

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 856**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

B01L 9/00 (2006.01)

C12M 1/18 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2006 E 06726089 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015 EP 1866091**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para separar por filtración vertical partículas biológicas contenidas en un líquido**

30 Prioridad:

24.03.2005 FR 0502945

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

02.11.2015

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) (33.3%)
101, RUE DE TOLBIAC
75013 PARIS, FR;
ASSISTANCE PUBLIQUE - HOPITAUX DE PARIS
(33.3%) y
UNIVERSITE RENE DESCARTES (PARIS V)
(33.3%)**

72 Inventor/es:

PATERLINI-BRECHOT, PATRIZIA

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el
folleto original publicado por la Oficina
Europea de Patentes**

ES 2 549 856 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

Procedimiento y dispositivo para separar por filtración vertical partículas biológicas contenidas en un líquido

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a la separación de partículas biológicas contenidas en un líquido, susceptibles de ser separadas en base a su tamaño, realizándose la separación por filtración vertical con ayuda de un filtro adaptado a la naturaleza de las partículas a aislar. Las partículas son aisladas concretamente con fines de purificación o de análisis y eventualmente de diagnóstico.
- 10 **[0002]** Para desarrollar métodos de diagnóstico no invasivos concretamente en el campo prenatal, o métodos de diagnósticos precoz, concretamente en el campo de la oncología, se ha propuesto en las solicitudes de patente FR 2 782 730 y FR 2 824 144, buscar células características raras en líquidos biológicos extraídos en pacientes. En estos métodos, las células a detectar son buscadas mediante una operación de enriquecimiento por filtración utilizando concretamente una máquina de filtración de tipo ISET tal como la máquina que se describe en la patente
15 WO 91/11245, o también una microplaca de filtración para análisis tal como la descrita en la patente WO 2005/021130.
- [0003]** Estos métodos consisten en filtrar a través de un filtro cuyos poros o porosidades están adaptados, un líquido biológico que se haya sometido eventualmente a una preparación específica, de modo que las células
20 buscadas formen sobre el filtro un residuo de filtración que es analizado a continuación. La porosidad del filtro, la preparación del líquido biológico y el método de análisis se seleccionan en función de la naturaleza de las células buscadas.
- [0004]** Estos métodos se han desarrollado inicialmente utilizando un aparato de filtración diseñado para
25 buscar partículas en la leche con fines de control de la calidad. Aunque se hayan realizado adaptaciones necesarias teniendo en cuenta la naturaleza de los líquidos filtrados y de las partículas buscadas, estos métodos siguen presentando inconvenientes. En particular, la sangre es difícil de filtrar.
- [0005]** En aproximadamente el 30% de los casos, la filtración de este líquido es interrumpida por
30 obturaciones que la hacen inutilizable.
- [0006]** Por otro lado, el dispositivo utilizado para contener la muestra de líquido a filtrar comprende un mecanismo para obtener la estanqueidad poco cómodo de emplear.
- 35 **[0007]** Finalmente, y de forma general, la fiabilidad de la filtración que es suficiente para una utilización a título experimental en un laboratorio es insuficiente para una utilización con fines de diagnóstico en serie.
- [0008]** El objetivo de la presente invención es remediar este inconveniente proponiendo un medio para
40 fiabilizar la operación de aislamiento por filtración vertical de células contenidas en un líquido o, de forma más general, de separación de partículas biológicas de un líquido que las contiene para hacerla adaptada concretamente a una utilización con fines de diagnóstico.
- [0009]** A tal efecto, la invención tiene por objeto un procedimiento para separar, con fines de purificación o de
45 análisis y eventualmente de diagnóstico, partículas biológicas y el líquido que las contiene, que comprende al menos una etapa de filtración vertical a través de un filtro cuya porosidad está adaptada a la naturaleza de las partículas biológicas que se desea separar para que dichas partículas biológicas sean retenidas por el filtro, caracterizado porque se utiliza un filtro que comprende al menos una zona elemental de filtración, teniendo cada zona elemental de filtración una superficie limitada, y porque se selecciona la superficie de cada zona elemental de filtración y el número de zonas elementales de filtración en función de la naturaleza del líquido a filtrar, de la naturaleza de las
50 partículas biológicas a separar y del volumen del líquido a filtrar.
- [0010]** Cada zona elemental de filtración de dicho procedimiento tiene una superficie igual a la de un disco de diámetro comprendido entre 0,6 cm y 3 cm, y el número de zonas elementales de filtración se selecciona para que la relación del volumen de líquido filtrado con la superficie de filtración sea inferior a 40 ml/cm² y superior a 0,14
55 ml/cm².
- [0011]** Preferentemente, cada zona elemental de filtración tiene una superficie igual a la de un disco que tiene un diámetro superior o igual a 0,8 cm.

