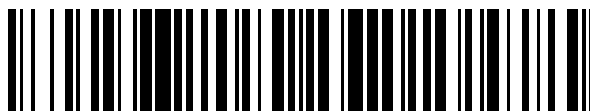


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 547 429**

51 Int. Cl.:

**C12M 1/12** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2010** **E 10795419 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2015** **EP 2635669**

54 Título: **Dispositivo y procedimiento para aislar y cultivar células vivas en filtro o extraer su material genético**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.10.2015**

73 Titular/es:

**SCREENCELL (100.0%)**  
**12, Rue Jean Antoine de Baif Biopark**  
**75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**CAYRE, YVON;**  
**BENALI-FURET, NAOUAL LINDA;**  
**AUCANT, CÉCILE y**  
**WECHSEL, JANINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 547 429 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 procedimiento para aislar y cultivar células vivas en filtro o extraer su material genético

5 La presente invención concierne a un dispositivo y a un procedimiento para aislar y/o cultivar en un filtro células vivas o fijadas a fin de proceder a cualesquiera análisis celulares (citología, inmunocitoquímica, ensayos FISH, etc ...) o extraer material genético eventualmente amplificado de células vivas o fijadas aisladas en un filtro. Ésta se aplica, en particular, a aislar y/o cultivar células particulares presentes en un líquido, especialmente la sangre, o a extraer el material genético de estas células particulares.

Ciertas células particulares de la sangre, por ejemplo las células tumorales o los trofoblastos, están en muy baja proporción y deben ser descontadas previamente a análisis citológicos.

10 Se conoce aplicar un tampón de fijación a base de formaldehído a una muestra sanguínea para fijar las células buscadas, y después hacer pasar el líquido resultante por un filtro poroso. Este filtro es utilizado a continuación para examinar en laboratorio al microscopio las células de éste buscadas. Sin embargo, este procedimiento no permite la obtención de células vivas.

15 Ahora bien, el inventor ha determinado que la obtención de células vivas permitiría constatar la identificación de marcadores específicos y aplicar en buenas condiciones técnicas de biología molecular, de citogenética y de " FISH " (acrónimo de " Fluorescence in Situ Hybridization ", hibridación fluorescente in situ) para el diagnóstico de anomalías genéticas en células tumorales o trofoblásticas.

20 Por los documentos US 5 976 824, FR 2 127 835 y US 2007/105156, se conocen dispositivos y métodos para recoger una muestra de células a partir de una muestra líquida, empleando una aguja adaptada para perforar un tapón de tubo de vacío. Sin embargo, estos dispositivos y métodos presentan riesgos de un pinchazo accidental con la aguja. Además, estos no permiten ni una colocación fácil del tubo de vacío, ni su mantenimiento de manera rígida para evitar su retirada o su desplazamiento que permitiría al aire entrar en el tubo de vacío pasando en el lado de la aguja por el tapón del tubo de vacío.

25 El documento FR2926091 describe un dispositivo para aislar células fijadas o vivas en un filtro o extraer el material genético de célula. Éste comprende un compartimiento que presenta un volumen interior para recibir un líquido que comprende las células, una abertura inferior y una entrada de aire, un pistón móvil en el interior del compartimiento y un filtro solidario de la abertura del compartimiento para retener las células durante el paso del líquido a través del filtro.

Este dispositivo no presenta ni aguja ni medio de aspiración.

30 La presente invención pretende remediar estos inconvenientes y responder a esta necesidad permitiendo recoger, en condiciones compatibles con exámenes de laboratorio de rutina, células vivas que puedan ser cultivadas subsiguientemente en medios adaptados en presencia de factores de crecimiento adecuados.

35 La presente invención concierne también a la extracción del material genético eventualmente amplificado de células aisladas en filtro y la detección de mutaciones y de los niveles de la expresión de genes de sensibilidad y de resistencia a las terapias dirigidas o de anomalías genéticas.

Ésta se aplica, en particular, a recoger y eventualmente amplificar de modo uniforme el ADN o el ARN de células particulares presentes en un líquido, especialmente la sangre.

40 Se conoce, por ejemplo por el documento PCT/FR 2006/000562, aplicar un tampón de fijación a base de formaldehído a una muestra sanguínea para fijar las células buscadas, y después hacer pasar el líquido resultante por un filtro poroso. Este filtro es analizado después en laboratorio para buscar al microscopio las células de éste. A continuación, se las puede extraer del filtro para análisis, por ejemplo un análisis genético

45 Sin embargo, este procedimiento no puede ser objeto de una reproducción a gran escala y a un coste razonable, debido al tiempo, a los materiales y a la precisión de trabajo que el mismo implica. Ahora bien, esta reproducción a gran escala y menor coste permitiría la conducción de análisis de biología molecular a la vez en células tumorales y en células trofoblásticas. Además, la fijación de las células por el formaldehído no permite obtener material genético de buena calidad: el ADN resulta en parte degradado y forma puentes con proteínas ambientes y la extracción de ARN está prácticamente excluida.

50 La presente invención pretende también poner remedio a estos inconvenientes y responder a esta necesidad permitiendo recoger en buen estado en condiciones compatibles con exámenes de laboratorio de rutina, una gran proporción de material celular, en particular ARN y ADN, de las células consideradas,. Hay que observar también que la presente invención permite el aislamiento de células fijadas con la ayuda de un fijador que contenga o no formaldehído.

A tal efecto, de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención está destinada a un dispositivo para aislar en un filtro células fijadas, caracterizado por que comprende:

- un compartimiento que presenta un volumen interior para recibir un líquido que comprende las citadas células, una abertura inferior y una entrada de aire,
  - 5 - un medio móvil con respecto al compartimiento, comprendiendo este medio móvil brazos,
  - un filtro solidario, al menos temporalmente, de la citada abertura del compartimiento, adaptado para retener células durante el paso del líquido a través del filtro,
  - una aguja al menos temporalmente solidaria de la citada abertura del compartimiento, de manera estanca, encontrándose el filtro entre la aguja y el volumen interior del compartimiento, estando la citada aguja adaptada para perforar un tapón de tubo de vacío que presenta una depresión con respecto a la presión ambiente para aspirar el líquido a través del citado filtro y
  - 10 - un medio de unión entre el compartimiento y un cilindro de protección que rodea a la aguja y destinado a rodear, al menos parcialmente, el tubo de vacío durante la aspiración del líquido a través del filtro,
- en el cual el medio móvil y el compartimiento están configurados para ser puestos en movimiento relativo para aplicar una fuerza sobre el filtro y liberar el filtro después de la aspiración del líquido a través del filtro, y en el cual las patas del medio móvil están configuradas para, cuando el dedo de un operario ponga en movimiento relativo el medio móvil y el compartimiento, ejercer una presión sobre un soporte del filtro y liberar el soporte de filtro de la abertura del compartimiento.

Este dispositivo permite así el aislamiento y la recuperación en filtro de las células vivas de interés fijadas, o vivas, en condiciones perfectamente compatibles con su puesta en cultivo para continuar exámenes de caracterización citológica, y de citogenética, para cualquier otro examen celular o para extraer su material genético.

Esta recuperación es efectuada directamente en filtro y prácticamente sin pérdida de células buscadas. Se recogen, así, a menor coste, una gran proporción de la células consideradas, en buen estado, en condiciones compatibles con un cultivo de rutina en laboratorio. Las células aisladas pueden ser utilizadas antes o después del cultivo, para los exámenes de biología celular o molecular.

El dispositivo objeto de la presente invención permite también recoger de manera rápida y eficaz material celular de células particulares, por ejemplo, después de la realización:

- de una etapa de filtración en el transcurso de la cual el principal del líquido y de las otras citadas células pasa a través de un filtro cuyos microporos tengan un diámetro intermedio entre el de las células particulares y el de otras células,
- 30 - de una etapa de lisis seguida o no de amplificación del ADN y/o del ARN en el citado compartimiento y
- de una etapa de recuperación en el filtro del material genético de las células que hayan sido sometidas a lisis.

El dispositivo objeto de la presente invención presenta numerosas ventajas:

- 1/ la filtración puede ser efectuada sobre un soporte o sosteniendo el dispositivo con la mano, lo que representa una ganancia de tiempo y una economía de material importantes (se evitan, especialmente, una bomba de vacío y una carcasa de adaptación),
- 2/ la filtración puede ser efectuada en el interior de una campana estéril,
- 3/ la filtración puede ser efectuada con el dispositivo en posición oblicua, incluso prácticamente horizontal,
- 40 4/ las condiciones están perfectamente estandarizadas, siendo producido el tubo de extracción de modo estandarizado con una capacidad de vacío predefinida,
- 5/ las condiciones de utilización presentan condiciones de seguridad elevadas, pudiendo ser realizada la operación completamente en el interior de una campana estéril; además, el tubo de vacío, una vez lleno, puede ser eliminado como un tubo habitual de extracción sanguínea, no estando la sangre recuperada en contacto con el operario.

El dispositivo objeto de la presente invención, tal como se expuso de modo sucinto anteriormente, comprende un medio de unión entre el compartimiento y un cilindro de protección que rodea a la aguja y destinado a rodear, al menos parcialmente, al tubo de vacío durante la aspiración del líquido a través del filtro.

Gracias a estas disposiciones, el usuario queda protegido contra un pinchazo accidental con la aguja. Además, la colocación del tubo de vacío resulta facilitada por el guiado ofrecido por el cilindro de protección. La posición del tubo de vacío en el transcurso de la aspiración es también mantenida más rígidamente, lo que evita su retirada o un

desplazamiento que permitiría entrar el aire en el tubo de vacío pasando en el lado de la aguja por el tapón del tubo de vacío. El riesgo de contaminación de la muestra por el usuario resulta minimizado porque el usuario no puede tocar la aguja por descuido.

5 De acuerdo con características particulares, el dispositivo objeto de la presente invención, tal como se expuso de modo sucinto anteriormente, comprende, al menos provisionalmente, el citado cilindro de protección.

Se asegura, así, la protección de la aguja, de la muestra y del usuario.

De acuerdo con características particulares, el citado medio de unión es provisional y permite la retirada del cilindro de protección conjuntamente con la del tubo de vacío y de la aguja.

10 Así, la protección de la aguja y del usuario queda asegurada después de la separación del cilindro de protección del compartimiento.

De acuerdo con características particulares, el citado cilindro de protección comprende una película desmontable que obtura su abertura opuesta al medio de unión, abertura por la cual el tubo de vacío es introducido en el cilindro de protección.

15 Gracias a estas disposiciones, antes de insertar el tubo de vacío, el usuario retira la película. Esta película asegura, a la vez, una mejor protección del usuario y de la aguja y una reducción de los riesgos de contaminación de la muestra.

De acuerdo con características particulares, el dispositivo objeto de la presente invención comprende, además, un soporte de filtro desmontable de acero quirúrgico adaptado para ser solidarizado de manera temporal a la abertura inferior del compartimiento.

20 Gracias a estas disposiciones, se puede extraer el filtro con su soporte para cultivar o analizar las células recogidas en el filtro o extraer su material genético. Además, el acero no es tóxico para las células recogidas en el filtro.

De acuerdo con características particulares, el espesor del citado anillo está adaptado para permitir su paso por un escáner.

De acuerdo con características particulares, el citado anillo lleva un identificador.

25 De esta manera, se pueden asociar este identificador, y por tanto las células recogidas, a un paciente. Se evitan, así, errores.

30 Siendo el conjunto del módulo de filtración estéril y siendo preparado con arreglo a las normas habitualmente aplicadas para la biología molecular, se puede evitar cualquier contaminación o deterioro de las células vivas del filtro o del material genético. El contenido del compartimiento es mantenido en estado estéril durante las manipulaciones debajo de una campana de flujo laminar adaptada. Así, todas las etapas para aislar y cultivar las células o para extraer y analizar su material genético pueden ser efectuadas en condiciones estériles.

