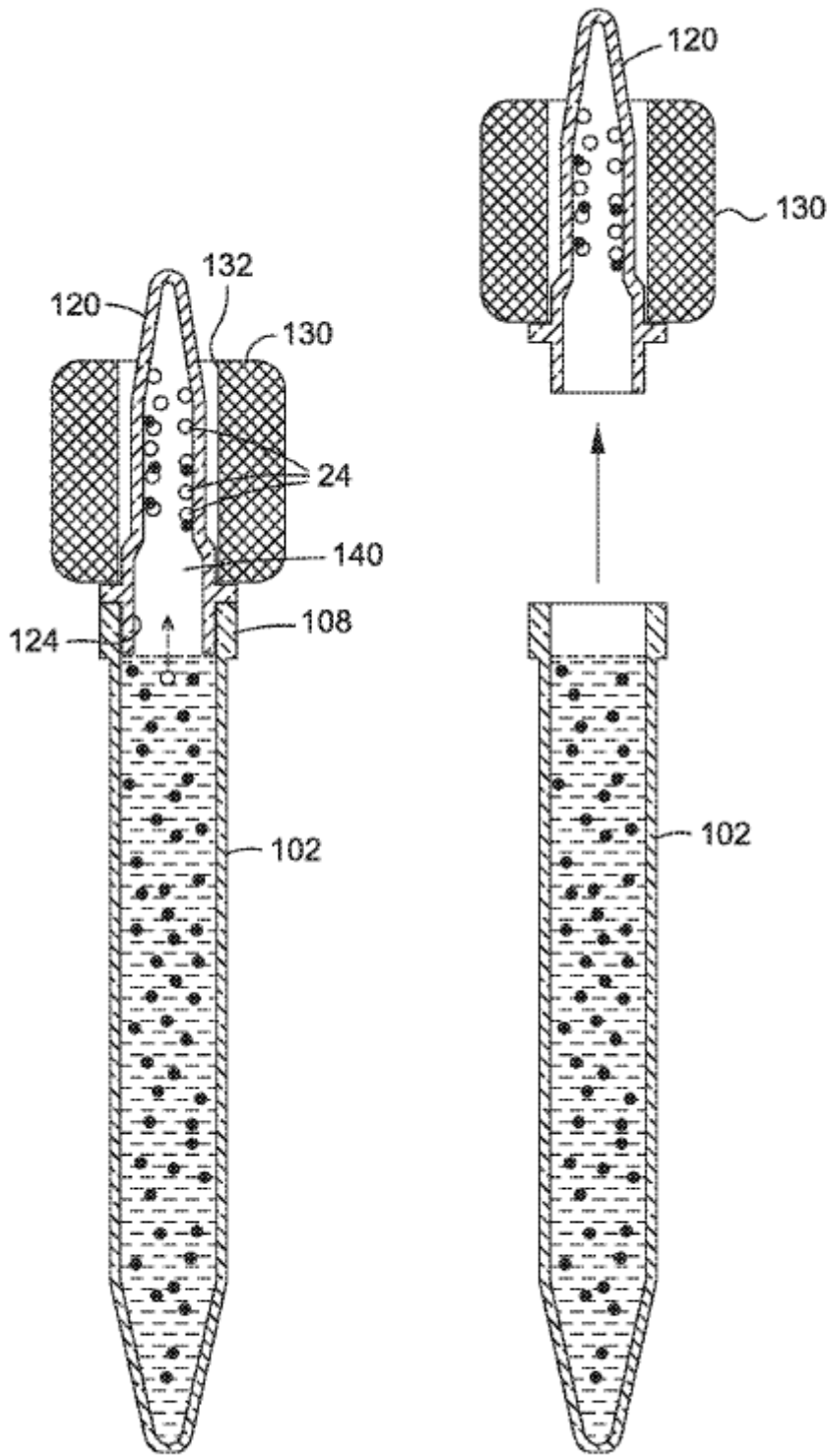


FIG. 8

FIG. 9

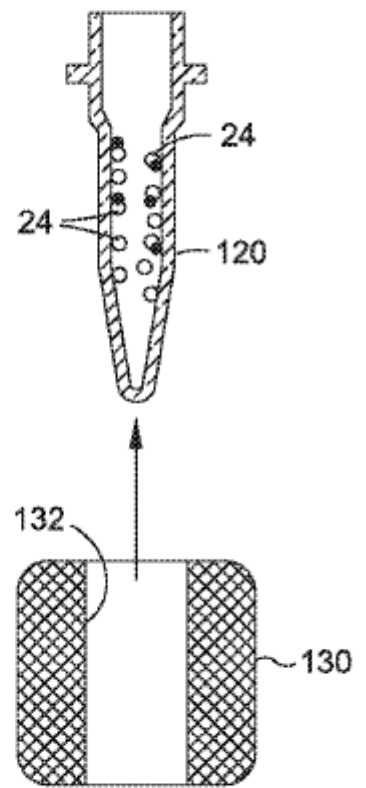


