

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 625 468**

51 Int. Cl.:

G01N 35/00 (2006.01)

B01L 3/00 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2005 E 10184037 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017 EP 2309278**

54 Título: **Dispositivo y método para separar, mezclar y concentrar partículas magnéticas con un fluido y uso del mismo en métodos de purificación**

30 Prioridad:

26.07.2004 EP 04077153

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

19.07.2017

73 Titular/es:

**BIOMÉRIEUX S.A. (100.0%)
Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile, FR**

72 Inventor/es:

**KREUWEL, HERMANNUS JOHANNES MARIA;
VERWIMP, EMIEL GEREBERN MARIA;
BEERLING, BERNARDUS JOZEF MARIA y
SPEE, FRANCISCUS GERARDUS**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 625 468 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método para separar, mezclar y concentrar partículas magnéticas con un fluido y uso del mismo en métodos de purificación

Esta invención está relacionada con el uso de partículas magnéticas o magnetizables, y, en particular, con métodos para separar, mezclar y concentrar eficientemente partículas magnéticas o (super) paramagnéticas con un fluido y opcionalmente seguido por resuspensión de las partículas en otro fluido. La invención proporciona además un dispositivo para hacer lo mismo. En la invención expuesta más adelante, las partículas magnéticas, partículas paramagnéticas y partículas superparamagnéticas se denominarán partículas magnéticas.

Estado de la técnica concerniente a la etapa de separación:

En muchos métodos de análisis biológico, se tiene que separar una fase sólida de una fase líquida y posteriormente ser lavada. Para lavar la fase sólida, una cantidad definida de solución tampón se pipetea en el envase de reacción que contiene la fase sólida para suspender la fase sólida en la solución tampón. Entonces se separan las fases sólida y líquida. La fase líquida se retira entonces por succión (aspiración) y empieza un nuevo proceso de lavado. Usualmente se realizan varios ciclos de lavado, cada uno incluye un proceso de suspensión, separación y aspiración.

El uso de partículas magnéticas como fase sólida y la separación mediante imanes permanentes se conocen en principio. Los imanes permanentes atraen las partículas a la pared del envase de reacción y las mantienen ahí.

A menudo se usan partículas magnéticas en procesos de separación. Hay muchos métodos de ensayos biológicos y métodos de purificación en los que se usan partículas magnéticas. Por ejemplo métodos de inmunoensayo, ensayos de hibridación de ácido nucleico y similares. También se pueden usar partículas magnéticas en métodos de purificación, para aislar componentes particulares, proteínas, ácidos nucleicos, del material en el que están contenidos. Las partículas se pueden usar para separar ciertos componentes de una mezcla, por ejemplo, porque están recubiertas con un reactivo con una afinidad específica para el componente. Las partículas magnéticas se pueden atraer, por ejemplo, a la pared de un recipiente en el que estaba contenido el fluido con las partículas magnéticas y el fluido se puede retirar y, opcionalmente, reemplazar con otro fluido. Así, las partículas se puede mezclar con el fluido del que se va a retirar el componente específico, el componente se unirá a la partícula magnética, y se puede usar un imán para separar las partículas con el componente del resto de la mezcla en el fluido. Opcionalmente las partículas magnéticas se pueden lavar y se pueden separar en otro fluido. O el componente se puede retirar de las partículas de nuevo a otro fluido.

La solicitud de patente europea BP-A-0.136.126 describe un dispositivo para separación durante inmunoensayos en fase sólida. El extremo inferior de un envase de reacción que contiene partículas magnéticas se dispone entre dos imanes permanentes. Los ejes de magnetización están en ángulos rectos con la pared del envase de reacción, reduciendo así campos magnéticos de extravío.

La solicitud internacional WO-A-92/05443 describe un dispositivo para separar partículas magnéticas. Los envases de reacción que contienen las partículas magnéticas se disponen en filas. Entre la filas se posiciona un bloque magnético. Los envases de reacción se disponen en el bloque magnético de manera que dos imanes están diametralmente opuestos respecto al envase de reacción. Los imanes tienen polaridades alternantes y sus ejes de magnetización se extienden paralelos. Las partículas separadas están únicamente en un lado del envase de reacción.

La patente US-A-4.895.650, cuyo contenido se incorpora en esta memoria por referencia, describe un dispositivo de separación en el que se separan partículas mediante un imán permanente. El imán está únicamente en un lado del envase de reacción. La relación entre el nivel de la solución de ensayo en el tubo de ensayo y la posición del imán es el centro de atención. La posición del imán, más particularmente su altura, debe coincidir con el nivel de la solución de ensayo en el envase de reacción, y se lleva a la altura deseada mediante material de relleno en la parte inferior del dispositivo que contiene el imán.

Durante un inmunoensayo, el nivel de fluido en los envases de reacción tras añadir los reactivos necesarios no es necesariamente uniforme. Por ejemplo, el nivel en el envase de reacción tras añadir solución de conjugado puede ser menor que el nivel tras añadir solución tampón de lavado. El método de análisis descrito en esta patente US-A-4.895.650 anterior no tiene en cuenta estas diferencias de nivel.

Dispositivos conocidos para separar partículas magnéticas tienen la desventaja de que necesitan un tiempo relativamente largo antes de que todas las partículas magnéticas se separen de la fase líquida. El tiempo de separación puede ser considerable, particularmente para volúmenes más grandes.

Un dispositivo para separación rápida de partículas magnéticas se describe en la solicitud de patente europea EP-A-0.317.286. En este dispositivo, el envase de reacción está rodeado por cuatro imanes permanentes (imanes 1, 2, 3 y 4), que se distribuyen uniformemente alrededor de un envase de reacción. La dirección del campo magnético de los

imanes 1 y 3 está rotada 180° respecto a la dirección del campo magnético de los imanes 2 y 4. Este dispositivo tiene la desventaja de que necesita un número relativamente grande de imanes permanentes para acelerar la separación. También excluye muchos posibles movimientos de células.

En la patente EP-B-0.644.425 se presenta un analizador que tiene un dispositivo para separar partículas magnéticas de una suspensión, el dispositivo de separación contiene dos imanes permanentes entre los que se ubica el envase de reacción que contiene una suspensión. Para una separación más rápida y más completa de las micropartículas magnéticas, los imanes se ubican diametralmente opuestos con respecto al envase de reacción y los ejes polares de los imanes formando un ángulo agudo con el eje longitudinal del envase de reacción. Una intención de esta invención es proporcionar un dispositivo analítico que comprenda un dispositivo para separar partículas magnéticas de manera que las partículas magnéticas en suspensión se puedan separar rápidamente incluso cuando el envase de reacción se llena con niveles diferentes. Otra intención es proporcionar un dispositivo analítico para separar partículas magnéticas de manera que las partículas magnéticas en suspensión se puedan separar de una manera focalizada.

Si estos documentos se pueden considerar para la separación de partículas magnéticas de un líquido de interés, no pueden autorizar una mezcla eficaz que puede lavar eficientemente las partículas y darles a todas la oportunidad de unirse sobre las superficies de las partículas magnéticas. Esta etapa eficiente de mezcla es absolutamente necesaria para purificar objetivos de ácido nucleico de una muestra biológica.

Estado de la técnica concerniente a la etapa de mezcla:

Métodos de purificación para ácido nucleico que usan partículas magnéticas se han descrito por ejemplo en diversas solicitudes tales como EP-A-0.757.106 y WO-A-96/41811. En estas solicitudes se describen métodos en donde una solución de muestra que contiene ácidos nucleicos se trata con una sustancia caotrópica para liberar el ácido nucleico. Tras liberar los ácidos nucleicos de la entidad biológica en el tampón de lisis, los ácidos nucleicos se unen a las partículas magnéticas. Para este propósito se usan tanto partículas recubiertas con una sonda específica de objetivo así como partículas que tienen un recubrimiento de óxido de metal (por ejemplo, sílice), que dan una unión genérica de todos los ácidos nucleicos contenidos en la muestra. Tras unir el objetivo, se eliminan componentes interferentes tales como restos celulares, enzimas, proteínas y coagulantes y sal mediante lavado de las partículas magnéticas en un (set de) tampón (o tampones) de lavado. Finalmente, los ácidos nucleicos purificados se liberan de las partículas al mezclar las partículas en un pequeño volumen de tampón de elución.

Para un lavado y elución eficientes las partículas magnéticas tienen que dispersarse y mezclarse bien en los tampones pertinentes. En general, este proceso de lavado y elución puede ser dificultado por la agregación u obstrucción de las partículas magnéticas ya sean provocados por la adsorción de componentes específicos en la muestra lisada (por ejemplo, ADN genómico) o por campos magnéticos dipolo residuales inducidos en las partículas. En particular, el uso de partículas (magnéticas) recubiertas de sílice con muestras que contienen cantidades significativas de ADN genómico (sangre completa, esputo, tejido), da como resultado una pastilla apretada que es difícil de procesar.

Métodos muy conocidos para mezclar perlitas (magnéticas) en un tampón líquido son mediante vórtice, sonido o pipeteo. Estos métodos sin embargo son difíciles de automatizar, y/o suponen un riesgo de contaminación de una muestra a otra por generación de aerosol o pueden degradar el ácido nucleico objetivo.

Además, estos métodos no son muy idóneos para volúmenes muy pequeños de líquido (típicamente 0,01 ml) como pueden requerirse para el proceso de elución.

El método y el dispositivo según la invención son especialmente adecuados para uso con procedimientos de aislamiento, en los que usualmente se tiene que aislar un ingrediente en forma bastante pura a partir de un volumen relativamente grande de fluido de muestra, y concentrarse en un volumen más pequeño de otro fluido para ser adecuado para un uso adicional.