De acuerdo con características particulares, el dispositivo objeto de la presente invención comprende un conector desmontable fijado al compartimiento de modo estanco y desmontable y adaptado para impedir el movimiento relativo del medio móvil y del compartimiento que permite aplicar la citada fuerza y liberar el citado soporte de filtro.

35 Gracias a estas disposiciones, se garantiza el mantenimiento en posición del portafiltro. Además, el conector puede protegerle contra las salpicaduras y la contaminación.

Se retiene, así, el filtro durante la filtración y después se le libera, para su recuperación, retirando el conector y poniendo en movimiento respectivo el medio móvil y el compartimiento para aplicar la fuerza que libera el soporte de filtro.

40 De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para aislar células vivas en un filtro o extraer su material genético, caracterizado por que comprende:

- una etapa de solidarización, al menos temporal, de un filtro a una abertura inferior de un compartimiento que presenta, además, una entrada de aire,

- una etapa de inserción en el citado compartimiento de un líquido que comprende las citadas células,

45 - una etapa de solidarización, al menos temporal, de una aguja a la citada abertura del compartimiento, de manera estanca, encontrándose el filtro entre la aguja y el volumen interior del compartimiento,

- una etapa de perforación con la citada aguja de un tapón de tubo de vacío que presenta una depresión con respecto a la presión ambiente y

- una etapa de aspiración, por medio de la depresión del tubo de vacío, del líquido a través de citado filtro, reteniendo el citado filtro las citadas células, y

- 5 - una etapa de puesta en movimiento relativo de un medio móvil que presenta patas y del compartimiento para aplicar una fuerza sobre el filtro y liberar el filtro después de la aspiración del líquido a través del filtro, ejerciendo las patas del medio móvil, cuando el dedo de un operario ponga en movimiento relativo el medio móvil y el compartimiento, una presión sobre un soporte del filtro y liberando el soporte de filtro de la abertura del compartimiento.

De acuerdo con características particulares, el procedimiento objeto de la presente invención tal como se expuso de modo sucinto anteriormente, comprende, además:

- 10 - una etapa de fijación, al menos temporal, de un cilindro de protección al compartimiento, rodeando entonces el citado cilindro de protección a la aguja y
- en el transcurso de la etapa de perforación, se inserta el tubo de vacío en el cilindro de protección.

Las ventajas, objetivos y características particulares de este procedimiento que son similares a los del dispositivo objeto de la presente invención, tal como se expuso de modo sucinto anteriormente, no se citan aquí de nuevo

- 15 Otras ventajas, objetivos y características de la presente invención aparecerán en la descripción que sigue, hecha, con un fin explicativo y en modo alguno limitativo, en relación con los dibujos anejos, en los cuales:

- la figura 1 representa, esquemáticamente y en perspectiva, el ensamblaje de las piezas de un primer modo de realización del dispositivo objeto de la presente invención,

- 20 - las figuras 2A a 2D representan, esquemáticamente y en secciones axiales perpendiculares entre sí, el primer modo de realización del dispositivo antes de la utilización,

- las figuras 3A a 3O representan, esquemáticamente, en alzado o en corte, etapas de puesta en práctica del primer modo de realización del dispositivo objeto de la presente invención,

- la figura 4 representa, en forma de un organigrama lógico, etapas puestas en práctica en un primer modo de realización particular del procedimiento objeto de la presente invención,

- 25 - la figura 5 representa, esquemáticamente y en perspectiva, el ensamblaje de las piezas de un segundo modo de realización particular del dispositivo objeto de la presente invención,

- las figuras 6A a 6D representan, esquemáticamente y en secciones axiales perpendiculares entre sí, el segundo modo de realización del dispositivo antes de la utilización,

- 30 - las figuras 7A a 7L representan, esquemáticamente, en alzado o en corte, etapas de puesta en práctica del segundo modo de realización del dispositivo objeto de la presente invención,

- la figura 8 representa, en corte, un soporte de filtro integrado al segundo modo de realización del dispositivo objeto de la presente invención,

- la figura 9 representa, en forma de un organigrama lógico, etapas de puesta en práctica en un segundo modo de realización particular del procedimiento objeto de la presente invención,

- 35 - la figura 10 representa, esquemáticamente, un modo de realización particular del dispositivo, antes de la utilización,

- la figura 11 representa, esquemáticamente, el modo de realización del dispositivo ilustrado en la figura 10, después de la retirada de una película de protección y antes de la inserción de un tubo de vacío,

- la figura 12 representa, esquemáticamente, el modo de realización del dispositivo ilustrado en las figuras 10 y 11, después de la inserción del tubo de vacío,

- 40 - la figura 13 representa, esquemáticamente, el modo de realización del dispositivo ilustrado en las figuras 10 a 12, en el transcurso de la retirada del tubo de vacío y de un cilindro de protección y

- la figura 14 representa, en forma de un organigrama lógico, etapas de puesta en práctica en un modo de realización particular del procedimiento objeto de la presente invención.

- 45 En la descripción que sigue de las figuras, se considera un sistema de filtración de líquido, esencialmente de sangre, que comprende medios de retirada de un soporte de filtro. Sin embargo, la presente invención no se limita a estos modos de realización preferentes, sino que, por el contrario, se extiende a cualquier sistema que comprenda un compartimiento para recibir un líquido, un filtro montado, al menos temporalmente, en una abertura de este compartimiento y una aguja montada, al menos temporalmente, de manera estanca, en esta abertura del

compartimiento para que, durante la perforación de un tapón de tubo de vacío preacondicionado, la aguja transporte una aspiración del líquido a través del filtro y que células de interés queden retenidas en este filtro.

5 La aguja comprende una extremidad muy fina adaptada para penetrar en el tapón del tubo de vacío (véanse las figuras 3B a 3D) y una embocadura, más ancha adaptada para recibir la extremidad inferior del compartimiento o de un soporte de filtro. El tubo de vacío presenta una depresión muy importante y un volumen superior al volumen de líquido que haya que filtrar.

10 En modos de realización preferentes en los cuales la aguja es desmontable con respecto al compartimiento, una vez llenado el compartimiento con el líquido que comprende las células de interés, para recuperar las células, se encaja la embocadura de la aguja en la abertura del compartimiento y después se perfora el tapón del tubo de vacío con la extremidad fina de la aguja. Bajo el efecto de la depresión, la filtración del líquido se efectúa automáticamente, típicamente en 60 segundos.

Así, la filtración puede ser efectuada sosteniendo el dispositivo con la mano, lo que representa una ganancia de tiempo y una economía de material, importantes, especialmente porque no es necesario prever bomba de vacío ni carcasa de adaptación del compartimiento a la bomba.

15 Además, la filtración puede ser efectuada en el interior de una campana estéril, pudiendo el dispositivo estar inclinado, o prácticamente horizontal.

Se van a describir ahora modos de realización con un soporte de filtro desmontable y medios de extraerle del compartimiento sin tocarle.

20 En la figura 1, se observa un depósito, o compartimiento, 102, un conector 104, una junta 106, un filtro con su soporte 108, un medio móvil 110, una junta 112 y un tapón 114 que presenta una entrada de aire (no representada).

El compartimiento 102 es de forma general cilíndrica. Su extremidad superior puede ser obturada, de manera estanca, excepto la entrada de aire, por el tapón 114. La extremidad inferior del compartimiento 102 presenta, en su cara externa, anillos discontinuos cuyas discontinuidades guían patas del medio móvil 110, guiando los citados anillos el cuerpo del medio móvil 110.

25 Este medio móvil 110 presenta una forma general cilíndrica provista de dos patas 116 que se extienden hacia el conector 104 y que se cierran en esta dirección de manera que queden separadas, entre sí, una distancia inferior al diámetro del soporte de filtro 108. Como se verá, en lo que sigue, esta forma particular, especialmente, la de las patas 116 curvadas una hacia la otra, permite al medio móvil 110, después de la retirada del conector 104, empujar el soporte de filtro 108 a fin de liberarle, así como a su filtro, del compartimiento 102, durante el movimiento del medio móvil hacia el soporte de filtro 108.

La extremidad de las patas 116 del medio móvil 110 y la extremidad inferior del compartimiento 102 están adaptadas para penetrar en una caja o pozo, de cultivo. En cambio, el anillo discontinuo terminal del compartimiento 102 tiene un diámetro adaptado para que éste se apoye sobre el borde de la caja, o pozo, de cultivo.

35 En la abertura inferior del compartimiento 102 está colocado, de modo estanco, estéril y desmontable, un conector o adaptador 104 que cierra la pared exterior del compartimiento 102 y presenta una abertura inferior afilada de diámetro más pequeño que el del compartimiento 102.

Esta abertura inferior afilada del conector, o adaptador 104 presenta una longitud suficiente para permitir el encajamiento mecánico estanco de la embocadura de una aguja (véanse las figuras 3B a 3D).

40 El conector 104 presenta, de manera coordinada con la forma de la extremidad inferior del compartimiento 102, que tiene tetones laterales 118, medios de bloqueo por rotación, para enganchar los citados tetones, de manera en sí conocida. El conector 104 garantiza, así, el mantenimiento en posición del portafiltro durante las etapas de filtración. Además, el conector 104 protege el filtro contra las salpicaduras y la contaminación.

45 La extremidad inferior del compartimiento 102 presenta una abertura que, después del montaje, desemboca sobre el filtro llevado por el soporte de filtro 108, a su vez retenido en posición, por una parte, por la extremidad inferior del compartimiento 102 y, por otra, por el conector 104.

En el primer modo de realización, el soporte de filtro 108 toma la forma de una arandela de forma anular. El filtro está microperforado y soldado debajo del soporte de filtro 108 y después es insertado con el mismo en la extremidad inferior del compartimiento 102.

50 Preferentemente, el soporte de filtro 108 desmontable es anular y de acero quirúrgico. El acero, en efecto, no es tóxico para las células recogidas en el filtro. Además, un soporte de filtro de acero quirúrgico es más fácil de retirar que si éste es de material plástico y más rígido. Preferentemente, el espesor del citado anillo está adaptado para permitir su paso por un escáner. Preferentemente, este anillo lleva un identificador. Se pueden así asociar este identificador, y por tanto las células recogidas, a un paciente. Se evitan, así, errores.

En variante, el soporte de filtro 108 es de PVC y tiene un espesor inferior o igual a 0,4 mm, y preferentemente, inferior a 0,3 mm. Su diámetro exterior es, por ejemplo, de 12,6 mm. El diámetro del filtro llevado por el soporte de filtro 108 es, por ejemplo, de 5,9 mm.

5 El compartimiento 102, el conector 104 y el medio móvil 110 están realizados, por ejemplo, de polipropileno. Las juntas 106 y 112 son, por ejemplo, de silicona.

Las figuras 2A y 2C son secciones axiales perpendiculares entre sí, del primer modo de realización del dispositivo objeto de la presente invención, una vez ensambladas las piezas ilustradas en la figura 1. Las figuras 2B y 2D son respectivamente vistas de detalle agrandadas de partes de las figuras 2A y 2C. En las figuras 2A a 2D se encuentran los elementos descritos en relación con la figura 1.

10 La figura 3A representa el dispositivo en alzado, en su configuración de almacenamiento. La figura 3B representa el conector 104 durante su inserción en la embocadura 181 de una aguja 180 que presenta otra extremidad 182 muy fina y biselada para facilitar la perforación de un tapón de tubo de vacío. Preferentemente, la embocadura 181 de la aguja 180 está constituida de material plástico. La extremidad 182 de la aguja 180 es metálica. La colocación de la aguja 180 sobre el conector 104 puede ser hecha antes o después de la introducción de líquido (no representado),  
15 por ejemplo sangre, en el compartimiento 102, a través de su abertura superior.

La figura 3C ilustra el inicio de la perforación del tapón 186 del tubo de vacío 185, una vez solidarizada manera estanca la aguja 180 al conector 104.

20 La figura 3D ilustra la perforación completa del tapón 186 por la aguja 180, poniendo en comunicación, a través del filtro 108, el interior del tubo de vacío 185, en depresión, y el volumen del compartimiento 102 que contiene el líquido que comprende las células de interés. El volumen interior del tubo de vacío 185 es superior al volumen del líquido que haya que filtrar.