[0012] Preferentemente, el filtro tiene poros calibrados de un tamaño comprendido entre 3 μm y 100 μm y una densidad de poros comprendida entre 3×10^3 y 5×10^6 poros/ cm^2 .

[0013] Preferentemente, la filtración se realiza mediante una presión negativa comprendida entre 0,05 bares y 1 bar con, eventualmente, una sobrepresión inferior a 1 bar.

[0014] Para realizar la filtración, es preferible utilizar un filtro que constituye una plaquita adaptada para asociarse a un medio de análisis de los residuos de filtración localizando las zonas elementales de filtración.

10 **[0015]** Preferentemente, la plaquita que constituye el filtro está incorporada en un módulo de filtración de un solo uso que comprende al menos un depósito para contener el líquido a filtrar, y susceptible de ser tratado antes del uso para ser esterilizado o de estar libre de enzimas que digieren el ADN, el ARN o las proteínas.

15 **[0016]** Las partículas biológicas a separar son, por ejemplo, células. En este caso, previamente a la filtración del líquido que contiene células, se puede preparar una muestra de líquido a filtrar a partir de una muestra de líquido que contiene células, tal como un líquido biológico o un cultivo celular realizando un enriquecimiento previo en células a separar y/o una dilución.

20 **[0017]** El líquido que contiene células puede ser sangre y, preferentemente, el filtro tiene entonces poros calibrados de un tamaño comprendido entre 5 μm y 25 μm .

[0018] Las partículas biológicas también pueden ser fibrinas.

25 **[0019]** El líquido que contiene las partículas biológicas es orina y los poros calibrados del filtro tienen un tamaño comprendido ente 8 μm y 100 μm .

30 **[0020]** El procedimiento puede utilizarse para la detección, con fines de diagnóstico, de células del tipo células tumorales, fetales, endoteliales, fibroblásticas, musculares, nerviosas, monocíticas, células madre, células de órganos, precursores, células hematopoyéticas, en un líquido biológico de tipo sangre, orina, ascitis, líquido cefalorraquídeo, leche, derrame pleural, líquido de lavado del cuello del útero, líquido de suspensión de células obtenidas mediante extracción por biopsia, mediante un método quirúrgico, mediante enjuague de la boca, o para la detección de células animales o vegetales.

35 **[0021]** La invención también se refiere a un módulo de filtración para la implementación del procedimiento, módulo que comprende:

- un bloque de depósito que comprende al menos un compartimento cerrado en su parte inferior mediante un fondo que consta al menos de una abertura;

40 - un cajón de soporte de filtro que comprende al menos un agujero, estando cada agujero dispuesto en frente de una abertura del bloque de depósito;

- un filtro sujeto entre la cara inferior del bloque de depósito y el cajón de soporte.

45 **[0022]** En este módulo, las dimensiones cada abertura del fondo del bloque de depósito y las dimensiones de cada agujero del cajón de soporte de filtro están adaptadas para que cada par constituido por uno de la abertura del fondo del bloque de depósito y del agujero del cajón de soporte de filtro asociado, defina una zona de filtración elemental de superficie limitada y el volumen útil de cada compartimento sea proporcional al número de zonas de filtración elemental situadas en el fondo del compartimento.