En el caso de un método para el aislamiento de ácido nucleico, tal uso adicional puede ser un método de amplificación de ácido nucleico o un ensayo para la detección de ácido nucleico o ambos.

Un método y un aparato para separar y resuspender partículas superparamagnéticas se describen en la solicitud WO-A-91/09308. En esta solicitud, se describió que se pueden agregar y resuspender partículas superparamagnéticas mediante aplicación subsiguiente de diferentes campos magnéticos. Se podrían proporcionar aplicaciones primera y segunda del campo magnético con el mismo imán, que luego se rota alrededor del recipiente que contiene las partículas a una ubicación diferente. Sin embargo, también se podrían usar dos electroimanes espaciados opuestos. Estos electroimanes se energizaban alternadamente para producir los campos magnéticos primero y segundo que mantienen las partículas en suspensión y las mezclan con el fluido en el que estaban contenidas.

Un método para la separación de partículas magnéticas de un fluido se describe en la patente de EE. UU. número 3.985.649. Las partículas se pueden separar de un fluido al llevar las partículas a una cercana proximidad con un

imán y moverlas a través del líquido a lo largo de la pared de un recipiente. Incluso se pueden mover afuera del líquido de esta manera y se pueden transportar a un segundo recipiente.

En la patente US-A-4.988.618, se describe un dispositivo para uso con ensayos en donde se ensayan múltiples muestras de volumen pequeño al mismo tiempo. Este tipo de ensayo se puede realizar, por ejemplo, en placas de microtitulación. Las micropartículas magnéticas están presentes en cada poceta de la placa de microtitulación. El dispositivo tiene así múltiples orificios y cada uno de los orificios está rodeado por múltiples imanes permanentes, preferiblemente cuatro. La estructura resultante de imanes y orificios es rígida; los imanes no están pensados para moverse y se montan en una relación fija con respecto a ellos mismos y a la base del dispositivo. Todos los imanes están alineados y la orientación de campo de los imanes puede ser de manera que todos los imanes tengan la misma dirección de campo o imanes vecinos tengan direcciones de campo opuestas. La orientación de los imanes da como resultado así cuatro lugares puntuales de atracción por orificio. Los imanes están pensados puramente para propósitos de separación. En la patente se describe que el dispositivo puede comprender además medios para agitar los reactivos dentro de los recipientes.

El solicitante ya ha presentado una solicitud internacional WO-A-01/05510 que propone una solución para mejorar la mezcla. Está relacionada con un método y un dispositivo, que permiten la mezcla eficiente de partículas magnéticas o magnetizables en un fluido y opcionalmente la separación de las partículas de dicho fluido. Se hace uso de campo magnético de direcciones opuestas y cambiantes. Se ha encontrado que, cuando partículas magnéticas o magnetizables en un fluido se someten a estos campos magnéticos, las partículas, bajo la influencia del campo, contactan eficientemente con el fluido. Dichas partículas normalmente pueden tender a formar un coágulo, que puede impedir una mezcla eficiente con un fluido. Se ha encontrado que, al someter el recipiente, en el que están el fluido y las partículas, a campos magnéticos de direcciones diferentes y cambiantes, las partículas se separan eficientemente unas de otras y son atraídas a través del fluido de tal manera que se produce un proceso de mezcla muy eficiente. El método permite una mezcla eficiente de partículas incluso con volúmenes de fluido muy pequeños. El método de la invención por lo tanto tiene la ventaja de que puede ahorrar, por ejemplo, fluidos de lavado y puede permitir la reducción del volumen de fluido necesario. Así, por ejemplo en procedimientos de aislamiento, el método de la invención permite la purificación de reactivos en concentraciones altas. Además, mientras métodos de la técnica anterior pueden ser laboriosos y consumir mucho tiempo; el método es rápido y fácil de realizar.

Así, con esta solicitud se proporciona un método de mezcla, en uno o más recipientes(s), partículas magnéticas o (super) paramagnéticas con un fluido, usando más de un imán, por lo que los recipientes se someten a campos magnéticos con direcciones diferentes y cambiantes al mover los imanes con respecto a la posición de los recipientes(s) y/o al mover los recipientes con respecto a las posiciones de los imanes.

Estado de la técnica concerniente a la etapa de concentración:

Se realizan muchos ensayos de diagnóstico después de etapas para extraer analitos objetivo de muestras biológicas, purificar con el fin de eliminar productos parásitos que penalizan las prestaciones del ensayo, concentrar los analitos objetivo con el fin de aumentar la cantidad de analito por unidad de volumen de tampón, y disolver los analitos objetivo en un tampón con el fin de hacerlos químicamente accesibles.

Además, con el fin de aumentar la sensibilidad y la especificidad de un ensayo para manifestar un analito, a veces es necesario reducir el volumen del tampón en el que se encuentran las copias del analito buscado, mientras al mismo tiempo se conserva dicho analito en su totalidad.

Los biólogos tienen medios enteramente convencionales para concentrar un analito, en particular usando técnicas de sedimentación por centrifugación, filtración y/o magnética. Estas técnicas requieren la transferencia de soluciones y manipulaciones del analito, que llevan a una disminución inevitable de la cantidad de analito que se puede analizar.

Por ejemplo, en métodos de sedimentación por centrifugación y magnética, pueden ser necesario repetir varias veces las etapas reales de sedimentación por centrifugación o magnética, el límite del número de repeticiones es establecido por el volumen mínimo de solución que se puede manejar fácilmente y de manera fiable con una pipeta convencional. Este volumen mínimo es del orden de aproximadamente 10 microlitros. Por debajo esto, transportarla en recipientes "grandes" tales como pipetas, frascos, etc. pierde líquido, por lo tanto analito. Adicionalmente, existen problemas de evaporación y adsorción en las paredes de los recipientes durante estas manipulaciones.

En el caso de una baja concentración del analito en la muestra inicial, esto puede provocar la completa desaparición del analito o una disminución de la cantidad del mismo de manera que puede ser indetectable.

Además de los inconvenientes mencionados anteriormente, estas manipulaciones son caras en términos de material y llevan mucho tiempo. Esto sigue siendo un problema constante para muchas aplicaciones industriales, por ejemplo la detección de microorganismos patógenos en una muestra biológica o una muestra industrial.

La solicitud internacional, WO-A-02/43865, concierne a un método para transportar un analito presente en una muestra, un método para concentrar un analito presente en una muestra, y un dispositivo para implementar dichos

métodos. El método para trasportar un analito presente en una muestra consiste en preparar una solución a partir de la muestra en donde el analito se fija sobre partículas magnéticas; introducir esta solución en un primer recipiente conectado por medio de un cuello de botella a un segundo recipiente; desplazar con un sistema magnético el analito fijado sobre partículas magnéticas desde el primer recipiente al segundo recipiente por medio del cuello de botella; el segundo recipiente se llena con toda o parte de dicha solución y/o con otra solución.

Aquí de nuevo, la solución se proporciona para cómo concentrar partículas magnéticas en un pequeño volumen de líquido. Sin embargo, la separación no se trata eficientemente, especialmente si el imán es de tamaño pequeño comparado con el primer recipiente, e incluso no se trata la mezcla.

Por lo tanto existe la necesidad real de un método y un dispositivo para tratar analito unido a partículas magnéticas mientras al mismo tiempo se conserva la cantidad de analito presente en el inicio, por ejemplo con el fin de aumentar la sensibilidad y la especificidad de ensayos diagnósticos y de cualquier reacción química dirigida hacia el analito, y vencer los inconvenientes mencionados anteriormente.

La presente invención satisface esta necesidad, y no tiene únicamente la ventaja de vencer los inconvenientes mencionados anteriormente, sino también muchas otras ventajas, que apreciarán los expertos en la técnica.

Así ninguno de los documentos descritos anteriormente presenta un proceso que ofrezca las ventajas de separar, mezclar y concentrar moléculas de interés de una muestra líquida en únicamente un recipiente. De manera semejante, no proponen un recipiente que tenga características técnicas que autoricen la ejecución de dicho proceso. Independientemente del método reivindicado, puede ser manual o automático, o accionado por un dispositivo automatizado o no.

La meta principal de la presente invención es proponer un conjunto según la reivindicación 1.

En una realización del conjunto, la estación de separación comprende al menos dos imanes, los ejes polares de los imanes forman juntos un ángulo diferente de 180°, preferiblemente incluido entre 60 y 150° y más preferiblemente incluido entre 80 y 120°.

En otra realización del conjunto, la estación de lavado comprende al menos dos imanes, los ejes polares de los imanes son paralelos entre sí.

Según otra realización del conjunto descrito anteriormente, el volumen del compartimento medio es menor comparado con el compartimento superior (y mayor comparado con el compartimento inferior).

Ahora se describirá la invención aún más, por medio de ejemplos, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La figura 1 es una vista en perspectiva de un set constituido por ocho recipientes según la invención.

La figura 2 es una vista en sección transversal del set de recipientes según A-A de la figura 1.

La figura 3 es una vista en sección transversal del set de recipientes según B-B de la figura 2.

La figura 4 representa el detalle C de la figura 3.

La figura 5 representa una vista, que es similar a la figura 2, en el caso de que el envase llenado con la muestra biológica se disponga entre dos imanes, actuando simultáneamente sobre el fluido.

La figura 6 representa una vista, que es idéntica a la figura 5, después de que los dos imanes han atraído todas las partículas magnéticas presentes en la muestra inicial.