FIG. 10

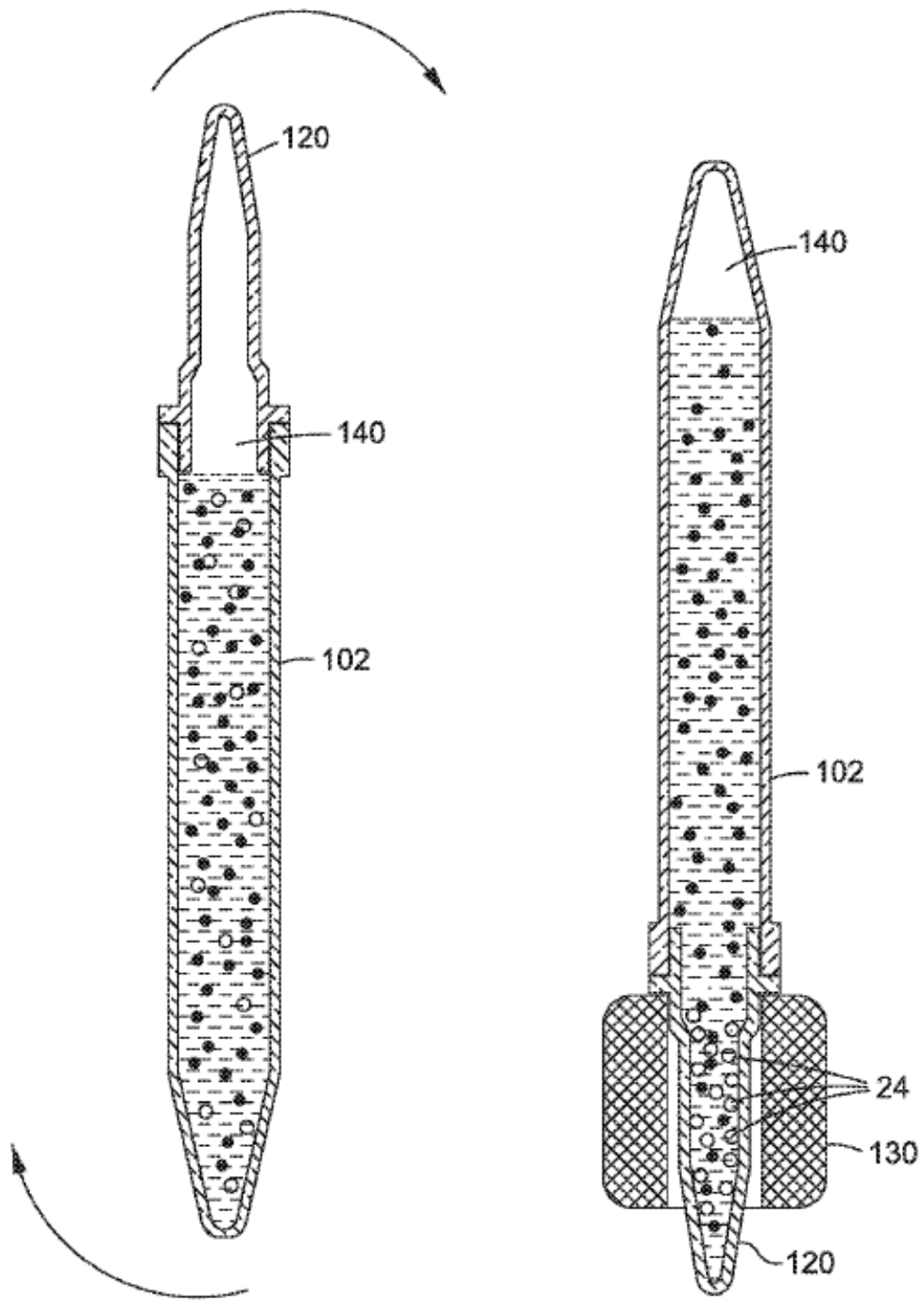


FIG. 11

FIG. 12