50 **[0023]** Preferentemente, la superficie de una zona elemental de filtración es igual a la de un disco que tiene un diámetro equivalente comprendido entre 0,6 cm y 3 cm, y la relación del volumen útil de cada compartimento con la suma de las superficies de las aberturas de que consta el fondo del compartimento es inferior a 40 ml/cm^2 y superior a 0,14 ml/cm^2 .

55 **[0024]** Preferentemente, las dimensiones de al menos una abertura del fondo del bloque de depósito y de un agujero correspondiente del cajón de soporte de filtro están adaptadas para que la superficie de la zona elemental de filtración correspondiente sea superior o igual a la de un disco de 0,8 cm de diámetro.

- 5 **[0025]** Preferentemente, al menos un compartimento puede dividirse en compartimentos parciales mediante al menos una pared de separación amovible, de modo que al menos un compartimento parcial conste en su fondo de al menos una abertura y que la relación del volumen de dicho compartimento parcial con la suma de las superficies de las aberturas del fondo del compartimento parcial sea inferior a 40 ml/cm^2 , y preferentemente superior a $0,14 \text{ ml/cm}^2$.
- 10 **[0026]** Preferentemente, el módulo de filtración comprende una junta de estanqueidad estriada dispuesta entre el fondo del bloque de depósito y el filtro, que consta al menos de un agujero correspondiente a un agujero del fondo del bloque de depósito, estando el agujero rodeado por al menos un labio sobresaliente.
- 15 **[0027]** También preferentemente, el módulo de filtración comprende, además, entre el filtro y el soporte de filtro, una junta de placa que consta al menos de una abertura en frente de un agujero del soporte de filtro.
- [0028]** El filtro puede constituir una plaquita cuya parte central consta al menos de una zona porosa y cuya periferia constituye un marco que consta de medios de indexación de su posición sobre el soporte de filtro.
- 20 **[0029]** Los medios de indexación son, por ejemplo, al menos dos agujeros de diámetros diferentes que cooperarán con espigas de diámetros correspondientes previstas en el soporte de filtro.
- [0030]** Preferentemente, al menos una parte central porosa del filtro consta de, por cm^2 , entre 3×10^3 y 5×10^6 poros de tamaño comprendido entre $3 \mu\text{m}$ y $100 \mu\text{m}$.
- 25 **[0031]** Preferentemente, el módulo de filtración consta, además, de al menos un tapón para el cierre de la abertura superior de un compartimento.
- [0032]** Preferentemente, el bloque de depósito consta, en su parte inferior, de un reborde que se extiende hacia el exterior y que coopera con al menos un eje de ensamblaje que permite sujetar el filtro entre el soporte de filtro y el bloque de depósito, constando el eje de ensamblaje de un extremo divisible que se extiende por encima del reborde del bloque de depósito.
- 30 **[0033]** Preferentemente, todas sus piezas están constituidas por materiales adaptados a una operación de esterilización o que les dejará libres de ARNasa, ADNasa o proteinasas.
- 35 **[0034]** La invención se refiere finalmente a un soporte de un módulo de filtración para mantener a un módulo de filtración sobre una máquina de filtración, que comprende al menos un excéntrico móvil entre una posición de apertura y una posición de sujeción, que aplicará presión sobre el filtro entre el soporte de filtro y el bloque de depósito.
- 40 **[0035]** Preferentemente, al menos un excéntrico está adaptado para que, cuando el módulo de filtración consta al menos de un eje de fijación del cual un extremo es divisible, el extremo de al menos un eje de fijación sea cortado durante la aplicación de presión al filtro por al menos un excéntrico.
- [0036]** El bloque de soporte forma parte de una máquina de filtración.
- 45 **[0037]** Preferentemente, el módulo de filtración comprende, además, un medio que cooperará con un medio complementario de un bloque de soporte, para imponer la orientación del módulo de filtración con respecto al bloque de soporte, y el bloque de soporte consta de un medio que cooperará con un medio de un módulo de filtración, para indexar la orientación del módulo de filtración con respecto al bloque de soporte.
- 50 **[0038]** La invención se describirá a continuación con más detalle de forma no limitante con respecto a los dibujos adjuntos, en los que:
- 55 - la figura 1 es una vista en perspectiva de un módulo de filtración asociado a un bloque de soporte de módulo de filtración;
- la figura 2 es una vista en despiece ordenado en perspectiva de un módulo de filtración;
- las figuras 3A y 3B son dos vistas en corte de un bloque de depósito de un módulo de filtración;