25 Durante la aspiración, ciertas células particulares del líquido presente en el compartimiento 102, de mayor diámetro, quedan retenidas por el filtro 108, mientras que el principal del líquido, del contenido y, en su caso, de la pared de las células que hayan sido sometidas a lisis y las células de dimensiones más pequeñas que las células que haya que recoger son aspiradas hacia el interior del tubo de vacío 185, a través del filtro 108.

Después, como ilustran las figuras 3E y 3F, se retira el conector 104 después de una rotación que le libera de los tetones 118. Después, como ilustran las figuras 3G y 3H, se inserta la extremidad del compartimiento 102 en una caja, o un pozo, de cultivo 130.

30 Como se expuso anteriormente y como ilustra la figura 3I, la extremidad aproximada de las patas 116 del medio móvil 110 y la extremidad inferior del compartimiento 102 están adaptadas para penetrar en una caja o un pozo, de cultivo. En cambio, el anillo discontinuo terminal del compartimiento 102 tiene un diámetro adaptado para que éste se apoye sobre el borde de la caja, o pozo, de cultivo 130.

De modo más preciso, como ilustran las figuras 3J y 3K, el medio móvil 110, en esta posición, puede moverse paralelamente al eje del compartimiento 102.

35 Como ilustran las figuras 3N y 3M, durante este movimiento, las patas 116 del medio móvil puesto en movimiento por los dedos de un operario ejercen una fuerza vertical, de arriba abajo, sobre el soporte de filtro 108 y le libera de la extremidad inferior del compartimiento 102. El filtro y su soporte 108 caen entonces en el interior de la caja, o pozo, de cultivo 130.

40 Finalmente, como ilustra la figura 3O, se retira el compartimiento 102 y el medio móvil 110 de la caja, o pozo, de cultivo 130.

La figura 4 recapitula las etapas así puestas en práctica.

45 En el transcurso de una etapa 202, se ensamblan las piezas del dispositivo. En el transcurso de una etapa 203, se retira el tapón 114. En el transcurso de una etapa 204, se inserta el conector 104 en la embocadura 181 de la aguja 180. En el transcurso de una etapa 205, se introduce un líquido, por ejemplo, sangre, que contiene células que haya que aislar y eventualmente que cultivar, por la extremidad superior del compartimiento 102.

En el transcurso de una etapa 206, se aplica la extremidad puntiaguda 182 de la aguja 180 aproximadamente en el centro del tapón 186 y se aplica, sobre el compartimiento 102, una presión para hacer penetrar la aguja en el tapón 186 hasta que la extremidad de la aguja llegue al volumen interior, en depresión, o al vacío, del tubo de vacío 185.

50 En el transcurso de una etapa 210, se efectúa una filtración, por aspiración hacia el interior del tubo de vacío 185, de las células de dimensiones más pequeñas que las células de interés, las eventuales células que hayan sido sometidas a lisis, y el principal del líquido presente en el compartimiento 102, quedando retenidas las células de interés en el filtro 108.

- En el transcurso de una etapa 212, se retira el tubo de vacío 185 y la aguja 180. En el transcurso de una etapa 214, se retira el conector 104. En el transcurso de una etapa 216, se inserta la extremidad del compartimiento 102 en una caja, o un pozo, de cultivo.
- 5 En el transcurso de una etapa 218, se ponen en movimiento respectivo el medio móvil y el compartimiento para ejercer una fuerza sobre el soporte de filtro 108 y liberarle a fin de que éste caiga, con su filtro, en el interior de la caja, o pozo, de cultivo 130. En el transcurso de una etapa 220, se retira el compartimiento 102 y el medio móvil 110 de la caja, o pozo, de cultivo 130.
- 10 En el transcurso de una etapa 222, se realiza el cultivo, de manera conocida, en el pozo de cultivo 130. Se observa que la presencia del soporte 108 alrededor de la cara superior del filtro, cara que lleva las células aisladas en el filtro, permite evitar que las células abandonen el filtro.
- Durante la etapa 222 de puesta en cultivo de las células vivas de interés del filtro, el filtro es por ejemplo recubierto de una capa delgada de Matrigel (o puesto en contacto con una capa de Matrigel, marca registrada, previamente puesta en el fondo del pozo de placa y/o del frasco de cultivo y sobre la cual éste reposa) que contenga factores adaptados para el crecimiento de las células de interés.
- 15 Cuando se deseen observar las células, o su material genético, en el transcurso de una etapa 224, se agarra el soporte de filtro 108, cuyo agarre con una pinza está facilitado por la presencia de agujeros cilíndricos laterales, o muescas, en la cara superior del soporte de filtro 108.
- 20 Después, puede colocarse el soporte de filtro 108 sobre una lámina de vidrio y aplicarse, sobre el filtro, una lámina de vidrio en forma de disco de material adaptado a la superficie superior libre del filtro. El análisis de las células o la extracción de su material genético es efectuado de manera en sí conocida.
- En la figura 5, se observa un depósito, o compartimiento 302, un conector 304, una junta 306, un soporte de filtro 308, un medio móvil 310, una junta 312, y un tapón 314.
- 25 El compartimiento 302 es de forma general cilíndrica. Su extremidad superior puede ser obturada, de manera estanca, con excepción de una entrada de aire (no representada), por el tapón 314. La extremidad inferior del compartimiento 302 presenta, sobre su cara externa, un cilindro 350 separado del cuerpo del compartimiento 302, excepto por uniones mecánicas en forma de nervios laterales 352. Este cilindro 350 tiene un diámetro exterior que corresponde al diámetro interior del cuerpo del medio móvil 310, a fin de guiarle en desplazamiento. El cilindro 350 está provisto de orificios 354 adaptados para dejar penetrar y deslizar longitudinalmente las patas 316 del medio móvil 310.
- 30 El medio móvil 310 presenta una forma general cilíndrica provista de sus patas 316 que se extienden hacia el conector 304 y se cierran en esta dirección de manera que queden separadas, entre sí, una distancia inferior al diámetro del soporte de filtro 308. Como se verá, en lo que sigue, esta forma particular, especialmente la de las patas 316 curvadas una hacia la otra, permite al medio móvil 310, después de la retirada del conector 304, empujar el soporte de filtro 308 a fin de liberarle del compartimiento 302, durante el movimiento del medio móvil hacia el soporte de filtro 308.
- 35 El conector 304 presenta, de manera coordinada con la forma de la extremidad inferior del compartimiento 302, que tiene tetones laterales 318, medios de bloqueo por rotación, para enganchar los citados tetones, de manera en sí conocida. El conector 304 garantiza así el mantenimiento en posición del portafiltro durante las etapas de filtración. Además, el conector 304 protege el filtro contra las salpicaduras y la contaminación.
- 40 La extremidad inferior del compartimiento 302 presenta una abertura que, después del montaje, desemboca en el filtro llevado por el soporte de filtro 308, a su vez retenido en posición, por una parte, por la extremidad inferior del compartimiento 302 y, por otra, por el conector 304.
- Como ilustra la figura 8, el soporte de filtro 308, toma, en el segundo modo de realización, una forma coordinada con la de un tubo Eppendorf.
- 45 En particular:
- el soporte 308 presenta, en su parte superior interior, la forma de la parte superior interior del tubo Eppendorf, lo que permite cerrar la abertura superior de citado soporte con un tapón de tubo Eppendorf y
  - el soporte 308 presenta, en su parte superior exterior la forma que simula la parte superior interior de un tubo Eppendorf lo que permite al soporte de filtro 308 insertarse en la parte alta de un tubo Eppendorf.
- 50 Además, el soporte de filtro 308 presenta una función columna para permitir la lisis de las células retenidas sobre filtro y la transferencia por centrifugación de las células que hayan sido sometidas a lisis y del material genético del soporte de filtro, hacia el tubo Eppendorf.



El soporte de filtro 308 es preferentemente, de policarbonato. El compartimiento 302, el conector 304 y el medio móvil 310 son realizados, por ejemplo, de polipropileno. Las juntas 306 y 312 son, por ejemplo, de silicona.

5 Las figuras 6A y 6C son secciones axiales, perpendiculares entre sí, del segundo modo de realización del dispositivo objeto de la presente invención, una vez ensambladas las piezas ilustradas en la figura 5. Las figuras 6B y 6D son respectivamente vistas de detalle agrandadas de partes de las figuras 6A y 6C. En las figuras 6A a 6D, se encuentran los elementos descritos en relación con la figura 5.

La figura 7A representa el dispositivo en alzado, en su configuración de almacenamiento. Las figuras 7B a 7D son idénticas a la figuras 3B a 3D, con excepción del conector que está indicado por la referencia 304.

10 Como ilustran las figuras 7E y 7F, se retira el conector 304 después de una rotación que le libera de los tetones 318. Después, como ilustra las figuras 7G, 7H y 7I, se inserta la extremidad del compartimiento 302 en un soporte de tubo Eppendorf 328 provisto de un tubo de Eppendorf 330.

15 Como ilustran las figuras 7J y 7K, el medio móvil 310 es puesto después en movimiento hacia abajo paralelamente al eje del compartimiento 302. Durante este movimiento, las patas 316 del medio móvil 310 puesto en movimiento por los dedos de un operario, ejercen una fuerza vertical, de arriba abajo, sobre el soporte de filtro 308 y le libera de la extremidad inferior del compartimiento 302. El soporte de filtro 308 se hunde entonces en el tubo de Eppendorf 330.

Finalmente, como ilustra la figura 7L, se retira el compartimiento 302 y el medio móvil 310.

La figura 9 recapitula las etapas así puestas en práctica.

20 En el transcurso de una etapa 402, se ensamblan las piezas del dispositivo. En el transcurso de una etapa 403, se retira el tapón 314. En el transcurso de la etapa 404, se inserta el conector 304 en la embocadura 181 de la aguja 180. En el transcurso de una etapa 405, se introduce un líquido, por ejemplo, sangre, que contenga células que haya que filtrar y eventualmente cultivar, por la extremidad superior del compartimiento 302.

25 En el transcurso de una etapa 406, se aplica la extremidad puntiaguda 182 de la aguja 180 aproximadamente en el centro del tapón 186 y se aplica, sobre el compartimiento 302, una presión para hacer penetrar la aguja en el tapón 186 hasta que la extremidad de la aguja llegue al volumen interior, en depresión, o al vacío, del tubo de vacío 185.

En el transcurso de una etapa 410, se efectúa una filtración, por aspiración hacia el interior del tubo de vacío 185, de las células más pequeñas que las células de interés y las eventuales células que hayan sido sometidas a lisis y el principal de líquido presente en el compartimiento 302.

30 En el transcurso de una etapa 412, se retira el tubo de vacío 185 y la aguja 180. En el transcurso de una etapa 414, se retira el conector 304. En el transcurso de una etapa 416, se inserta la extremidad del compartimiento 302 en un soporte de tubo de Eppendorf.

35 En el transcurso de una etapa 418, se ponen en movimiento respectivo el medio móvil y el compartimiento para ejercer una fuerza sobre el soporte de filtro y liberarle a fin de que éste se hunda en el tubo Eppendorf. Finalmente, en el transcurso de una etapa 420, se retira el compartimiento 302 y el medio móvil 310 y se cierra el tapón del tubo Eppendorf.

El empleo del tubo Eppendorf es realizado después de manera en sí conocida, por ejemplo con etapas de lisis, de centrifugación y de recuperación del material genético con o sin preamplificación del genoma global.

40 En el transcurso de etapas 422 y 424, se efectúa un análisis del material genético, especialmente el ADN o el ARN de las células buscadas, recogido en el fondo de un tubo Eppendorf después de centrifugación. El ADN amplificado es utilizado como matriz para detectar las mutaciones de sensibilidad o de resistencia a las terapias dirigidas. Además, o alternativamente, el ADNc (en inglés « cDNA », significando « c » « complementario ») que proviene del ARN por conversión por RT y amplificado, es utilizado como matriz para detectar el nivel de expresión de genes de sensibilidad o de resistencia a las terapias dirigidas. Este material genético, cuando es obtenido de trofoblastos filtrados a partir de la sangre de mujeres embarazadas, puede ser utilizado para permitir la identificación de eventuales anomalías genéticas.