La figura 7 representa una vista, que es similar a la figura 6, cuando dichos dos imanes se mueven en dirección descendente y transfieren las partículas magnéticas desde el compartimento de incubación al compartimento de lavado.

La figura 8 representa una vista, que es similar a la figura 7, cuando los imanes han llegado a su posición final y todas las partículas magnéticas han formado una única pastilla.

La figura 9 es una vista en sección transversal de un envase de reacción según D-D de la figura 5.

La figura 10 representa una vista, que es similar a la figura 8, cuando el envase se dispone entre otros dos imanes, y después de la retirada de la parte líquida de la muestra biológica.

La figura 11 representa una vista, que es similar a la figura 10, cuando el líquido de lavado se añade por medio de una punta oblicua para evitar salpicaduras.

La figura 12 representa una vista, que es similar a la figura 11, que muestra el movimiento de aquí para allá de las partículas magnéticas dentro del líquido de lavado.

La figura 13 es una vista en sección transversal de un envase de reacción según E-E de la figura 12 que explica el vínculo entre el movimiento de aquí para allá de las partículas magnéticas y el movimiento relativo del set de envases con respecto a los imanes.

La figura 14 representa una vista, que es similar a la figura 10, cuando el envase se dispone entre los mismos dos imanes, pero después de la retirada de dicho líquido de lavado.

La figura 15 representa una vista, que es similar a la figura 14 concerniente a la posición de los imanes, cuando se añade el tampón de salida o elución por medio de la punta, descrita en la figura 11, o por medio de otra punta.

La figura 16 representa una vista, que es bastante similar a la figura 7, cuando los otros dos imanes se mueven hacia abajo y transfieren las partículas magnéticas desde el compartimento de lavado al compartimento de salida.

La figura 17 representa una vista, que es similar a la figura 16, después de la retirada de tampón de salida presente en el compartimento de lavado. En esta fase, el tampón de salida está sometido a un sistema de calentamiento con el fin de lograr la elución de molécula de interés.

La figura 18 representa una vista, que es similar a la figura 13, que explica el movimiento de aquí para allá de las partículas magnéticas en el tampón de salida debido al movimiento relativo del set de envases con respecto a los imanes.

La figura 19 representa una vista, que es bastante similar a la figura 16, pero que usa los dos primeros imanes para mover hacia arriba y transferir las partículas magnéticas desde el compartimento de salida al compartimento de lavado donde no hay presente líquido

La figura 20 representa una vista, que es bastante similar a la figura 19, donde se mantiene el movimiento hacia arriba de modo que los imanes transfieren las partículas magnéticas desde el compartimento de lavado al compartimento de incubación para autorizar la retirada del resto de tampón de salida que contiene la moléculas de interés eluidas desde el compartimento de salida.

La figura 21 es una vista en perspectiva de un cuerpo principal del soporte de puntas separado de ocho puntas, puntas que se podrían conectar a soportes de punta que tienen una forma complementaria.

La figura 22 es una vista inferior de un cuerpo principal al que se han conectado las puntas.

Finalmente la figura 23 muestra una presentación gráfica del resultado de un set de reacciones PCR en tiempo real en las que se ha amplificado un fragmento de ADN del virus herpes porcino (PhHV-1) tras el aislamiento del virus de diferentes muestras usando el dispositivo descrito en esta solicitud de patente. A lo largo del eje horizontal se indican diferentes números de muestra. El eje vertical muestra el ciclo umbral para cada muestra cuando se observa señal PCR (reacción en cadena de la polimerasa) positiva. Se han usado cuatro tipos diferentes de muestra (LCR, plasma, suero y sangre). Con cada tipo de muestra se han usado 20 muestras individuales.

1 - Descripción de la realización preferida:

1.1 - Detalles del envase de reacción:

El envase 3 se describe bien en las figuras 1-4. Consiste en tres compartimentos:

un compartimento grande superior de incubación 4 con forma de embudo del envase 3,

un compartimento medio alargado de lavado 5 con una sección transversal constante del envase 3

un compartimento inferior alargado de salida 6 con una sección transversal constante del envase 3 Esta configuración obliga a tener una abertura superior 19 donde es posible introducir/dispensar o retirar líquido presente dentro de dicho envase 3, pero también una base cerrada 7. Finalmente, según la figura 4, el envase 3 tiene un eje longitudinal 8.

Haciendo referencia ahora más particularmente a la figura 1, los envases 3 en una configuración preferencial se disponen para constituir un set 23, que tiene una lengua de manipulación 24 que facilita el manejo por parte de los usuarios. Se podrían añadir medios de posicionamiento no representados en las figuras, con el fin de proporcionar la instalación en un dispositivo automático incluso más eficiente que lo usual.

Las características principales son:

Preferiblemente, la altura total del envase 3 son 40 mm para facilitar la recuperación del tampón de salida 21 desde el compartimento de salida 6 usando una punta de filtro desechable estándar, como 22, 25, 26.

El volumen del compartimento de incubación 4 son 2-6 ml, preferiblemente 4 ml. En la última configuración, que es el diseño en este momento, las dimensiones son 20 mm de altura, 25 mm de profundidad, 9 mm de anchura.

El volumen del compartimento de lavado 5 son 0,1-1 ml, preferiblemente 0,2 ml. En la última configuración, que es el diseño en este momento, la forma cilíndrica tiene 5 mm de diámetro y 8 mm de altura.

El volumen del compartimento de salida 6 son 10-100 µl, preferiblemente 20 µl. En la última configuración, que es el diseño en este momento, el cilindro es de 5 mm de altura y 2 mm de diámetro.

El grosor de la pared del envase es de entre 0,2 mm y 1 mm (diseño en este momento: 0,5 mm).

Preferiblemente, el envase de reacción es un plástico desechable producido mediante moldeo por inyección, por ejemplo usando polipropileno. Para permitir una manipulación conveniente para un operador, se recomienda integrar varios envases de reacción 3 en un set 23. La solicitante ha realizado un diseño en el que un set comprende ocho envases 3. Por la misma razón es conveniente integrar las puntas 21, 25, 26 con su base común 29 para obtener una única unidad en la que el número de puntas sea igual al número de envases de reacción 3 y en la que el espaciado entre puntas coincida con la posición de los envases en un set 23.

Preferiblemente, el dispositivo usa imanes fabricados de neodimio (NdFeB) con un campo remanente de 1,2 Tesla. Con el dispositivo de este momento, imanes cilíndricos de 6 mm diámetro y 7 mm de longitud han demostrado ser adecuados para los imanes 9, 10 13 y 14.

Cuando se separan partículas magnéticas 2 del líquido 1 en el compartimento de incubación 4, el espaciamiento entre la cara de los imanes 9 y 10 y la pared del envase de reacción es típicamente de 0,5 mm. Durante el movimiento de lavado (F11, figura 13) los imanes 13 y 14 se trasladan con respecto al envase con una velocidad típica de 1 cm por segundo. Cuando se pasa el envase, la distancia a la pared del compartimento de lavado 5 es típicamente de 1 mm. Durante el movimiento de elución (F11, figura 18) los imanes 13 y 14 se trasladan con respecto al envase con una velocidad típica de 1 cm por segundo. Cuando se pasa el envase, la distancia a la pared del compartimento de salida 6 es típicamente de 2 mm.

1.2- Método según la Invención:

En una realización preferida, el dispositivo descrito en esta solicitud se combina con algunos componentes estándar tales como una bomba de succión y una línea de líquido para aspirar líquido, un módulo dispensador de líquido y algunos medios mecánicos para trasladar los imanes, la punta de aspiración y el dispensador con respecto a los envases de reacción. En una realización preferida, este dispositivo es útil para aislar ácidos nucleicos de una muestra biológica inicial compleja, tales como sangre completa, suero de sangre, capa leucocitaria (la capa leucoplaquetaria o fracción de leucocitos de la sangre), orina, heces, líquido ceforraquídeo, esperma, saliva, tejidos, cultivos celulares y similares. El ácido nucleico, aislado del material biológico mencionado anteriormente, también puede comprender el ácido nucleico endógeno del organismo del que se deriva la muestra y cualquier ácido nucleico extraño (vírico, fúngico, bacteriano o parasitario).

El dispositivo se usa según el siguiente procedimiento:

(a) Adición de mezcla líquida al envase de reacción

Se añade una mezcla 1 de la muestra primaria, un tampón de lisis y partículas magnéticas 2 al envase de reacción 3. Las moléculas objetivo (ácido nucleico, no mostrado en las figuras) se liberan de las células u organismos en la muestra y se unen a las partículas magnéticas 2. Esta etapa de proceso se define como "incubación". En esta etapa, todos los compartimentos, que constituyen dicho envase 3, se rellenan con el fluido 1, es decir, el compartimento de incubación 4, el compartimento de lavado 5 y el compartimento de salida 6. Debido a la diferencia de tamaño entre dichos compartimentos 4-6, la mayoría de dicho fluido 1 está contenido en el compartimento de incubación 4 del envase de reacción 3. Típicamente, el tiempo de incubación es de aproximadamente 5 minutos.

(b) Separación de partículas de la muestra

Después de la incubación, la mezcla líquida 1 en el envase 3 se dispone entre dos imanes 9A o 9B o 9C, etc. y respectivamente 10A o 10B o 10C, etc.; cada uno 9 o 10 genera un campo magnético respectivamente 11 y 12, como se describe en la figura 5. La configuración también se define bien en la figura 9. Como resultado, las partículas magnéticas 2 se recogen - como pastilla - en dos posiciones en la pared lateral del compartimento de incubación 4 correspondiente a la ubicación de los imanes (figura 6). El tiempo de recogida es típicamente alrededor de 1 minuto.