- la figura 4 es una vista en perspectiva con corte de una junta de estanqueidad estriada;

- las figuras 5A y 5B son vistas en perspectiva, concretamente con un corte, de un cajón de soporte de filtro;

5 - la figura 6A es una vista en perspectiva de un módulo de filtración dispuesto en un bloque de soporte;

- la figura 6B es una vista en perspectiva aumentada de los medios de sujeción de la base de un módulo de filtración dispuesto sobre un bloque de soporte del módulo de filtración; y

10 - la figura 7 es una vista en perspectiva separada de un módulo de filtración después de utilización, en la que el bloque de depósito está separado del cajón de soporte de filtro que consta de un filtro.

- la figura 8 es una vista en perspectiva de un módulo de filtración según una variante.

15 - la figura 9 es una vista en perspectiva de una plaquita-filtro.

[0039] El método para aislar partículas biológicas contenidas en un líquido, según la invención, consiste en filtrar el líquido en un filtro con características adaptadas a la naturaleza de las partículas a aislar. Las partículas biológicas pueden ser células, glóbulos rojos, agregados de plaquetas, fibrinas o residuos tisulares. El líquido filtrado es concretamente un líquido obtenido a partir de una extracción de líquido biológico que se haya sometido eventualmente a un tratamiento previo para facilitar la operación de aislamiento por filtrado. Esta operación previa, que se describirá con más detalles posteriormente, consta en general, concretamente cuando las partículas a aislar son células, de una o más de las siguientes operaciones: tratamiento químico para realizar un enriquecimiento previo en células a aislar, dilución, tratamiento químico para facilitar la separación por filtración de las células a aislar.

[0040] Además de estas condiciones de preparación de muestra de líquido a filtrar, los inventores han constatado que, para obtener una buena fiabilidad del proceso de aislamiento de las células a detectar, era necesario adaptar ciertas características del filtro al volumen de líquido filtrado. En particular, el filtro debe estar dividido en zonas elementales de filtración que tienen, cada una, una superficie igual a la de un disco de diámetro comprendido entre 0,6 cm y 3 cm, y preferentemente superior a 0,8 cm y aún mejor comprendido entre 0,8 cm y 1,5 cm. Las zonas de filtración elemental pueden tener, por ejemplo, una forma de disco.

[0041] Además, la cantidad de líquido a filtrar que debe pasar a través de cada una de las zonas elementales de filtración debe estar comprendida entre 1 ml y 100 ml, preferentemente este volumen debe estar comprendido entre 8 ml y 15 ml.

[0042] De este modo, para filtrar una muestra determinada, se deberá utilizar un dispositivo que determine en el filtro un número de zonas elementales de filtración proporcional al volumen de la muestra a filtrar.

[0043] En general, el volumen de la muestra a filtrar depende, por un lado, del volumen de la extracción de líquido biológico que ha podido realizarse inicialmente y, por otro lado, de una eventual dilución que depende concretamente de la naturaleza de las partículas biológicas a separar. El volumen de la extracción depende concretamente de la naturaleza del líquido extraído y de la edad del paciente del que se extrae este líquido. El experto en la materia es capaz de determinar los volúmenes de las extracciones en función de la naturaleza del líquido extraído y del paciente en el que se ha realizado la extracción.