45 Un volumen definido del material genético amplificado, especialmente el ADN, se extrae para detectar las mutaciones de sensibilidad o de resistencia a las terapias dirigidas con la ayuda de pares de iniciadores (en inglés « primers ») sentido y antisentido y de pares de sondas y en el transcurso de una PCR (acrónimo de « polymerase chain reaction ») cuantitativa y en tiempo real.

50 El principio de la búsqueda de mutaciones de sensibilidad o de resistencia a las terapias dirigidas puesto en práctica en el modo de realización representado es el siguiente. La discriminación alélica o « SNP genotyping assay » (siendo SNP el acrónimo de « single nucleotide polymorphism » de polimorfismo nucleotido simple) permite informar sobre la presencia o la ausencia de una mutación puntual a nivel de un gen. La primera etapa, 422, de una

- discriminación alélica es una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real realizada con dos iniciadores para amplificar la secuencia de interés y dos sondas, por ejemplo de tipo TqMan (marca registrada). Una de las sondas reconoce la secuencia mutada y la otra reconoce la secuencia normal. Las dos sondas están asociadas a fluorocromos diferentes, por ejemplo « VIC » para la sonda que se hibrida en la secuencia normal y « FAM » para la sonda que se hibrida en la secuencia mutada. La segunda etapa 424, recurre a un programa de discriminación alélica que mide la fluorescencia inicial y la fluorescencia final emitida por los fluorocromos FAM o/y VIC. Este programa permite hacer la distinción entre las diferentes secuencias presentes en cada muestra:
- un aumento de la fluorescencia únicamente en VIC indica un perfil homocigoto para la secuencia normal,
  - un aumento de la fluorescencia únicamente en FAM indica un perfil homocigoto para la secuencia mutada,
  - un aumento de la fluorescencia a la vez en VIC y en FAM indica un perfil heterocigoto.
- Las sondas se acoplan entre los dos iniciadores y revelan la presencia o la ausencia de una mutación debido a su color de fluorescencia asociado.
- En otros modos de realización, se extrae un volumen definido del material genético especialmente el ARN, convertido en ADNc por RT (acrónimo de « reverse transcripción ») y amplificado, para detectar el nivel de expresión de gen de sensibilidad o de resistencia a las terapias dirigidas con la ayuda de pares de iniciadores sentido y antisentido y de una sonda y en el transcurso de una PCR (acrónimo de « polymerase chain reaction ») cuantitativa y en tiempo real, por ejemplo con 50 ciclos.
- En cada uno de los modos de realización descritos anteriormente el filtro está realizado, preferentemente, de policarbonato con un tratamiento de superficie hidrófilo. La utilización de tal filtro mejora la tasa de retención de las células particulares y reduce la adherencia de las otras células o de su contenido, cuando éstas hayan sido específicamente sometidas a lisis.
- El filtro presenta, preferentemente, un diámetro de poros centrado en un valor inferior, por ejemplo en 1  $\mu\text{m}$ , al valor correspondiente puesto en práctica para las mismas células fijadas, es decir hechas rígidas.
- Por ejemplo, si, para las células fijadas, el diámetro de los poros hubiera estado centrado en 7,5  $\mu\text{m}$ , éste es aquí centrado en un valor inferior, por ejemplo 6,5  $\mu\text{m}$ . Debido a la dispersión de los diámetros, prácticamente ningún poro tiene entonces un diámetro superior a 7  $\mu\text{m}$ .
- Para una aplicación de la invención a células sanguíneas, el filtro presenta poros cuya densidad es entre 50.000 poros/cm<sup>2</sup> y 200.000 poros/cm<sup>2</sup> y preferentemente de aproximadamente 100.000 poros/cm<sup>2</sup>.
- Gracias a la utilización de un filtro de policarbonato, la depresión necesaria es mucho más limitada que en los sistemas de la técnica anterior, hasta ser cuatro veces menor, lo que evita deteriorar las células que se pretenden recoger en el filtro.
- En variantes, el soporte 108 o 308 de filtro está mecánicamente unido al medio móvil hasta la aplicación, por movimiento del compartimiento hacia el pozo de cultivo o el tubo de Eppendorf, de la fuerza que libera el soporte de filtro del medio móvil. La inversión de las funciones de la extremidad inferior del compartimiento 102 o 302 y del medio móvil 110 o 310 para que sea este último el que sostenga el soporte de filtro en o delante de una lámina de vidrio, un pozo de cultivo o un tubo Eppendorf y el primero el que le libere durante un apoyo sobre la extremidad superior del compartimiento es una adaptación fácil, al alcance del especialista en la materia, a partir de la descripción de los modos de realización dados anteriormente.
- Las figuras 10 a 14 conciernen a modos de realización particulares del dispositivo y del procedimiento objetos de la presente que ponen en práctica un cilindro de protección y de guiado del tubo de vacío.
- Aunque estos modos de realización particulares completan uno u otro de los modos de realización descritos anteriormente, se ha elegido, para realizar las figuras 10 a 14, adaptarles al modo de realización ilustrado en las figuras 1 a 4.
- En las figuras 10 a 13, se observa el compartimiento 102, el medio móvil 110 y un cilindro de protección 502 unido al compartimiento 102 por un medio de unión en dos partes, 504 y 520.
- El cilindro de protección 502 comprende la parte 504 del medio de unión, una parte deslustrada 506, una parte transparente 508 y, en una abertura opuesta al compartimiento 102, una película 510.
- La parte 520 está formada en la extremidad del compartimiento 102. La figura 13 muestra un modo de realización particular de la parte 520 constituida de cuatro dientes 522 formados lateralmente en un parte cilíndrica coaxial con el compartimiento 102. La parte 504, en este modo de realización, está constituida de cuatro gargantas 524 cuyos perfiles corresponden al de los dientes. Estas gargantas 524 se extienden, de manera elíptica, desde una abertura adaptada para recibir un diente 522 hacia el interior del cilindro de protección 502 de tal manera que la rotación del

## ES 2 547 429 T3

- cilindro de protección 502 indicada por una flecha en la figura 13 provoca el avance de cada diente 522 en la garganta 524 correspondiente y el apriete del cilindro de protección 502 sobre el compartimiento 102.
- 5 La fijación del cilindro de protección 502 al conector que comprende la aguja 180 es la siguiente. La aguja 180 es encajada en la parte inferior de la parte 524, que es la parte opuesta al compartimiento 502. La parte 524 es montada con fuerza en la parte 506 gracias a cuatro aletas. Las aletas se encuentran en la parte 504 y son insertadas en cuatro gargantas que se encuentran en la parte 506.
- La parte deslustrada 506 sirve para enmascarar la aguja 180. La parte transparente 508 permite al usuario verificar el estado de la filtración y su realización.
- 10 La película 510, que recubre y obtura la totalidad de la abertura inferior del cilindro 502 está provista de una parte lateral que se extiende a corta distancia del cilindro 502 (ilustrada en la figura 10). Esta parte lateral permite la retirada fácil de la película 510.
- La película 510 protege al usuario contra el acceso a la aguja 180. La película 510 protege también la aguja 180 contra los riesgos de ensuciamiento y/o de contaminación.
- 15 El cilindro 502 está discretamente coloreado, por ejemplo de azul, verde o amarillo, según el destino del soporte de filtro (estudios citológicos, biología molecular, cultivo, respectivamente).
- En la figura 11, se observa que después de la inserción del líquido que haya que filtrar en el compartimiento 102 y retirada de la película 510, se inserta el tubo de vacío 185 provisto de su tapón 186, en el cilindro de protección y de guiado 502. A continuación, se presiona sobre el tubo de vacío 185 para que la aguja 180 perfora el tapón 186, como se expuso anteriormente.
- 20 En el ensamblaje así constituido, ilustrado en la figura 12, la depresión inicialmente presente en el tubo de vacío 185 provoca el filtrado del líquido presente en el compartimiento 102.
- Una vez terminado el filtrado, como se ilustra en la figura 13, se retiran conjuntamente el cilindro de protección 502 y la aguja 180 que éste contiene.
- La figura 14 recapitula las etapas así puestas en práctica.
- 25 En el transcurso de una etapa 602, se ensamblan las piezas del dispositivo. En el transcurso de una etapa 603, se retira el tapón 114. En el transcurso de una etapa 604, se introduce un líquido, por ejemplo sangre, que contenga células que haya que aislar y eventualmente que cultivar, por la extremidad superior del compartimiento 102.
- En el transcurso de una etapa 605, se introduce el tubo de vacío 185 en el cilindro de protección 502, lo que tiene por efecto aplicar la extremidad puntiaguda 182 de la aguja 180 aproximadamente en el centro del tapón 186, y se aplican, sobre el compartimiento 102 y sobre el tubo de vacío 185, fuerzas opuestas para hacer penetrar la aguja 30 180 en el tapón 186 hasta que la extremidad de la aguja llegue al volumen interior, en depresión, o al vacío, del tubo de vacío 185, en el transcurso de una etapa 606.
- En el transcurso de una etapa 610, se efectúa una filtración, por aspiración hacia el interior de tubo de vacío 185, de las células más pequeñas que las células de interés, las eventuales células que hayan sido sometidas a lisis, y el principal del líquido presente en el compartimiento 102, quedando retenidas las células de interés en el filtro 108.
- 35 En el transcurso de una etapa 612, se retiran el cilindro de protección 502, el tubo de vacío 185 y la aguja 180.
- Las etapas siguientes han sido ya expuestas en relación con los otros modos de realización y dependen de estos modos de realización. Éstas, por consiguiente, no se describirán ahora de nuevo.
- 40 Con la lectura de lo que precede, se comprende que, en tanto que el cilindro de protección esté unido al compartimiento, el usuario queda protegido contra un pinchazo accidental con la aguja. Además, la colocación del tubo de vacío es facilitada por el guiado ofrecido por el cilindro de protección. La posición del tubo de vacío en el transcurso de la aspiración es también mantenida rígidamente, lo que evita su retirada o un desplazamiento que permitiría al aire entrar en el tubo de vacío pasando en el lado de la aguja por el tapón del tubo de vacío. El riesgo de contaminación de la muestra por el usuario resulta minimizado porque el usuario no puede tocar la aguja por descuido.
- 45 Preferentemente, como ilustran las figuras 10 a 13, el dispositivo objeto de la presente invención comprende, al menos provisionalmente, el citado cilindro de protección. En otros modos de realización, el montaje es efectuado justo antes de la utilización.
- 50 Preferentemente, como ilustran las figuras 10 a 13, el medio de unión es provisional y permite la retirada del cilindro de protección conjuntamente con el del tubo de vacío. En variantes, la retirada de estas dos partes está separada en dos etapas sucesivas.

En modos de realización, la presentación del dispositivo objeto de la presente invención toma la forma de un kit que comprende, en un saquete externo, dos saquetes internos, de los cuales:

- el primero comprende el dispositivo montado, como ilustran las figuras 2A, 6A o 10 y

5 - el segundo comprende la aguja, el tubo de vacío, el pozo de cultivo y una lámina circular y/o tubo Eppendorf o cualquier otro accesorio útil para la puesta en práctica del dispositivo.

La puesta en práctica de la presente invención permite evitar extracciones arriesgadas de células, por ejemplo células del líquido amniótico al tiempo que permite cultivos, por ejemplo para una amniocentesis. Además, debido a la forma en depósito del soporte 108 del filtro, se pueden realizar directamente en este soporte reacciones de inmunocitoquímica o de hibridación fluorescente in situ (« FISH »).