(c) Transferencia de partículas al compartimento de lavado

Según la figura 7, las pastillas de partículas magnéticas 2 se transfieren desde el compartimento de incubación 4 al compartimento de lavado 5 al mover los imanes 9 y 10 en dirección descendente según F2. También es posible lograr este movimiento moviendo el envase 3 en dirección ascendente según F1, o combinar movimientos hacia abajo (F2) y hacia arriba (F1) respectivamente de dichos imanes 9 y 10 y dicho envase 3. Durante ese movimiento(s), las partículas 2 inicialmente recogidas por el imán 10, saltan hacia el imán 9, según F3, donde se unen con las partículas 2 inicialmente recogidas por el imán 9. Tras esta consolidación, todas las partículas magnéticas 2 se transfieren al compartimento de lavado 5 como se muestra en la figura 8.

(d) Lavado de partículas magnéticas

Se lavan las partículas magnéticas 2 para retirar todos componentes de muestra así como otros reactivos que podrían interferir con la aplicación aguas abajo. Se logra lavar al disponer el envase de reacción 3 a los imanes 13 y 14 y la retirada subsiguiente (F5) de la muestra líquida del envase de reacción 3 usando la punta 22 (figura 10), que se introduce verticalmente, según F4, en dicho envase 3. A continuación, según la figura 11, se añade un líquido de lavado fresco 20 a dicho envase 3 según F9 por medio de una punta 25 introducida en el envase según F8, que está en un ángulo oblicuo comparado con la posición vertical del envase 3 con el fin de eliminar cualquier riesgo de salpicaduras que podrían generar gotitas sobre la pared lateral interna, perjudiciales para etapas de proceso futuras adicionales. Durante la retirada de muestras y adición de líquido, las partículas magnéticas 2 son retenidas en la pared lateral del compartimento de lavado 5 bajo la acción de los imanes 13 y 14. A continuación, los imanes 13 y 14 se mueven en la dirección F11, como se representa en la figura 13, para transferir las partículas 2 adelante y atrás, según F10 de la figura 12, entre lados opuestos del compartimento de lavado 5 para llevarlas al contacto con el líquido de lavado 20. En esas circunstancias, como alternativa se someten las partículas magnéticas 2 a dos campos magnéticos opuestos 15 y 16.

Obviamente también es posible lograr este movimiento en la dirección F11 al mover el envase 3 con respecto a los imanes 13 y 14, o combinar movimientos de dichos dos imanes 13 y 14 y dicho envase 3.

- 5 La etapa (d) se puede repetir hasta que se han obtenido suficientes prestaciones de lavado. En caso apropiado, se puede usar una secuencia de diferentes líquidos de lavado. En caso de que se usen diferentes líquidos de lavado, estará claro que la punta de dispensación se lava adecuadamente cuando se cambian tampones.

10 Los imanes 13 y 14 se colocan en geometrías de distribución intermedias. Esta disposición permite el uso del método de la invención para dar un formato de alto rendimiento. Una realización en donde los envases y los imanes se colocan en geometrías de distribución intermedias se ilustra en la figura 13. Los envases 3 se colocan en geometría de distribución con los imanes 13A, 13B, 13C, etc., en un lado y 14A, 14B, 14C, etc., en el otro lado, fijados a una segunda distribución 18, usada como soporte para los imanes, que se traslada con respecto a los envases 3.

15 De esta manera se procesa simultáneamente una serie grande de muestras. La adición y aspiración de líquidos puede ser a mano o mediante un instrumento dispensador automatizado multipunta como se conoce en la técnica. El solicitante expone bien una configuración de este tipo en una solicitud anterior presentada con el número de solicitud WO-A-01/05510 0 publicada el 25 de enero de 2001 y titulada: "Device and method for mixing magnetic particles with a fluid and optionally separating the particles from the fluid and use thereof in purification methods". Los lectores pueden encontrar información pertinente acerca de dicha configuración en este documento. Esta es la razón por la que su contenido se adjunta como referencia.

(e) Preparación para la elución

25 Mientras las partículas magnéticas 2 son retenidas en la pared lateral del compartimento de lavado 5, se retira todo el líquido de lavado del envase 3, según F13, usando la punta 26 que se introduce en el envase 3 según F12, para terminar en la configuración que se representa en la figura 14. A continuación, se añade un tampón de salida o elución 21 por medio de la punta 26 o una nueva punta, no representada en el dibujo, introducida según F14, al envase de reacción 3 para llenar (F15) los compartimentos de salida y de lavado 6 y 5. Tras esos, las partículas magnéticas 2 se transfieren desde el compartimento de lavado 5 al compartimento de salida 6 al mover los imanes 13 y 14 en la dirección descendente (F16) y/o al mover los envases 3 en la dirección ascendente (F17) (figura 16). A continuación, se establece el volumen del tampón de salida 21 al hacer descender la punta 26 adentro del envase de reacción 3, según F18, mientras se aspira parte del líquido, según F19, hasta un nivel que corresponde con el volumen especificado del tampón de salida (figura 17).

35 Aunque las partículas magnéticas 2 están en contacto con el tampón de elución 21 no tiene lugar una significativa liberación de objetivo debido al hecho de que:

40 el tiempo de contacto es corto,
se recogen dichas partículas magnéticas 2 como aglutinación, y
el tampón de elución 21 está a temperatura ambiente.

(f) Calentamiento del tampón de elución

45 Un elemento calentador 33 encierra el compartimento de salida 6 del envase de reacción 3 para calentar el tampón de salida a una temperatura especificada (figura 17). Una temperatura típica para el proceso de elución son 60 a 80° C. Esta temperatura se aplica durante aproximadamente de 15 segundos a 10 minutos, preferiblemente de 1 minute a 6 minutos y más preferiblemente 3 minutos. Estas condiciones autorizan una liberación significativa de objetivo

(g) Elución de ácido nucleico de partículas magnéticas

50 Las moléculas objetivo se liberan de las partículas magnéticas 2 y se recuperan en el tampón de salida 21, únicamente presente en el compartimento inferior 6, al mover los imanes 13 y 14 en la dirección F11, según la figura 18. De manera similar a la etapa de lavado (d), las partículas 2 se trasladan adelante y atrás entre lados opuestos del compartimento de salida 6 para llevar dichas partículas 2 a un contacto eficiente con el tampón de salida 21. Durante esta etapa el calentador 33 encierra el compartimento de salida 6 para controlar la temperatura del tampón de salida 21.

(h) Separación de partículas magnéticas del tampón de salida

60 Tras la etapa de elución, las partículas magnéticas 2 se despejan (separan) del tampón de salida 21 al disponer el envase 3 de muestra o los imanes 9 y 10, véase la figura 19, para permitir que el imán 9 recoja las partículas 2 en la pared lateral del compartimento de salida 6 y posteriormente mueva el envase 3 en la dirección descendente, según F20, y/o mueva los imanes 9 y 10 en la dirección ascendente, según F21, con el fin de mantener dichas partículas 2 en la pared lateral del compartimento de incubación 4, como se describe en la figura 20, u opcionalmente del compartimento de lavado 5.

Entonces el tampón de elución 21 presente en el compartimento de salida 6 se podría usar para procesamiento adicional o, según la figura 20, ser transferido por medio de la punta 26, que se introduce (F22) en el envase 3 y el tampón de elución 21, que contiene las moléculas objetivo, se retira por aspiración (F23).

5 Estará claro para cualquier experto en la técnica que el dispositivo descrito anteriormente así como el método para usar el dispositivo se integran fácilmente en un sistema automatizado al realizar las traslaciones para el envase de reacción, los imanes, el calentador y las puntas de una manera automatizada, por ejemplo usando un conjunto de accionadores lineales controlados por motores paso a paso. También es obvio que, dependiendo de la aplicación particular, se puedan omitir etapas particulares del protocolo anterior, tales como (f), (g) o (h).

10 Las figuras 10 y 14 son bastante similares, ya que las partículas magnéticas 2 son mantenidas en posición en un único envase por únicamente un imán 13, por ejemplo. Cada envase vecino 3 del set 23 contiene también partículas magnéticas 2 que son atraídas por el imán 14. En otras palabras, envases vecinos 3 tienen sus partículas magnéticas 2 en paredes laterales opuestas. Para facilitar la introducción de las puntas 22 o 25 en el set 23 de ocho envases, el posicionamiento de dichas ocho puntas se ha implementado de una manera mejorada, como se describe en las figuras 21 y 22. Así, todas las puntas que colaboran con un set 23 de envases 3 se asocian con un cuerpo principal 29, este último tiene ocho soportes 30 de punta, cada 30 desplazado de otro. Más específicamente cada punta comprende dos extremos libres, uno es el extremo inferior 27 y el otro es el extremo superior 28 de la punta. Los extremos libres 27 o 28 se disponen simétricamente a lo largo de dos líneas, cada línea dibujada por cuatro extremos inferiores 27 o cuatro extremos superiores 28, y las dos líneas son paralelas entre sí.

Obviamente cuando las puntas 22 o 25 se introducen en los envases 3, según las figuras 10 y 14, las puntas se alejan tanto como sea posible de las partículas magnéticas 2, para evitar un contacto prejudicial para etapas de proceso futuras adicionales.