[0044] La dilución está en función concretamente del número de partículas por unidad de volumen que se pueden encontrar en el líquido extraído. En efecto, para que la filtración se realice en condiciones satisfactorias, es deseable que el número de partículas a aislar por unidad de volumen del líquido a filtrar no sea demasiado grande para evitar la obturación del filtro. Por otro lado, cuando el procedimiento detecte células particulares raras mezcladas con células en mucho mayor número, el número de células por unidad de volumen no debe ser demasiado bajo, para obtener una probabilidad razonable de encontrar las células buscadas en el filtro. El experto en la materia es también capaz de determinar estos índices de dilución en función de la naturaleza del líquido considerado y del tipo de célula buscada.

[0045] La muestra biológica que es objeto de una extracción en un paciente puede ser, por ejemplo, sangre, orina, ascitis, líquido cefalorraquídeo, leche, derrame pleural; éste puede ser también líquido de lavado del cuello del útero o también cualquier otro líquido que pueda resultar de una extracción de muestra biológica de un paciente.

- 5 **[0046]** El método de análisis también puede utilizarse para buscar células en muestras que no son directamente extraídas de pacientes y, por ejemplo, en muestras extraídas de medios de cultivo celular realizado a partir de frotis o de biopsia o de extracción de tejido humano o animal o incluso en medios de cultivo celular humano o animal en línea.
- 10 **[0047]** Cuando el líquido biológico extraído es sangre, la cantidad extraída está generalmente comprendida entre 1 ml y 20 ml, y la sangre está diluida en una relación que varía de 1 a 5, a 1 a 20, para obtener una muestra de líquido a filtrar que, en estas condiciones, es filtrada en de una a 20 zonas elementales de filtración.
- 15 **[0048]** Para todos los demás líquidos, las extracciones son el orden de 5 ml a 10 ml y se diluyen en una relación de 1 a 2, a 1 a 10, o eventualmente no se diluyen. Estas muestras son filtradas en un número de zonas elementales de filtración que puede llegar a 5 o incluso más, en particular cuando se trata de una extracción de 10 ml que ha sido diluida en una relación de 1 a 10.
- 20 **[0049]** La naturaleza de las células susceptibles de ser buscadas son concretamente células tumorales, células fetales, células endoteliales, células fibroblásticas, células musculares, células nerviosas, células monocíticas, células madre, células de órganos (hepáticas, renales, etc...), precursores, células hematopoyéticas. Esta lista, que se da a modo de ejemplo, no es limitante.
- 25 **[0050]** Antes de la filtración, las células pueden ser enriquecidas previamente mediante un tratamiento del tipo gradiente de densidad o mediante lisis de las células que no presentan interés, o mediante métodos inmunomediados, mediante cribado positivo y negativo, mediante estimulación a la proliferación de las células buscadas, etc...
- 30 **[0051]** Esta lista no es limitante, y el experto en la materia es capaz de seleccionar el procedimiento de enriquecimiento previo adaptado a la naturaleza de las células que intenta aislar.
- [0052]** Además del tratamiento de enriquecimiento previo, la muestra de líquido que contiene células puede tratarse mediante un reactivo en función de la naturaleza de las células buscadas, para facilitar la operación de separación por filtración.
- 35 **[0053]** El tratamiento puede tener como objetivo lisar los glóbulos rojos y anticoagular la sangre si la muestra biológica contiene sangre, y consiste por ejemplo, en una adición de saponina y de EDTA.
- [0054]** El tratamiento también puede tener como objetivo fijar células nucleadas, por ejemplo con una adición de formaldehído, si la filtración pretende aislar las células fijadas. En este caso, el tratamiento tiene como objetivo hacer posible el enriquecimiento.
- 40 **[0055]** Si la filtración pretende aislar células no fijadas, la muestra biológica puede ser tratada con un reactivo y condiciones adaptadas para garantizar la rigidificación transitoria de las membranas biológicas (por ejemplo, mediante adición de polisacárido, de DMSO, mediante el frío, etc...).
- 45 **[0056]** El experto en la materia es capaz de seleccionar el método mejor adaptado, en función de la naturaleza de las células buscadas.
- [0057]** La muestra biológica que, eventualmente, ha sido diluida, enriquecida previamente o tratada con un reactivo para permitir una filtración adaptada al objetivo seguido, es filtrada a continuación a través de un filtro de policarbonato o de un material equivalente que tiene poros calibrados de un tamaño comprendido entre 1 y 100 μm y adaptado a la naturaleza de las partículas a separar. Este tamaño está, preferentemente, comprendido entre 3 μm y 25 μm , y por ejemplo de 8 μm aproximadamente, concretamente cuando se trata de aislar células tumorales o epiteliales.
- 50 **[0058]** La densidad de los poros está adaptada a la naturaleza de las partículas a separar. Preferentemente, la densidad de poros del filtro está comprendida entre 5×10^3 y 5×10^6 poros/cm² y mejor entre 5×10^4 y 5×10^5 poros/cm².
- [0059]** La filtración se realiza preferentemente mediante una presión negativa entre 0,05 bares y 1 bar, y preferentemente del orden de 0,1 bares. Eventualmente la filtración puede estar asistida por una ligera sobrepresión