10

**REIVINDICACIONES**

1. Dispositivo para asilar células fijadas o vivas en un filtro (108, 308), o extraer el material genético de las citadas células, que comprende:
- 5 - un compartimiento (102, 302) que presenta un volumen interior para recibir un líquido que comprende las citadas células, una abertura inferior y una entrada de aire,
- un medio (110) móvil con respecto al compartimiento, presentando este medio móvil patas,
- un filtro solidario, al menos temporalmente, de la citada abertura del compartimiento o del citado medio móvil, adaptado para retener las citadas células durante el paso del líquido a través del filtro,
- 10 - una aguja (180) solidaria, al menos temporalmente de la citada abertura del compartimiento, de manera estanca, encontrándose el filtro entre la aguja y el volumen interior del compartimiento, estando la citada aguja adaptada para perforar un tapón (186) de tubo de vacío (185) que presenta una depresión con respecto a la presión ambiente para aspirar el líquido a través del citado filtro,
- 15 caracterizado por que comprende, además, un medio de unión (504, 520) entre el compartimiento y un cilindro de protección (502) que rodea a la aguja estando adaptado el citado medio de unión para rodear, al menos parcialmente, el tubo de vacío durante la aspiración del líquido a través del filtro,
- 20 en el cual el medio móvil y el compartimiento están configurados para ser puestos en movimiento relativo para aplicar una fuerza sobre el filtro y liberar el filtro después de la aspiración del líquido a través del filtro, y en el cual las patas del medio móvil están configuradas para, cuando el dedo de un operario ponga en movimiento relativo el medio móvil y el compartimiento, ejercer una presión sobre un soporte del filtro y liberar el soporte de filtro de la abertura del compartimiento.
2. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, al menos provisionalmente, el cilindro de protección (502).
3. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el cual el citado medio de unión (504, 520) es provisional y permite la retirada conjunta del cilindro de protección (502) y del tubo de vacío (185).
- 25 4. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el cual el cilindro de protección (502) comprende una película desmontable (510) que obtura una abertura del cilindro de protección opuesta al medio de unión (504, 520), abertura adaptada para la introducción del tubo de vacío (185) en el cilindro de protección después de la retirada de la película desmontable.
- 30 5. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el cual el soporte de filtro (108, 308) desmontable es de acero quirúrgico y está adaptado para ser solidarizado de manera temporal a la abertura inferior del compartimiento (102, 302).
6. Dispositivo de acuerdo con la reivindicación 5, en el cual el citado soporte de filtro (108, 308) está adaptado para permitir su paso por un escáner.
- 35 7. Dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 o 6, en el cual el citado soporte de filtro (108, 308) lleva un identificador.
8. Dispositivo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende un conector desmontable fijado al compartimiento de modo estanco y desmontable y adaptado para impedir el movimiento relativo del medio móvil y del compartimiento que permite aplicar la citada fuerza y liberar el citado soporte de filtro.
- 40 9. Procedimiento para aislar células vivas en un filtro (108, 308) o extraer el material genético de las citadas células, que comprende:
- una etapa (202, 402, 602) de solidarización, al menos temporal, de un filtro (108, 308) a una abertura inferior de un compartimiento (102, 302) que presenta, además, una entrada de aire,
- una etapa (208, 405, 604) de inserción de un líquido que comprende las citadas células en el citado compartimiento, y
- 45 - una etapa de solidarización (202, 402, 602), al menos temporal, de una aguja (180) a la citada abertura del compartimiento, de manera estanca, encontrándose el filtro entre la aguja y el volumen interior del compartimiento,
- caracterizado por que comprende, además:
- una etapa (602) de fijación, al menos temporal, de un cilindro de protección (502) al compartimiento, rodeando entonces el cilindro de protección a la aguja,

- una etapa de perforación (210, 406, 605, 606) con la citada aguja, de un tapón (186) del tubo de vacío (185) que presenta una depresión con respecto a la presión ambiente, en el transcurso de la cual se inserta el tubo de vacío en el cilindro de protección,
- 5
- una etapa de aspiración (210, 410, 610), por medio de la depresión del tubo de vacío, del líquido a través de citado filtro, reteniendo el citado filtro las citadas células, y
- 10
- una etapa de puesta en movimiento relativo de un medio móvil que presenta patas y del compartimiento para aplicar una fuerza sobre el filtro y liberar el filtro después de la aspiración del líquido a través del filtro, ejerciendo las patas del medio móvil, cuando el dedo de un operario ponga en movimiento relativo el medio móvil y el compartimiento, una presión sobre un soporte del filtro y liberando el soporte de filtro de la abertura del compartimiento.
10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende una etapa (612) de retirada conjunta del cilindro de protección (502) y del tubo de vacío (185).
- 15
11. Procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 9, en el cual, comprendiendo el cilindro de protección (502) una película desmontable (510) que obtura una abertura del cilindro de protección opuesta al medio de unión (504, 520), el citado procedimiento comprende una etapa de retirada de la citada película desmontable antes de insertar el tubo de vacío en el cilindro de protección por la citada abertura antes de la inserción del tubo de vacío (185) en el cilindro de protección.