25 Haciendo referencia ahora más particularmente a la figura 21, el cuerpo principal 29 en una configuración preferencial comprende una lengua de manipulación 32 que facilita el manejo por parte de los usuarios. Se podrían añadir medios de posicionamiento no representados específicamente en las figuras, con el fin de proporcionar la instalación en un dispositivo automático incluso más eficiente que lo usual. Además, dicho cuerpo principal 29 comprende una abertura de admisión/escape 31 para permitir la dispensación o la retirada de fluido. Esta abertura 31 también podría servir como medios de posicionamiento.

35 Se presentan cuatro ejemplos en los que se aíslan ácidos nucleicos de una muestra aportada usando la invención presentada anteriormente. Con estos ejemplos se obtuvieron los tampones de lavado, el tampón de elución y las partículas magnéticas a partir de "reactivos de extracción magnética de NucliSens" (código de artículo 200297). El tampón de lisis es "tampón de lisis de NucliSens" (código de artículo 200295). Los productos NucliSens son suministrados por bioMerieux B. V. (Boxtel, Países Bajos)

2 - Ejemplo 1: Concentración de ARN ribosómico de muestras de plasma:

2.1 - Materiales y métodos:

Se extrae ARN objetivo de células de Escherichia coli usando el kit Qiagen ARN/ADN maxi (código de artículo 14162, Qiagen, Hilden, Alemania). Para cada muestra, se usan como aporte 2 microgramos (µg).

45 La muestra está constituida por muestras de plasma normal de EDTA/citrato a partir de un grupo de 100 donaciones de sangre individuales.

La cuantificación de ARN se realiza usando un marcador luminiscente para ARN (Sybr Green-II, suministrado por Molecular Probes: artículo S-7564) en combinación con un lector luminiscente para placas de microtitulación ("Victor 2", proveedor Wallac Oy, Turku, Finlandia: 1420-contador multietiqueta).

50 También se determina la pureza del tampón de salida a partir del valor relativo para la absorción espectral a 260 nm y 280 nm (A260/A280) usando un espectrómetro de UV (proveedor Unicam, Cambridge, Gran Bretaña: Unicam UV-1).

2.2 - Preparación de la muestra:

Se prepara un set de veinticuatro muestras de plasma de la siguiente manera:

Con cada muestra, se añade 1 ml de plasma al envase de reacción y se mezcla con 2 ml de tampón de lisis de NucliSens.

A continuación se añade el ARNr objetivo a esa mezcla usando un aporte de 2 µg de ARN para cada muestra.

Posteriormente, se añade 1 mg de partículas magnéticas a las muestras de plasma lisadas y se produce una dispersión homogénea usando una pipeta manual.

2.3 - Método de extracción:

Se procesa simultáneamente un lote de veinticuatro muestras según el procedimiento indicado anteriormente como etapas (a) a (g). Las muestras se añaden a tres sets de envases de reacción, cada set comprende ocho envases idénticos.

- 5 Tras recoger las partículas magnéticas del compartimento de incubación (el tiempo de recogida fue 1 minuto), las partículas se transfieren al compartimento de lavado y se lavan usando tampón de lavado 1 y tampón de lavado 2 de NucliSens, usando dos ciclos de 3 ml y 1 ml en el primer y segundo ciclo respectivamente.

- 10 Tras el lavado, las partículas se transfieren al compartimento de salida, en el que se libera el ARN objetivo de las partículas al mezclar las partículas en el tampón de elución de NucliSens (tampón de lavado 3) durante 5 minutos. Durante la elución, la temperatura del tampón son 60° C. El volumen del tampón de salida son 20 µl.

Tras la elución, las partículas magnéticas se separan del tampón de salida usando los imanes 9.

- 15 Tras completar el protocolo, se mide la cantidad de ARN recuperado en el compartimento de salida de cada envase usando un marcador de ARN luminiscente. Para esa finalidad, se transfieren 10 µl del tampón de salida desde cada envase de reacción a la poceta de una placa de microtitulación y a cada poceta se añaden 190 µl de solución Sybr Green. En cada poceta, la señal óptica detectada por el lector de placa luminiscente (Victor2 es una medida directa de la cantidad de ARN que está presente en esa poceta.

- 20 2.4 - Resultado
Para las veinticuatro muestras, la cantidad promedio de ARNr objetivo en el compartimento de salida del envase son 132 µg con una desviación estándar de 50 ng. Esto corresponde a un rendimiento medio del 66 %.

- 25 La pureza de la salida es excelente según se concluye de la proporción A260/A280 usando el espectrómetro de UV. El tampón de salida muestra una proporción de 2,1 mientras que ARN puro en este tampón tiene una proporción A260/A280 entre 1,9 y 2,1.

- 30 La consistencia del ARN objetivo se determina usando el 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos). Este instrumento detecta las dos bandas discretas de ARN correspondientes a ARN 16S y 23S. No se han detectado otros productos tales como fragmentos de ARN más pequeños.

- 35 El tiempo total para completar el procedimiento de extracción para este lote de veinticuatro muestras son 30 minutos, empezando después de añadir las partículas magnéticas a las muestras lisadas. No se necesita intervención del operador para producir el ARN concentrado en la salida.

3 - Ejemplo 2: Concentración de ADN plásmido de muestras de plasma:

3.1 - Materiales y métodos:

- 40 El objetivo es ADN plásmido, pBR322 (artículo N3033L, New England Biolabs Inc., Beverly, MA), linealizado por BamH1 (artículo E1010WH, Amersham Bioscience Corp, NY, EE. UU.). Se usan seis µg de ADN como aporte por muestra

- 45 La muestra está constituida por 0,1 ml de plasma normal de EDTA/citrato de donaciones de sangre

3.2 - Preparación de la muestra:

- 50 Se procesan simultáneamente veinticuatro muestras, usando el mismo procedimiento que con el ejemplo 1. Las muestras de plasma individuales se añaden a los envases de reacción. A continuación se añaden 2 ml de tampón de lisis de NucliSens. Posteriormente, el ADN plásmido se añade a la muestra y se añade 1 mg de partículas magnéticas a la mezcla.

3.3 - Método de extracción:

- 55 La etapa de recogida, las etapas de lavado y la etapa de elución del procedimiento de extracción son idénticas al ejemplo 1.

3.4 - Resultado:

- Tras completar el procedimiento, se determina la cantidad de ADN extraído a partir de la densidad óptica del tampón de salida a 260 nm.

- 60 La cantidad promedio de ADN recuperada del envase de reacción son 3,1 µg con un coeficiente de variación del 4 % entre diferentes envases. Esto corresponde a un rendimiento de aislamiento del 52 % usando 6 µg de ADN como aporte.

- 65 La proporción media A260/A280 para el tampón de salida es 1,9. Para ADN puro en el tampón de salida esta proporción es entre 1,7 y 2,1.

Como con el ejemplo 1, el tiempo necesario para completar el procedimiento de extracción son 30 minutos empezando después de añadir las partículas magnéticas.

4 - Ejemplo 3: Recuperación de ARN vírico de muestras de esputo:

4.1 - Materiales y métodos:

En este experimento, la recuperación del ARN VIH que se añade a nueve muestras de esputo se determina usando el ensayo NucliSens EasyQ HIV-1 versión 1.1 (artículo 285029, bioMérieux B.V., Boxtel, Países Bajos).

El ARN es ARN VIH obtenido de un stock de virus cultivado VIH-1 tipo B (HXB2) que se lisa usando el tampón de lisis de NucliSens y se calibra usando la norma internacional WHO de ARN VIH-1.

Las muestras de esputo se obtuvieron de University Hospital de Antwerpen (Bélgica).

4.2 - Preparación de la muestra:

Con cada muestra de esputo se mezcla un volumen de 1 ml con 0,5 ml de solución de proteasa (100 mg/ml) y se incuba sobre un agitador de placa durante 20 minutos a temperatura ambiente para obtener una muestra licuada.

El ARN HIV objetivo se añade a un tubo que contiene 2 ml de tampón de lisis de NucliSens, usando un aporte de 30,000 para cada muestra. Junto con el ARN VIH, al tampón de lisis se añade un calibrador ARN que es parte del kit EasyQ. A continuación las muestras de esputo licuadas se añaden al vaso de reacción junto con el tampón de lisis (2 ml) que contiene el ARN. Tras 10 minutos, se añade 1 mg de partículas magnéticas a cada muestra. Se obtiene una dispersión homogénea al mezclar con una pipeta manual.

4.3 - Extracción de ARN:

El procedimiento de extracción continúa como con los ejemplos 1 y 2 descritos anteriormente.

4.4- Detección de ARN:

Al final del procedimiento de extracción, la ARN HIV y el calibrador ARN se concentran en 12 µl de tampón de elución en el compartimento de salida. Del compartimento de salida se aspiran dos fracciones de 5 µl cada una y se usan como aporte a un ensayo NucliSens EasyQ. Para la detección, se sigue el procedimiento que se indica en el manual del ensayo EasyQ.

4.5 - Resultado:

Los resultados se presentan en la siguiente tabla:

Número de muestras	Resultado de EasyQ (copias víricas)	
	Reacción 1	Reacción 2
1	11,000	10,000
2	11,000	9,700
3	9,600	9,200
4	12,000	13,000
5	11,000	16,000
6	18,000	13,000
7	9,200	10,000
8	12,000	14,000
9	20,000	12,000

A partir de estos resultados, se concluye que el dispositivo descrito en esta solicitud puede aislar bien ARN vírico de muestras de esputo y lo concentra en una forma que facilita la detección usando métodos de amplificación estándar.