del líquido situado por encima del filtro. Esta sobrepresión debe, sin embargo, seguir siendo inferior a 1 bar. Estas condiciones están particularmente adaptadas a la separación de células.

5 **[0060]** El procedimiento puede utilizarse para diferentes objetivos, por ejemplo para buscar células raras en suspensión en un líquido biológico, para permitir un diagnóstico o para depurar un líquido para permitir el análisis en buenas condiciones de los elementos en solución.

10 **[0061]** Cuando el procedimiento se utiliza para buscar células y analizarlas, después de la filtración, el filtro que ha servido para filtrar el líquido se recupera procurando que las zonas de filtración estén bien identificadas y que se pueda establecer el vínculo entre estas zonas de filtración y la muestra que ha sido filtrada. El filtro se utiliza a continuación para efectuar un análisis de las células que se han podido recuperar en las zonas de filtración.

15 **[0062]** Estos métodos de análisis, conocidos por sí mismos, son por ejemplo del tipo: tinción citológica (hematoxilina, eosina, etc...), inmunomarcado (inmunohistoquímica, inmunofluorescencia) PNA, FISH, PRINS, PCR in situ u otra técnica molecular, espectrofotometría, microdissección láser seguida por análisis moleculares dirigidos al ADN (extracción del ADN, genotipado, PCR cuantitativa, análisis de mutaciones, CGH (hibridación genómica comparada)) ARN (extracción y análisis mediante PCR de los transcritos, PCR cuantitativas) y proteínas (extracción de las proteínas, microsecuenciaciones, etc...).

20 **[0063]** Los análisis moleculares pueden realizarse en células enriquecidas retenidas en el filtro trasladadas a un portaobjetos mediante una técnica similar a la de Southern, micro-diseccionadas individualmente a partir del filtro o del portaobjetos según criterios definidos (características morfológicas de las células con o sin marcado de diferentes naturalezas) y sometidas a análisis molecular individualmente o de forma combinada.

25 **[0064]** Las células también pueden desprenderse del filtro mediante lavado con un tampón apropiado para acceder a la extracción y el análisis de sus ADN, ARN y proteínas.

30 **[0065]** Los elementos aislados por filtración son examinados a continuación al microscopio y el análisis de las imágenes obtenidas en el filtro puede realizarse de forma manual o mediante medios automatizados, en particular utilizando aparatos de análisis de imágenes.

35 **[0066]** El procedimiento también puede utilizarse para depurar un líquido biológico tal como orina que contiene en solución ADN o ARN o proteínas que se desean analizar. La depuración del líquido tiene como objetivo eliminar todas las partículas biológicas presentes en el líquido, que podrían interferir en el análisis. En este caso, los filtros no se conservan y es el líquido filtrado el que es analizado.