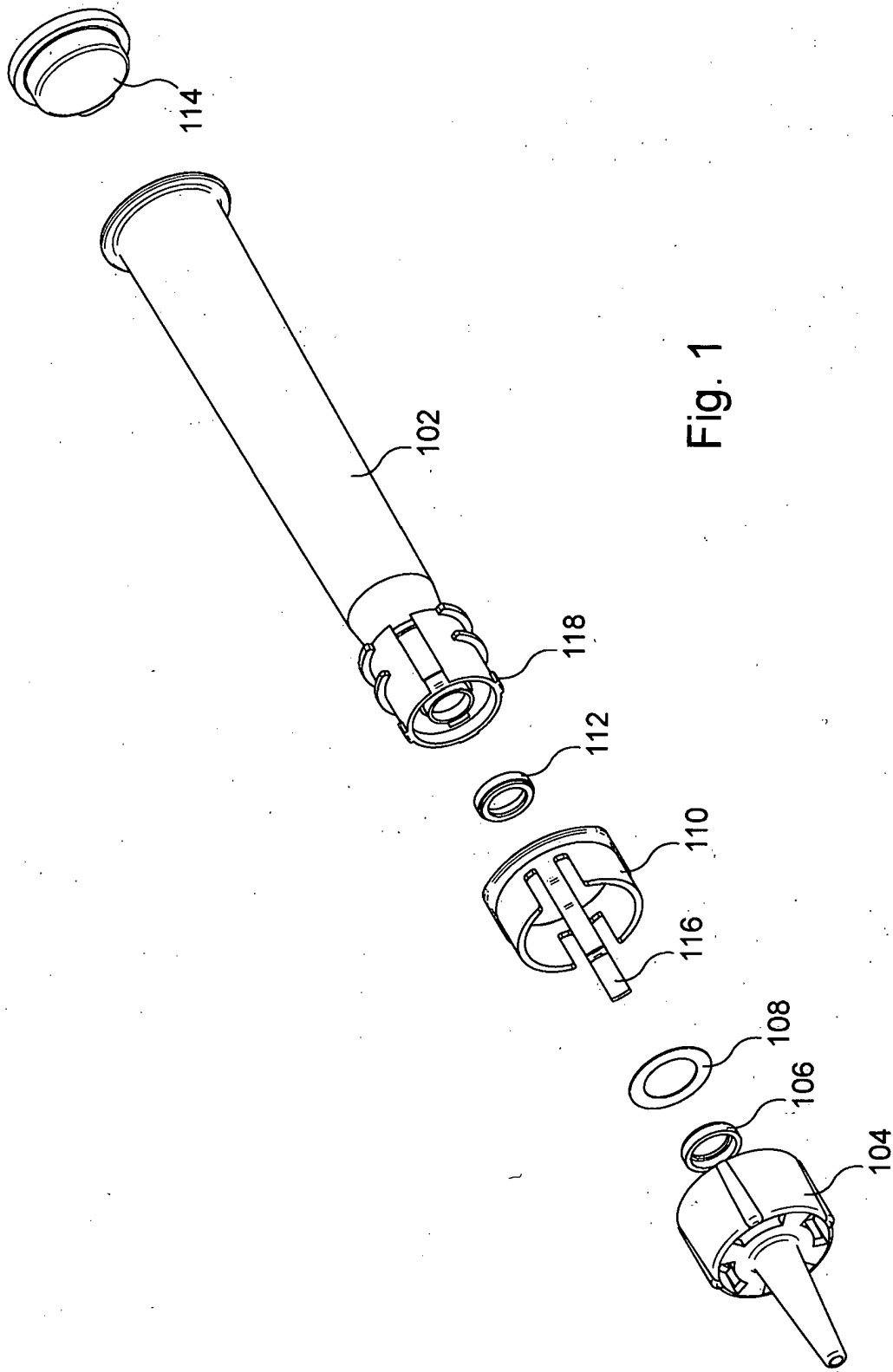


Fig. 1

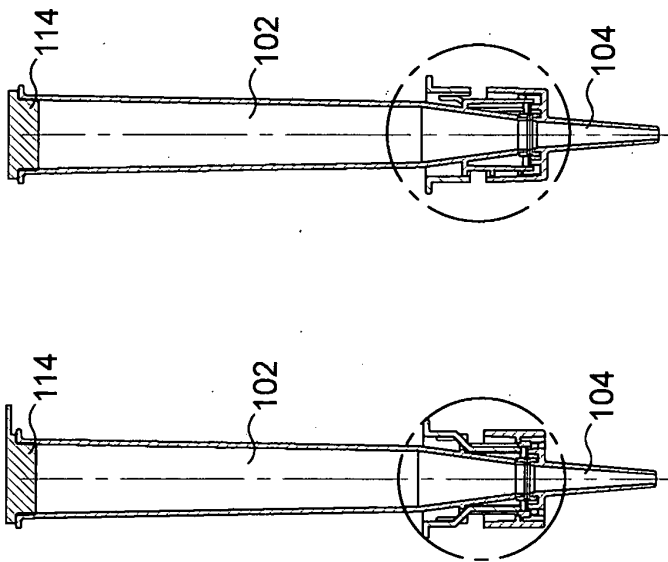


Fig. 2C

Fig. 2A

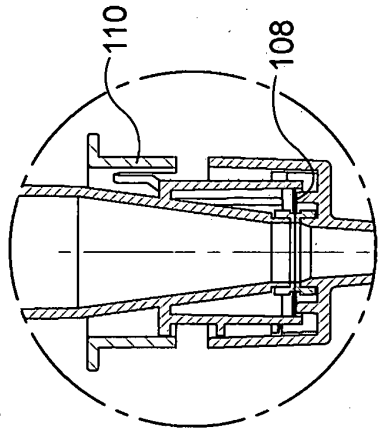


Fig. 2D

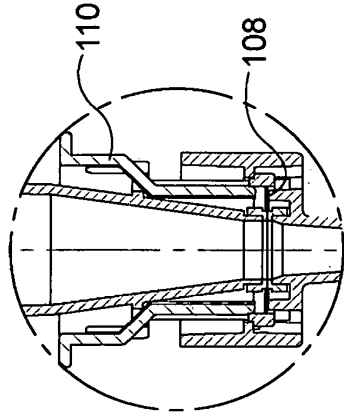
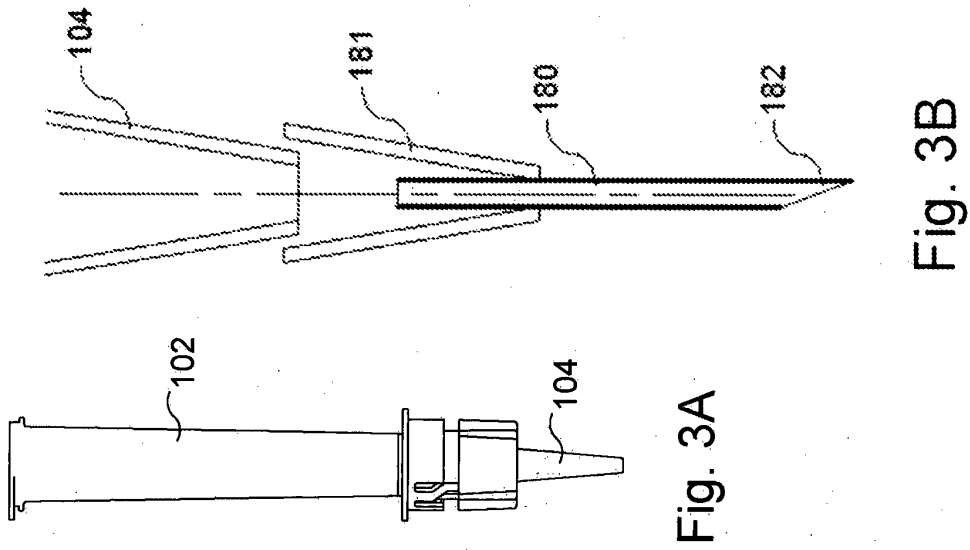
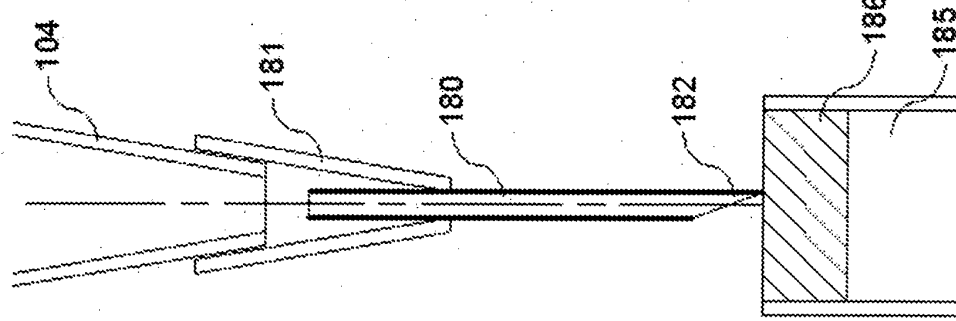
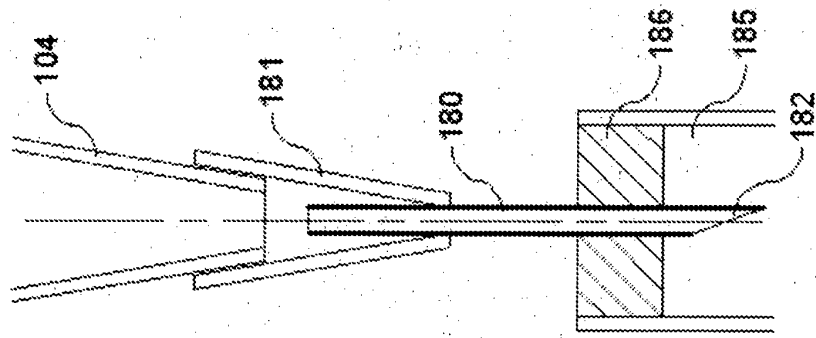
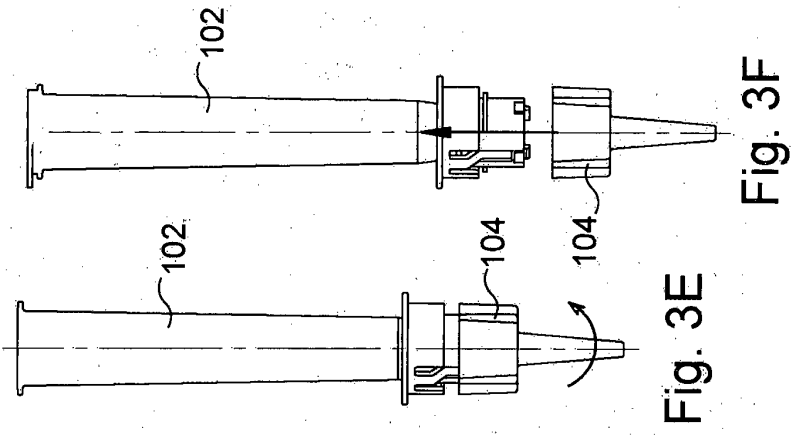