5 - Experimento 4: Recuperación de ADN vírico de diferentes tipos de muestras:

5.1 - Materiales y métodos:

Este experimento representa una serie de cuatro rondas de extracción en veintidós muestras cada una. Con cada ronda se usa un tipo de muestra diferente:

- 5 Ronda 1: muestras de plasma de donaciones individuales (1 ml por muestra)
 Ronda 2: Líquido cefalorraquídeo (LCR) (0,1 ml por muestra)
 Ronda 3: muestras de suero de donaciones individuales usando 1 ml por muestra
 Ronda 4: muestras de sangre completa (0,1 ml por muestra).

10 5.2 - Preparación de la muestra:

Cada muestra se añade a 2 ml de tampón de lisis de NucliSens.

Como objetivo, se añade el virus herpes porcino (PhHV-1) a veinte de las muestras lisadas en cada ronda. Se usaron dos muestras (21ª y 22ª) como control negativo (sin ADN añadido).

15 5.3 - Extracción de ADN:

El método de extracción para cada ronda (tipo de muestra) es idéntico al procedimiento descrito en los ejemplos 1, 2 y 3.

20 5.4 - Detección de ADN:

El ADN que se recupera en el tampón de salida se detecta usando PCR en tiempo real. Para cada muestra se determina el número de ciclos PCR (TC) necesarios para producir una señal positiva.

La figura 23 muestra una presentación gráfica de estos valores TC para todas las muestras. Las muestras de control negativo fueron todas negativas.

25 5.5 - Resultado:

De este conjunto de experimentos, se concluye que el dispositivo descrito en esta solicitud de patente puede aislar bien ácido nucleico de partículas de virus de tipos de muestras diferentes con excelente rendimiento.

30 REFERENCIAS

1. : Fluido o mezcla
2. : Partículas magnéticas
3. : Envase de reacción
4. : Compartimento grande superior de incubación con una forma de embudo del envase 3
- 35 5. : Compartimento medio alargado de lavado con una sección transversal constante del envase 3
6. : Compartimento inferior alargado de salida con una sección transversal constante del envase 3
7. : Base cerrada del envase 3
8. : Eje longitudinal del envase 3
9. : Imanes (A, B, C, D, etc.) presentes en un lado del set de recipientes usados para la etapa de separación
- 40 10. : Imanes (A, B, C, D, etc.) presentes en el otro lado del set de recipientes usados para la etapa de separación
11. : Eje polar (A, B, C, D, etc.) del imán (9A, 9B, 9C, 9D, etc.)
12. : Eje polar (A, B, C, D, etc.) del imán (10A, 10B, 10C, 10D, etc.)
13. : Imanes (A, B, etc.) presentes en un lado del set de recipientes usados para la(s) etapa(s) de mezcla y/o concentración
- 45 14. : Imanes (A, B, etc.) presentes en el otro lado del set de recipientes usados para la(s) etapa(s) de mezcla y/o concentración
15. : Eje polar (A, B, C, D, etc.) del imán (13A, 13B, 13C, 13D, etc.)
16. : Eje polar (A, B, C, D, etc.) del imán (14A, 14B, 14C, 14D, etc.)
- 50 17. : Soporte de los imanes (9A, 9B, 9C, 9D, etc., o 10A, 10B, 10C, 10D, etc.)
18. : Soporte de los imanes (13A, 13B, 13C, 13D, etc., o 14A, 14B, 14C, 14D, etc.)
19. : Abertura superior del envase 3
20. : Líquido de lavado
21. : Tampón de salida
- 55 22. : Punta para añadir o retirar fluido 1
23. : Set de envases 3
24. : Lengua de manipulación del set de envases 23
25. : Punta para añadir líquido de lavado 20 y/o tampón de elución 21
26. : Punta para retirar líquido de lavado 20 y/o tampón de salida 21
- 60 27. : Extremo inferior de la punta 25
28. : Extremo superior de la punta 25
29. : Cuerpo principal del soporte 30 de puntas
30. : Soporte de punta
31. : Abertura de admisión/escape del cuerpo principal 29
- 65 32. : Lengua de manipulación del cuerpo principal 29
33. : Sistema de calentamiento

- F1. : Movimiento hacia arriba del envase 3
- F2. : Movimiento hacia abajo de los imanes 9 y 10
- F3. : Atracción magnética de las partículas 2
- F4. : Movimiento hacia abajo de la punta 22
- 5 F5. : Retirada del fluido 1 por aspiración con la punta 22
- F8. : Movimiento hacia abajo de la punta 25
- F9. : Dispensación de líquido de lavado 20 expulsado desde la punta 25
- F10. : Movimiento de aquí para allá de las partículas magnéticas 2
- F11. : Movimiento relativo del set 23 con respecto a los imanes 13 y 14
- 10 F12. : Movimiento hacia abajo de la punta 25
- F13. : Retirada del líquido de lavado 20 por aspiración con la punta 25
- F14. : Movimiento hacia abajo de la punta 26
- F15. : Dispensación de tampón de salida 21 expulsado desde la punta 26
- F16. : Movimiento hacia abajo de los imanes 13 y 14
- 15 F17. : Movimiento hacia arriba del envase 3
- F18. : Movimiento hacia abajo de la punta 26
- F19. : Retirada del tampón de salida 21 presente en el compartimento de lavado 5
- F20. : Movimiento hacia abajo del envase 3
- F21. : Movimiento hacia arriba de los imanes 13 y 14
- 20 F22. : Movimiento hacia abajo de la punta 26
- F23. : Retirada del tampón de salida 21 por aspiración con la punta 26

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un conjunto que comprende:
- 10 un envase de reacción (3) constituido por un compartimento superior grande con una forma de embudo (4), un compartimento inferior alargado con una sección transversal sustancialmente constante (5, 6) y una base cerrada (7), en donde el compartimento superior (4) comprende una primera parte que tiene una sección transversal constante y una primera parte en forma de embudo, en donde el tamaño de una sección transversal de la primera parte es mayor que el tamaño de una sección transversal del compartimento inferior alargado (5, 6), en donde el eje longitudinal de la primera parte es paralelo pero está espaciado del eje longitudinal del compartimento inferior (5, 6), en donde el compartimento inferior está constituido por un
- 15 compartimento medio (5) conectado en un lado a la primera parte en forma de embudo, y un compartimento inferior (6), que se conecta en un lado al compartimento medio (5) y en otro lado a dicha base cerrada (7); y un dispositivo para extraer posibles moléculas de interés de un fluido al que se añade una suspensión de partículas magnéticas o paramagnéticas contenidas en el envase de reacción (3) y que pueden unir las moléculas de interés que comprende:
- 20 al menos una estación de separación para capturar las partículas magnéticas presentes en el compartimento superior grande (4) del envase de reacción (3),
al menos una estación de lavado para mezclar dichas partículas magnéticas presentes en el compartimento medio (5) del envase de reacción (3),
al menos una estación de concentración para mezclar dichas partículas magnéticas presentes en el
- 25 compartimento inferior (6) del envase de reacción (3), y
al menos unos medios de pipeteo para dispensar y/o para retirar parte o todo el fluido, el líquido de lavado y el tampón de salida.
- 30 2. El conjunto según la reivindicación 1, en donde la estación de separación comprende al menos dos imanes, los ejes polares de los imanes forman juntos un ángulo diferente de 180°, preferiblemente incluido entre 60 y 150° y más preferiblemente incluido entre 80 y 120°.
- 35 3. El conjunto según la reivindicación 1 ó 2, en donde la estación de lavado comprende al menos dos imanes, los ejes polares de los imanes son paralelos entre sí.
4. El conjunto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el volumen del compartimento medio (5) es más pequeño comparado con el compartimento superior (4) y más grande comparado con el compartimento inferior (6).

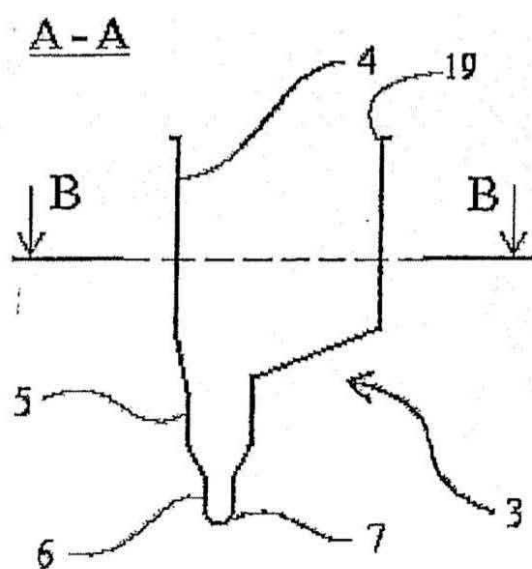
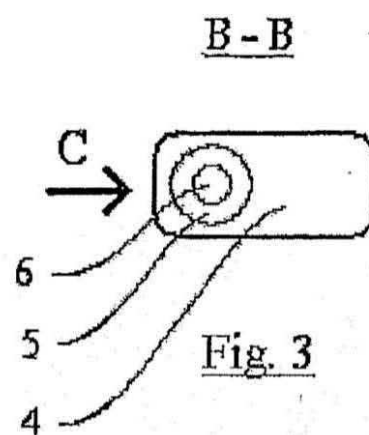
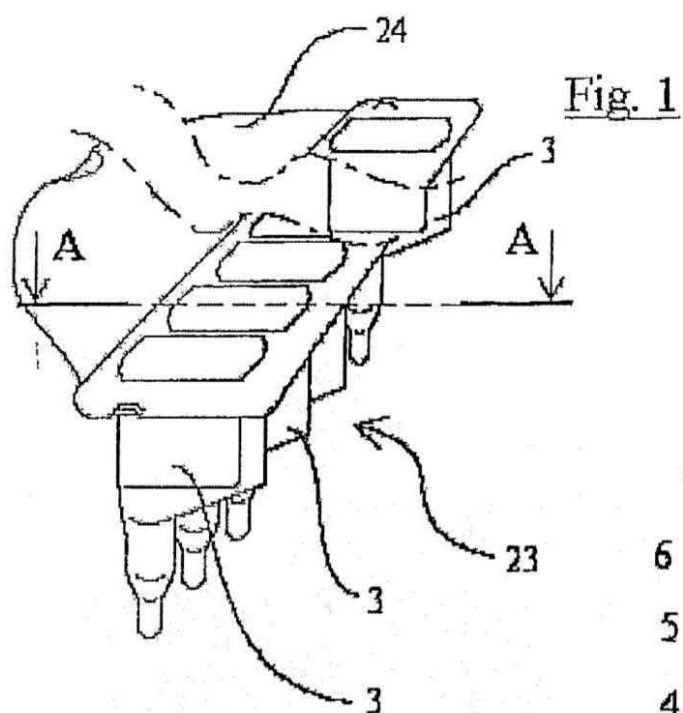
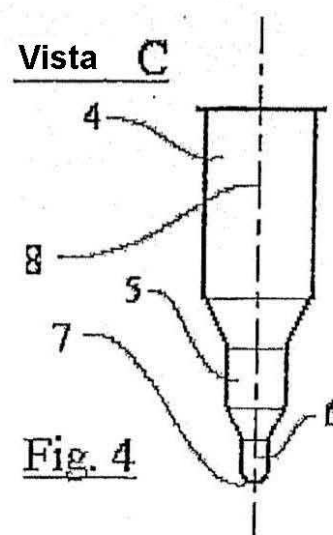