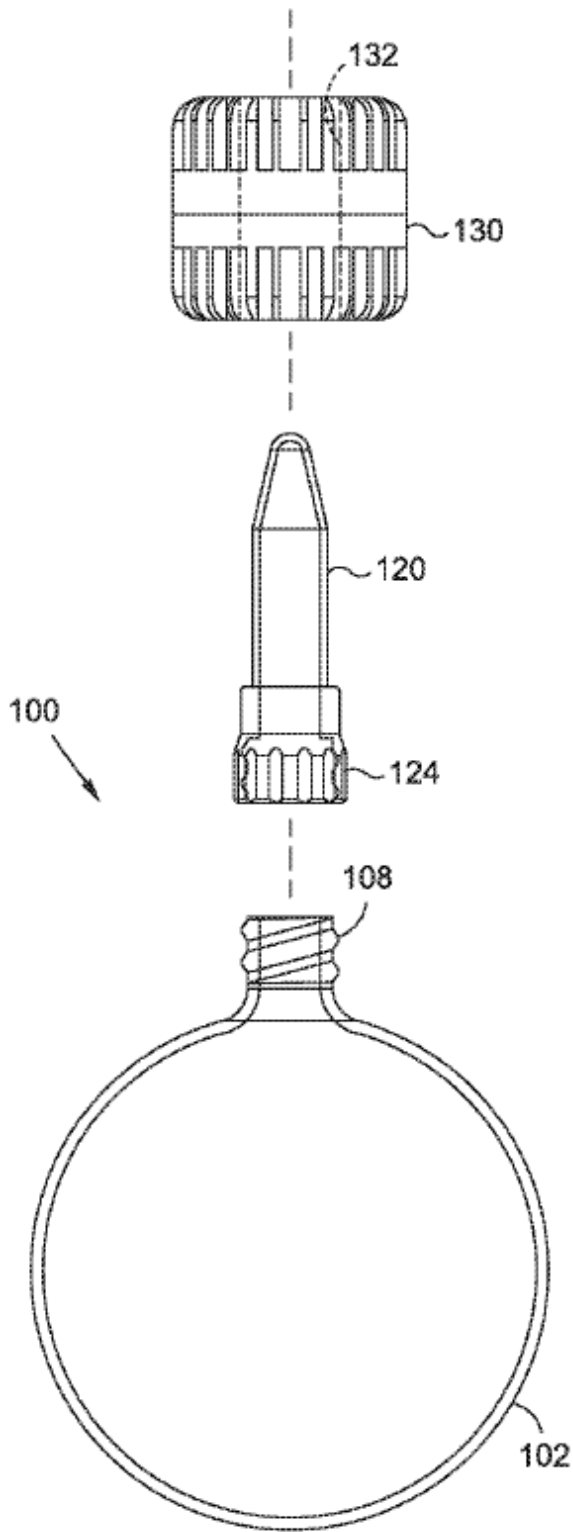


FIG. 13

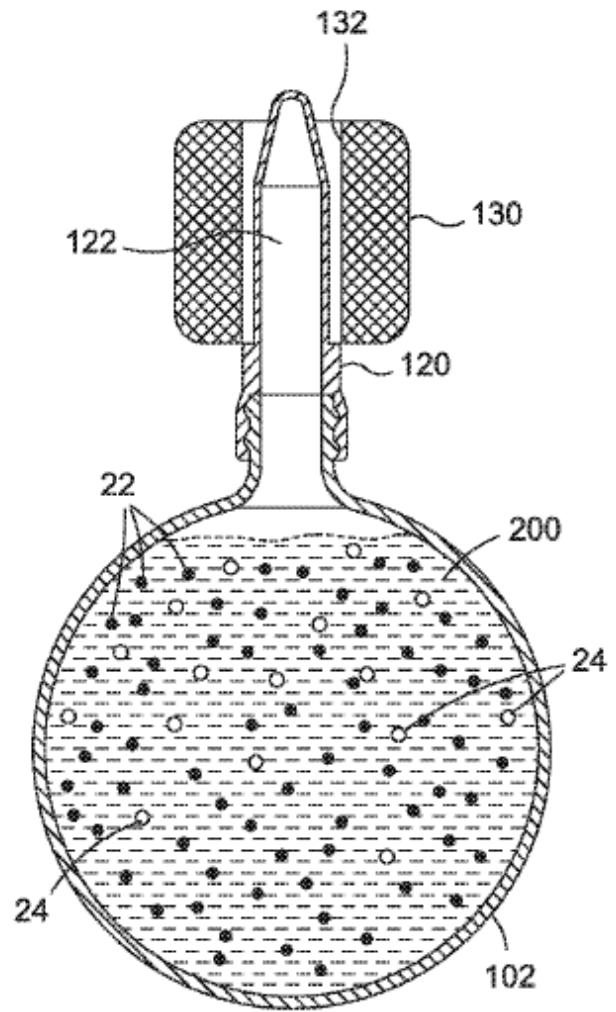


FIG. 14