Fig. 2B





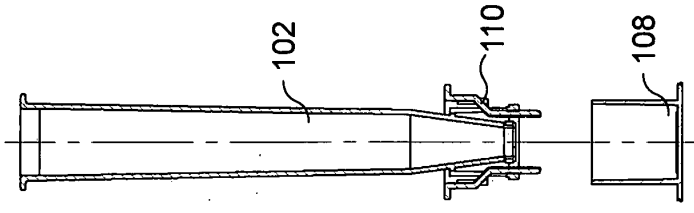


Fig. 30

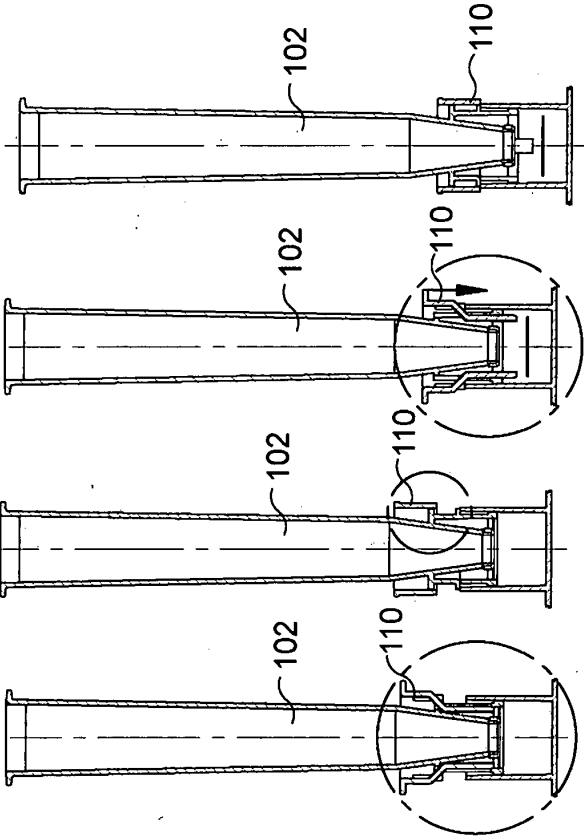


Fig. 3H Fig. 3J Fig. 3L Fig. 3N

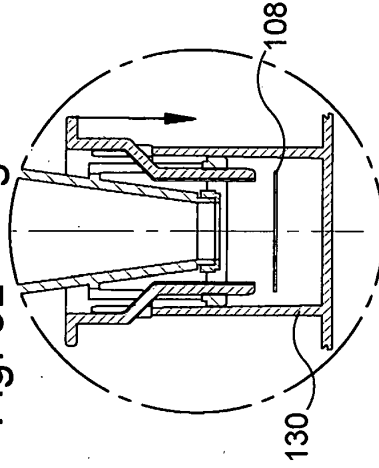


Fig. 3M

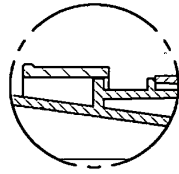


Fig. 3K

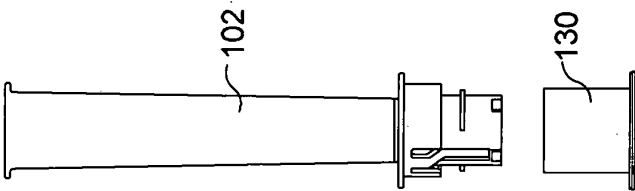


Fig. 3G

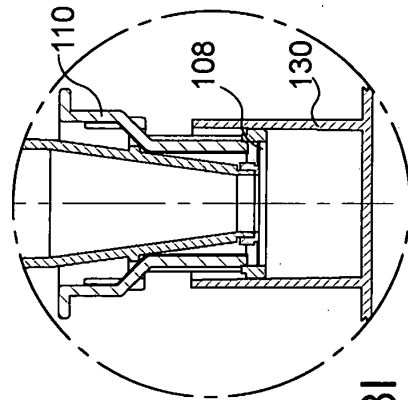


Fig. 3I

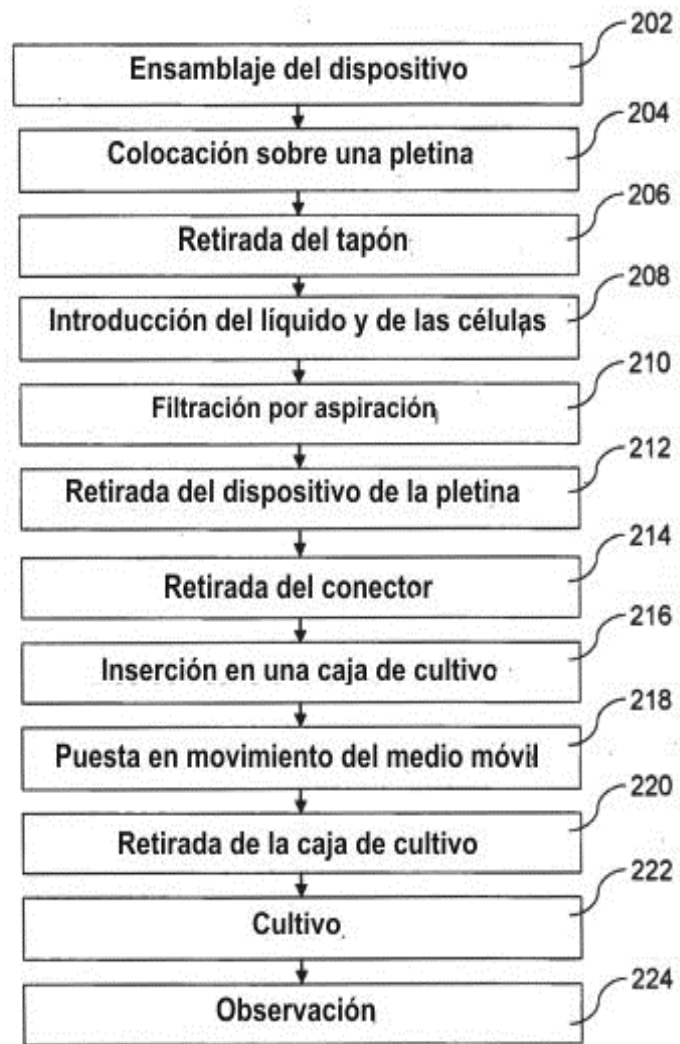


Figura 4

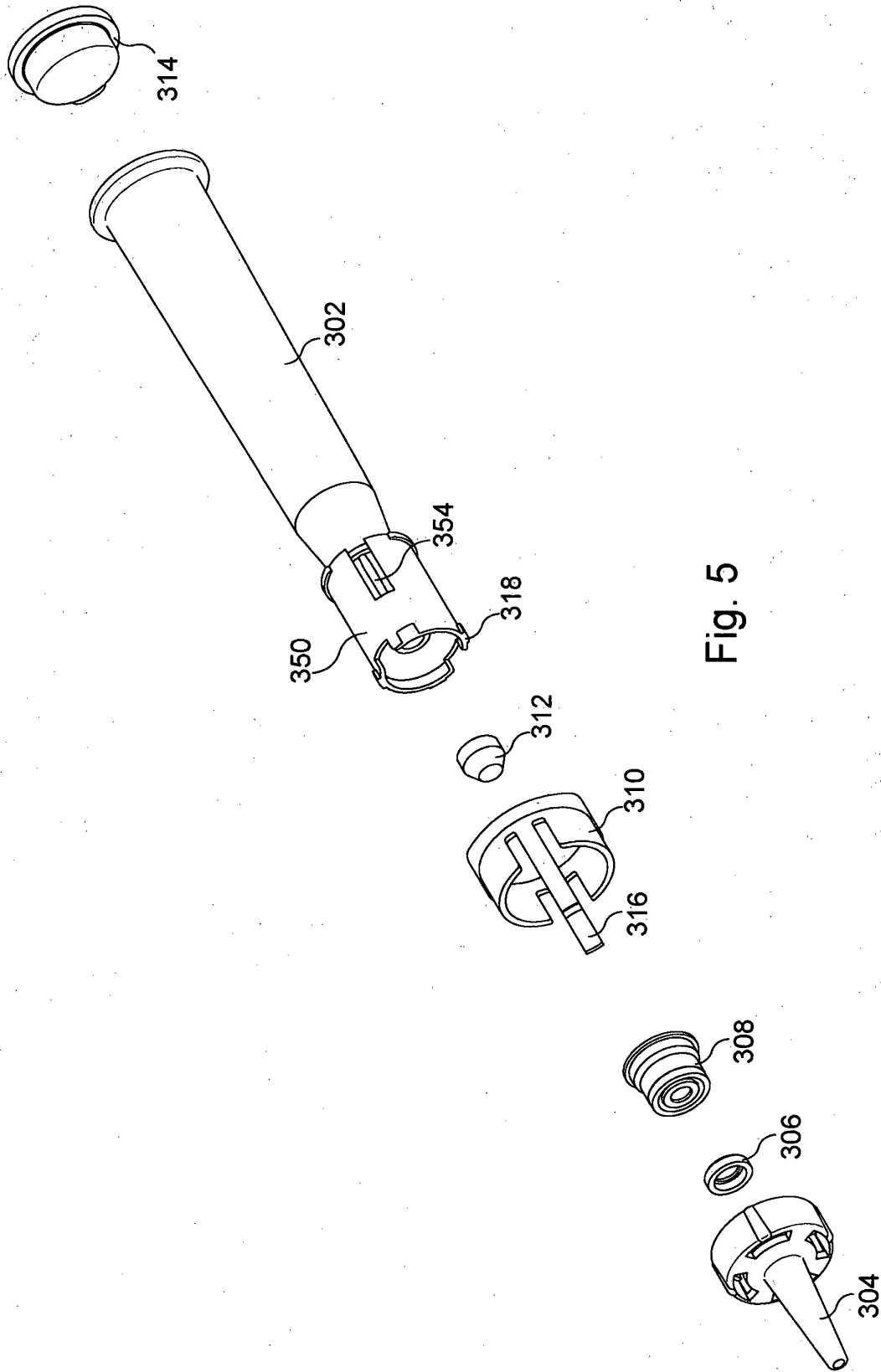


Fig. 5

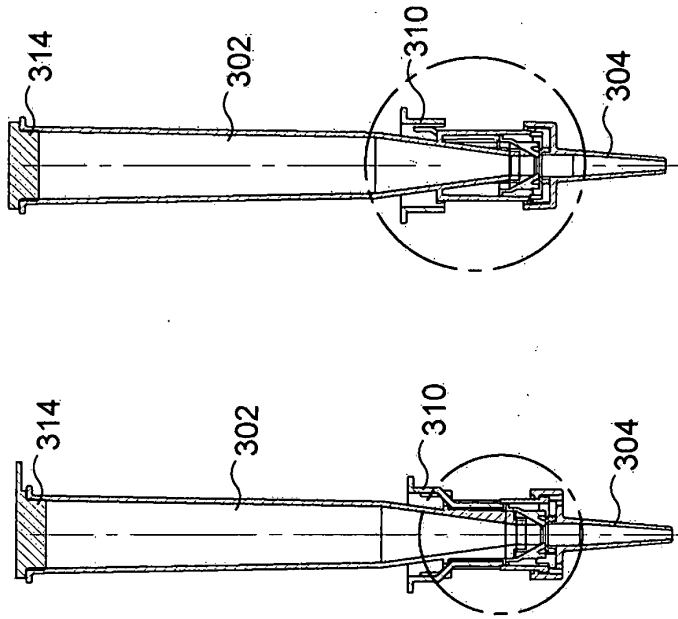


Fig. 6A

Fig. 6B

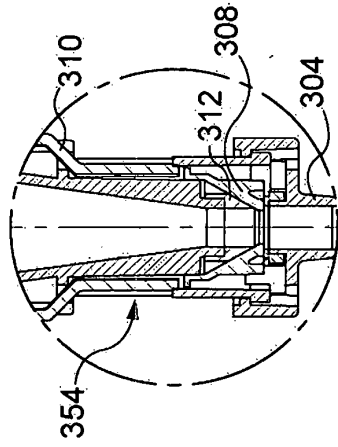


Fig. 6C

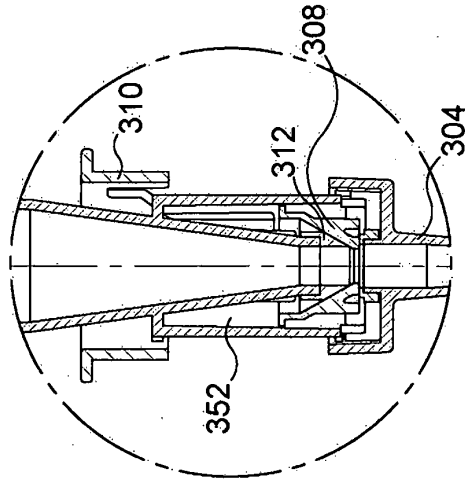
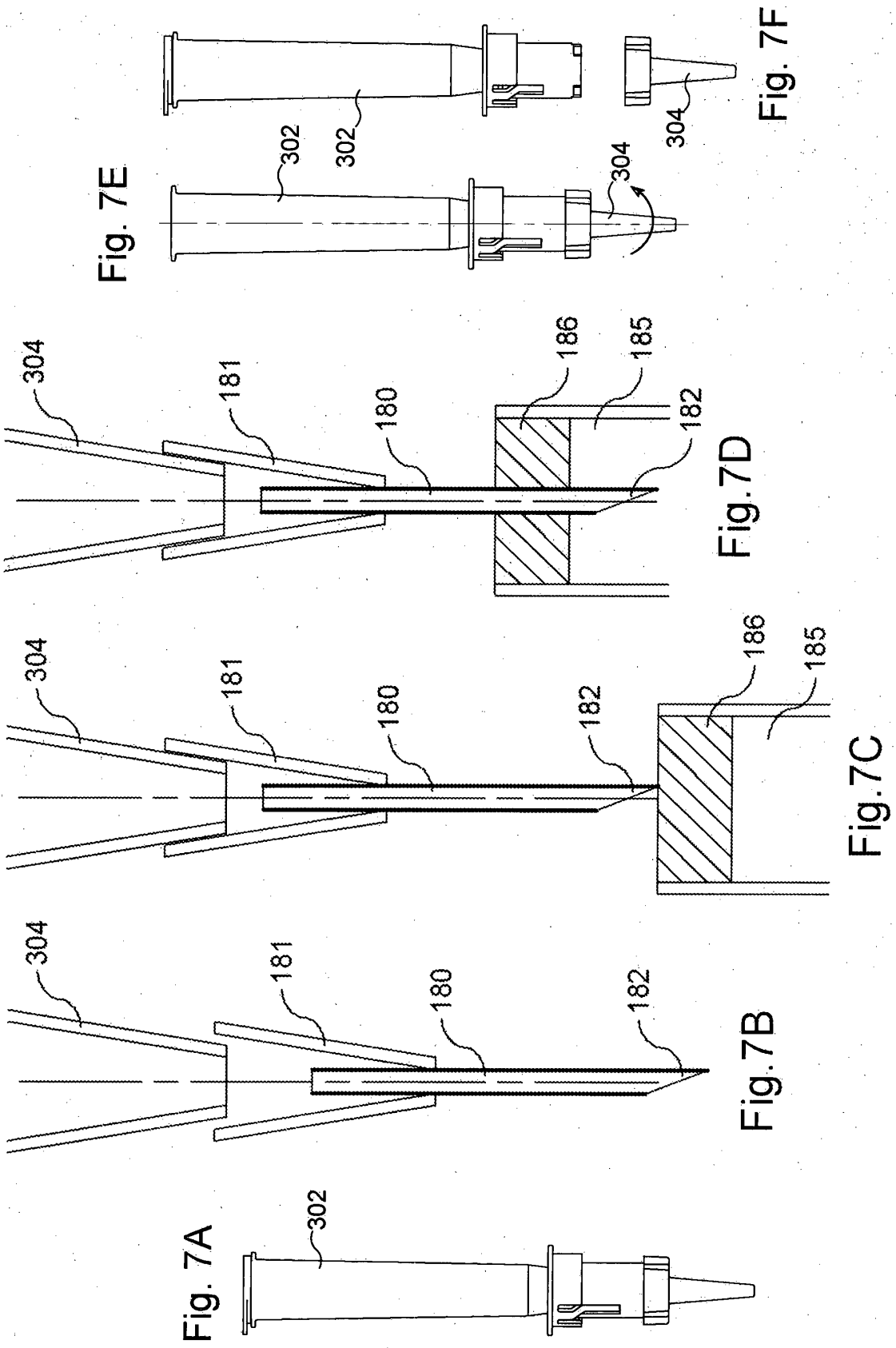
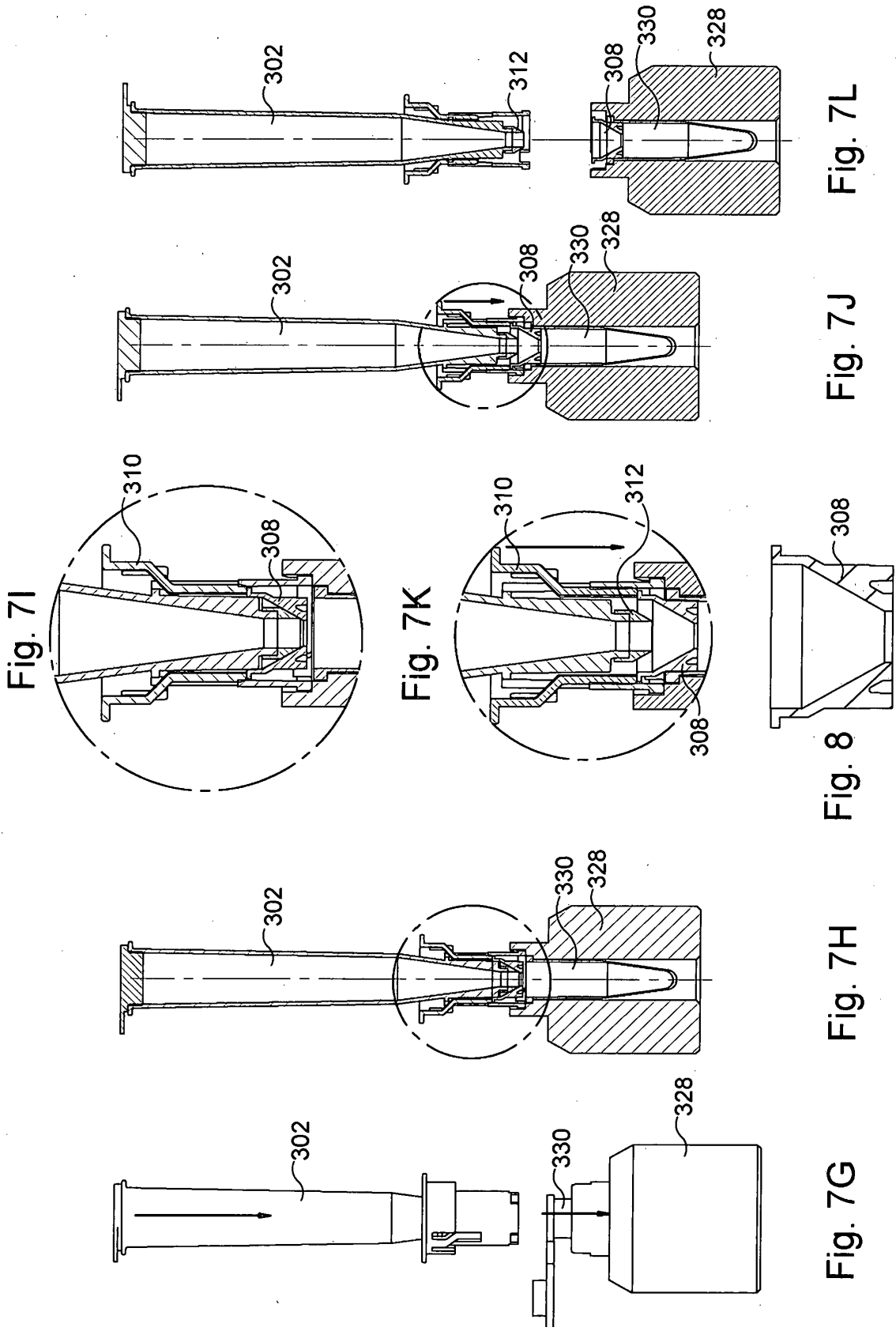