Fig. 2



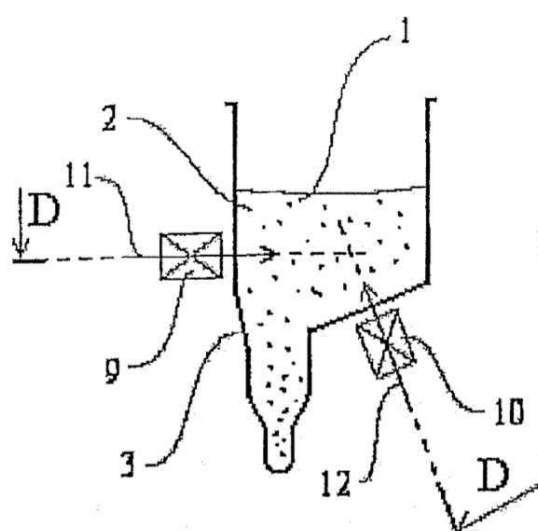


Fig. 5

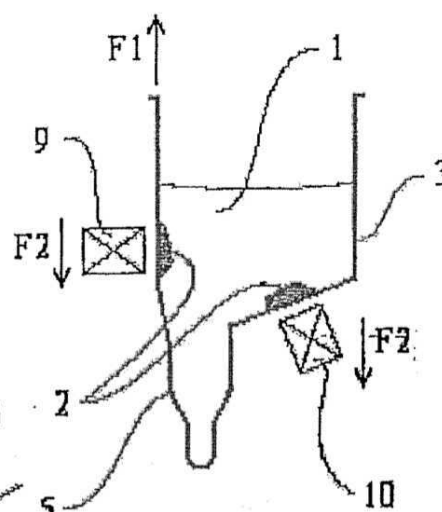


Fig. 6

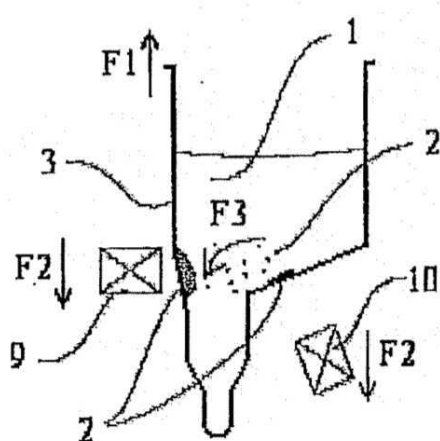


Fig. 7

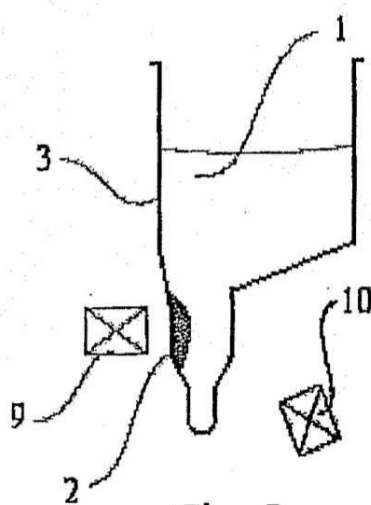
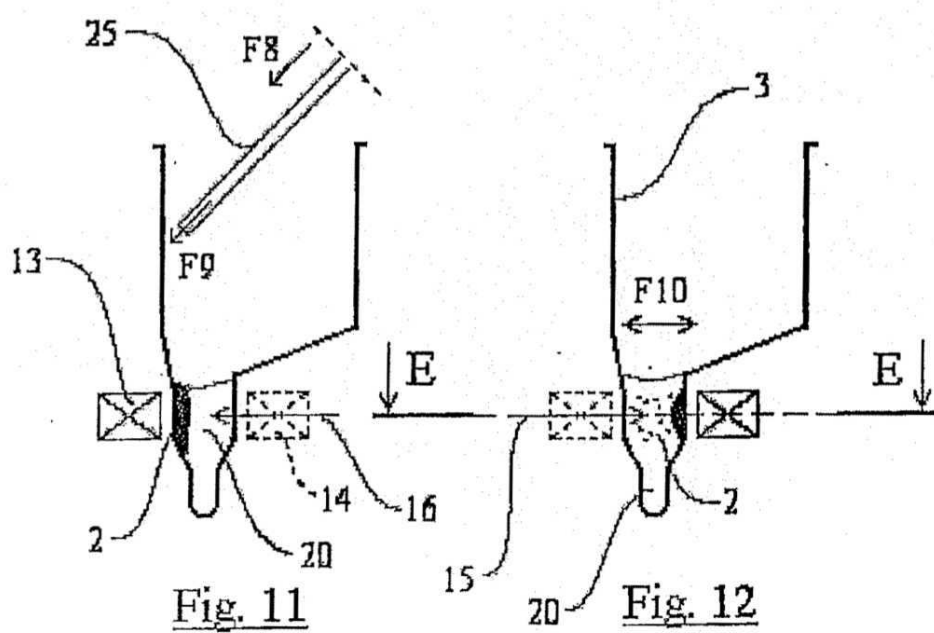
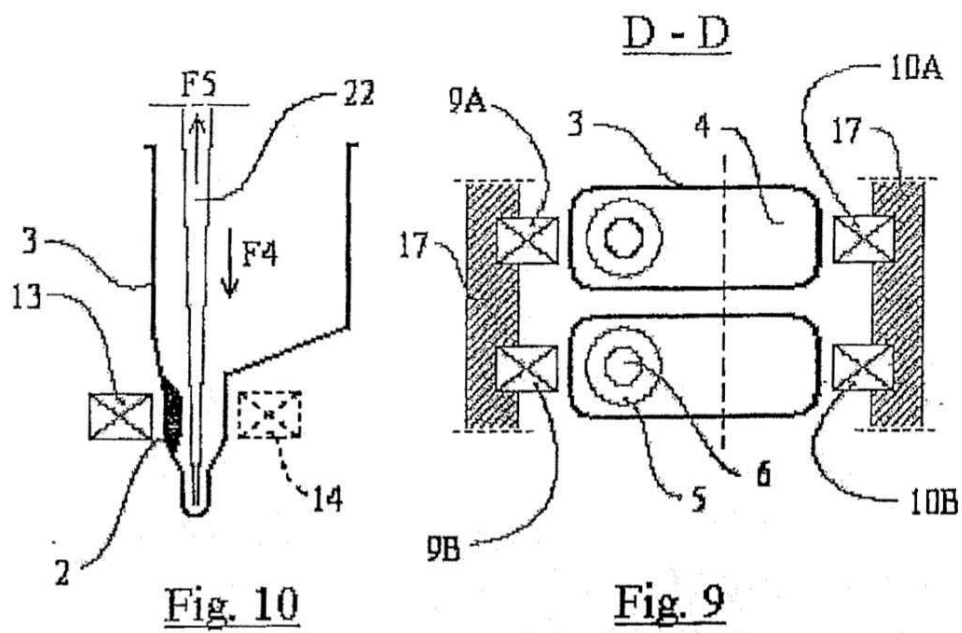
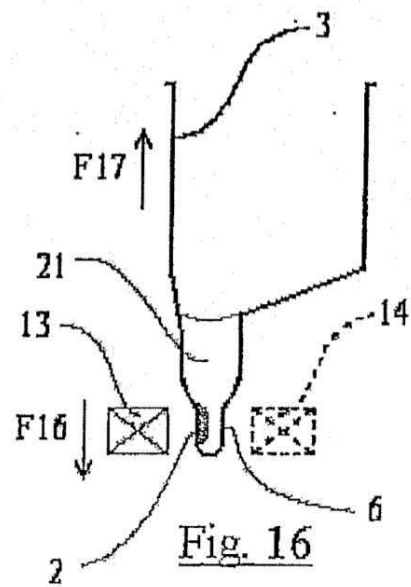
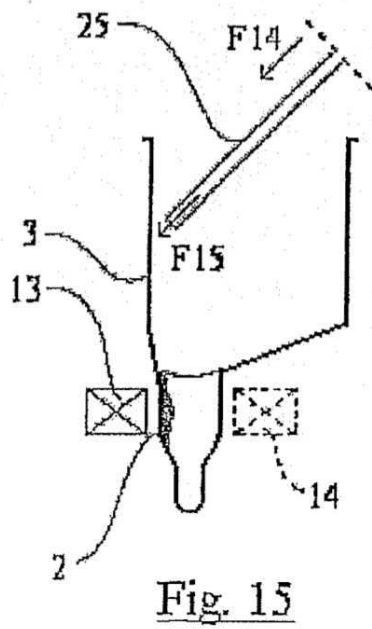
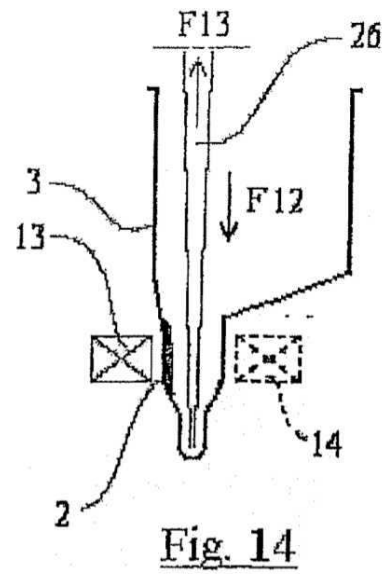
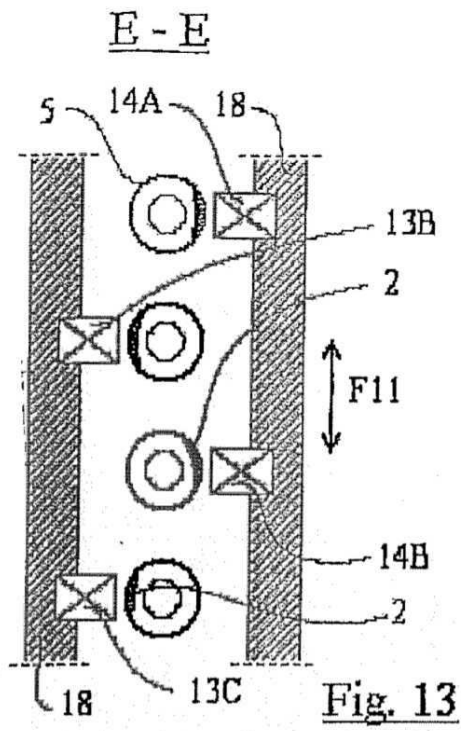


Fig. 8





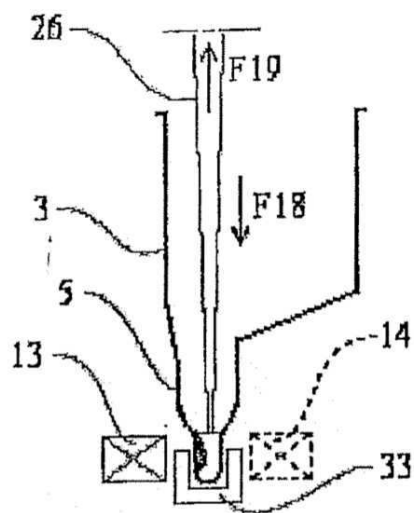


Fig. 17

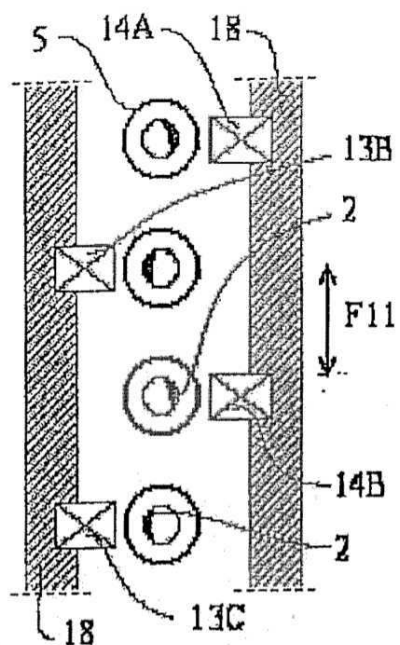


Fig. 18

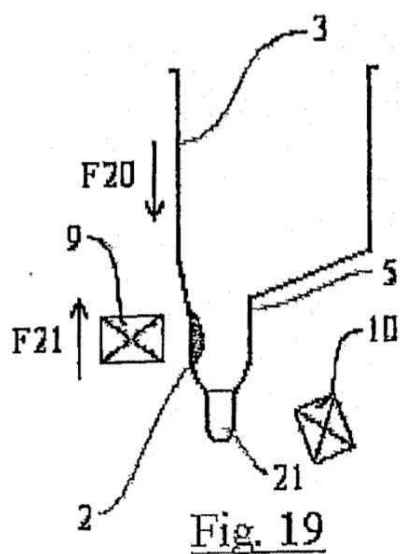


Fig. 19

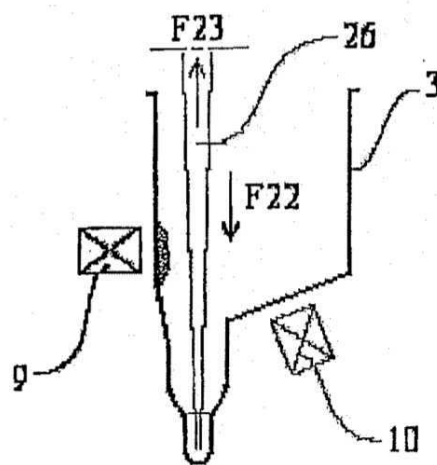


Fig. 20

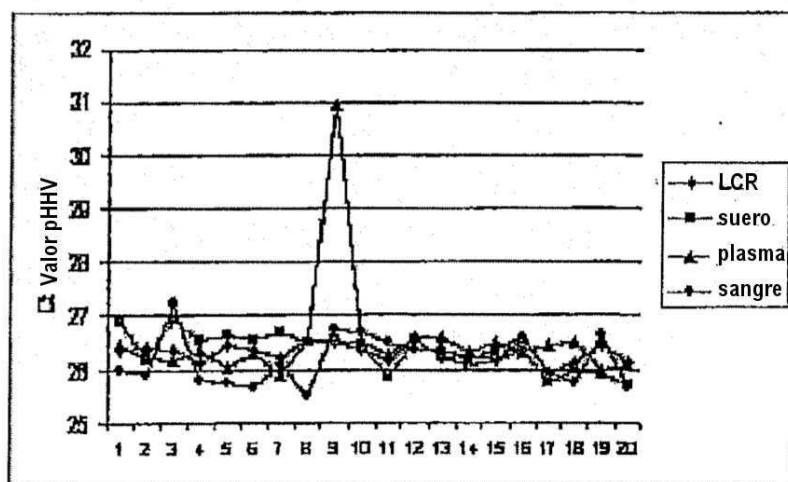
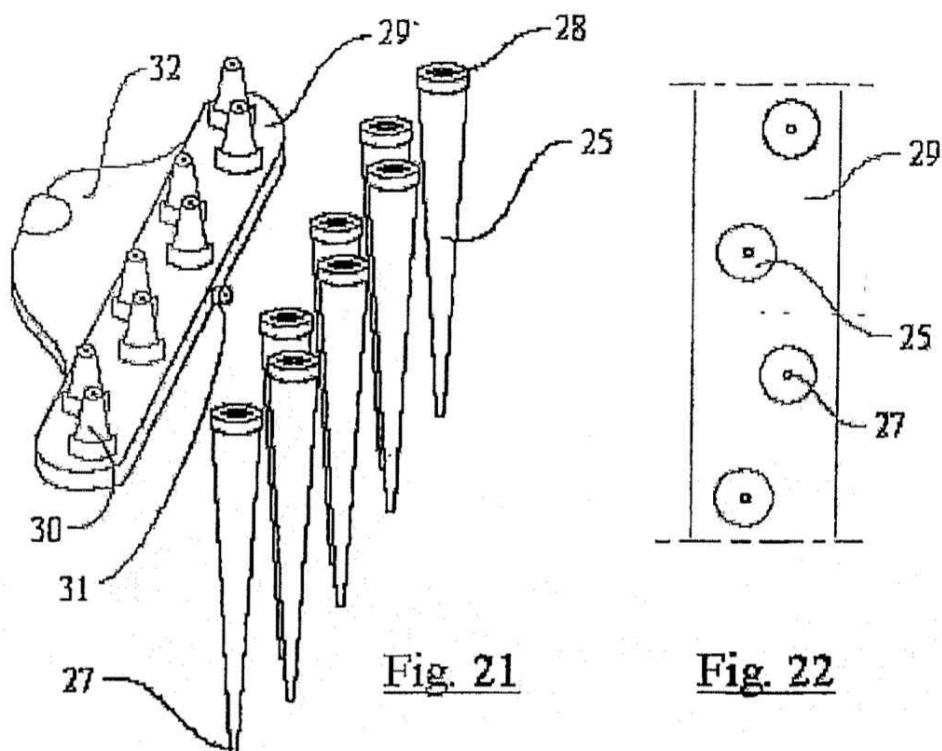


Fig. 23