Fig. 6D





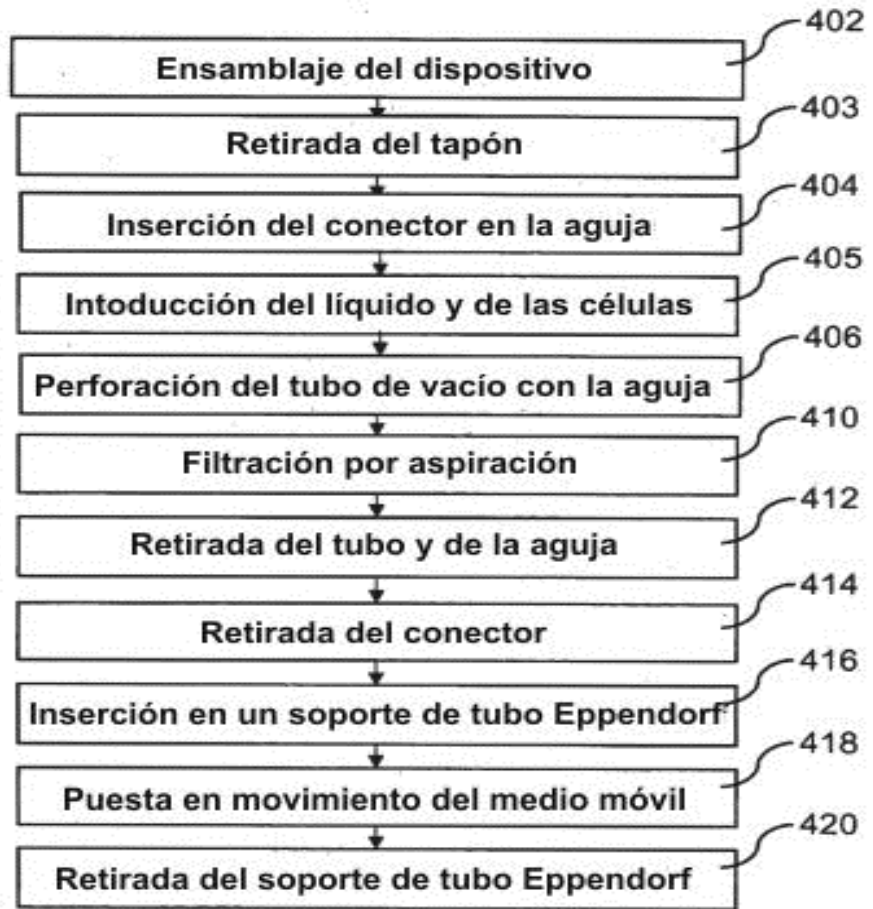


Fig. 9



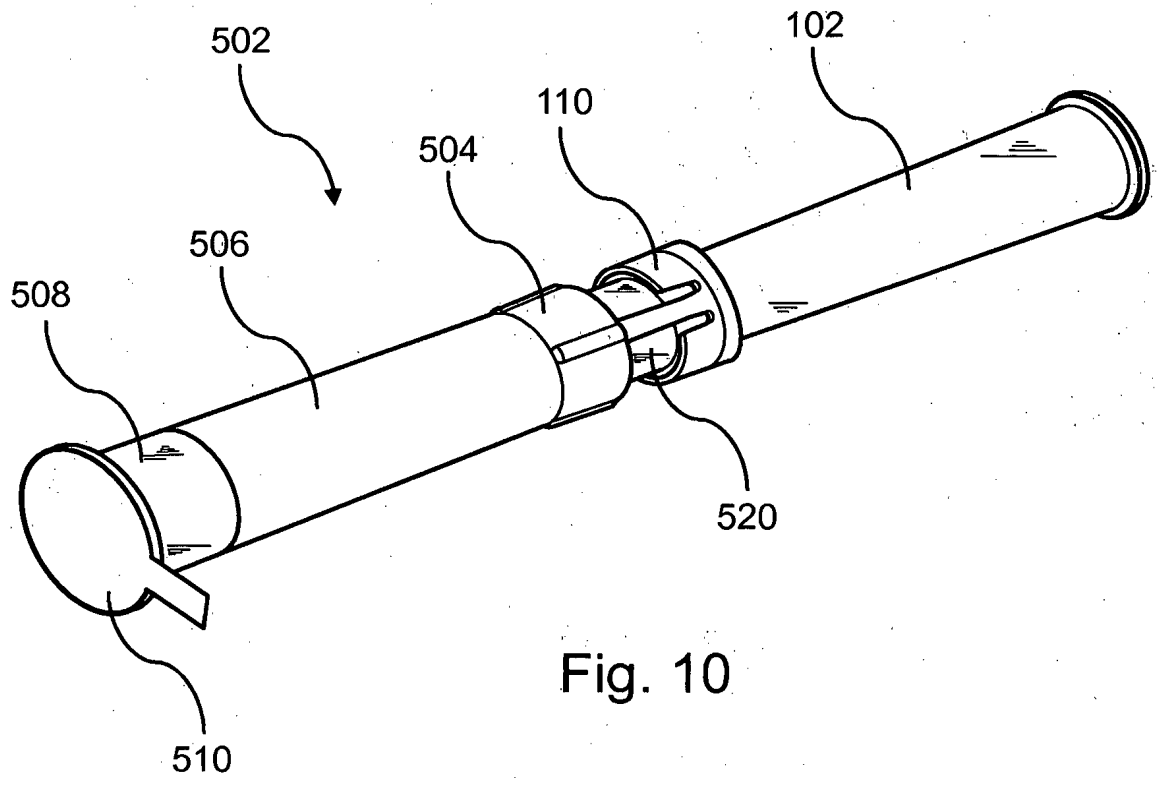


Fig. 10

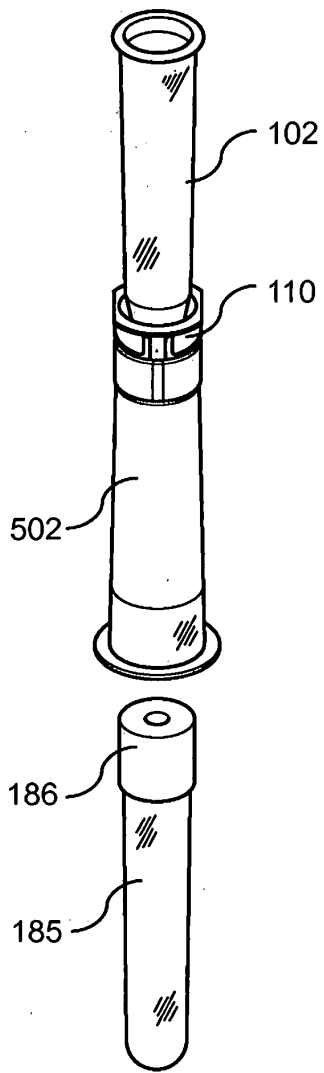


Fig. 11

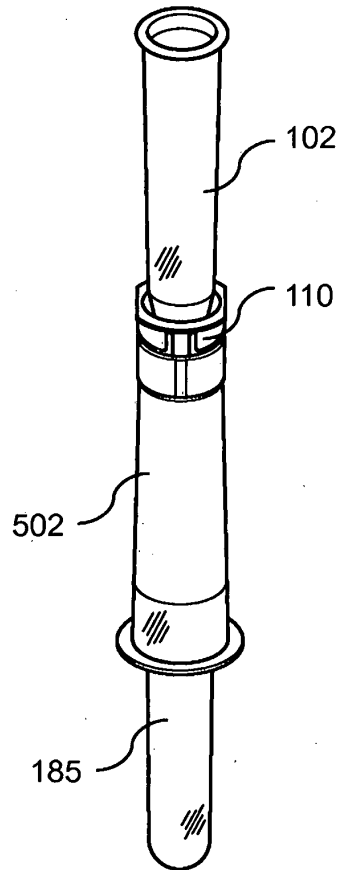


Fig. 12

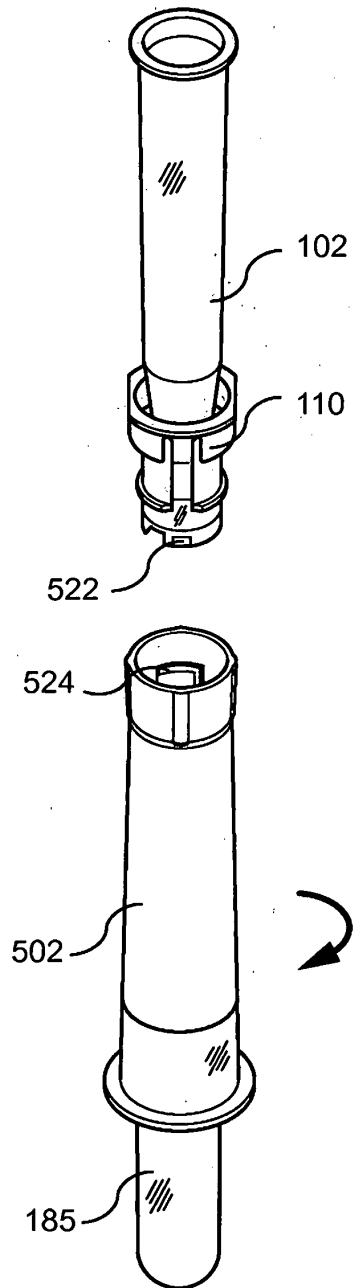


Fig. 13

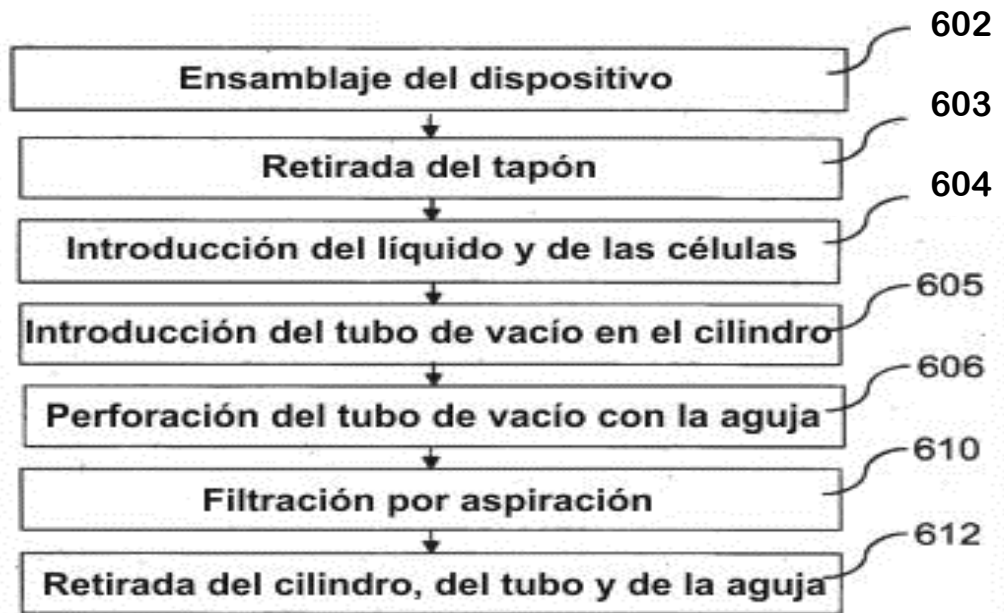


Figura 14