40 **[0067]** Este método de filtración, así como los métodos de preparación de la muestra y de análisis pueden utilizarse concretamente como se ha mencionado anteriormente con fines de diagnóstico para detectar patologías asociadas a la presencia de células particulares eventualmente en una cantidad extremadamente reducida. En particular, el procedimiento puede utilizarse para detectar células cancerosas que habrían sido liberadas en la sangre de un paciente durante una operación quirúrgica. El experto en la materia conoce las células que puede ser necesario buscar para detectar una u otra patología.

45 **[0068]** Para que estos análisis se realicen en condiciones de fiabilidad satisfactorias, concretamente en el marco de hospitales o de laboratorios de análisis médicos, es deseable que los aparatos empleados garanticen una buena reproductibilidad y una buena fiabilidad de las condiciones de ejecución de los análisis. Para hacer esto, los inventores han desarrollado dispositivos adaptados a la ejecución de estos análisis en condiciones de fiabilidad satisfactorias.

50 **[0069]** A continuación se describirán estos dispositivos.

[0070] Para realizar los análisis en condiciones satisfactorias de fiabilidad, los líquidos a filtrar son recogidos en un módulo de filtración preferentemente de un solo uso identificado generalmente mediante 1 en la figura 1 y que se montará sobre un bloque de soporte identificado generalmente mediante 2, que forma parte de la máquina de filtración (que no está representada en su conjunto en la figura).

[0071] El módulo de filtración 1 está colocado sobre el bloque de soporte para realizar la filtración. Cuando la filtración ha terminado, el módulo de filtración 1 es retirado del bloque de soporte 2 y el filtro que está contenido en el módulo de filtración es retirado para poder realizar análisis como se explicará más adelante.

[0072] El módulo de filtración 1, representado en forma de despiece ordenado en la figura 2, está constituido por un apilamiento que comprende, de arriba hacia abajo, un bloque de depósito 11, una junta estriada 12, un filtro 13, una junta de placa 14 y un cajón de soporte de filtro 15.

5

[0073] El filtro 13 está apoyado contra la cara inferior 110 del bloque de depósito 11 por medio del cajón de soporte de filtro 15, estando la estanqueidad entre el filtro 13 y el bloque de depósito 11 garantizada por la junta estriada 12, y estando la estanqueidad entre el filtro 13 y el cajón de soporte de filtro 15 garantizada por la junta de placa 14.

10

[0074] Cuando el conjunto está montado, el cajón de soporte filtro es mantenido en posición contra el bloque de depósito 11 por medio de dos ejes de ensamblaje 16 que pasan a través de los agujeros 151 del cajón de soporte de filtro y se enganchan en agujeros 112 previstos en un reborde inferior 111 del bloque de depósito 11, que se extiende hacia el exterior.

15

[0075] El bloque de depósito 11, de material plástico, consta de un cuerpo 114 dividido en dos compartimentos 113 abiertos en su parte superior 115 y cerrados en su parte inferior por un fondo 116 que consta de una pluralidad de aberturas circulares 117 de diámetro comprendido entre 0,6 cm y 2 cm. El fondo consta, además, de un reborde 111 que forma un collarín en los que están previstos, en las dos partes laterales del bloque de depósito, aberturas 112 que recibirán los ganchos de los ejes de ensamblaje 16. Los compartimentos 113 pueden estar cerrados en su parte superior por tapones amovibles 17. Los extremos de empalme del fondo y de las paredes de cada compartimento son redondeados para no crear ninguna zona de retención de partículas a filtrar.

20

[0076] Como puede verse en la figura 3B, los compartimentos 113 pueden constar de ranuras verticales 118 que recibirán a portaobjetos de separación 119 que permiten dividir los compartimentos 113 en compartimentos parciales de menor volumen. Las ranuras 118 están dispuestas de tal manera que los eventuales portaobjetos de separación 119 estén siempre dispuestos entre dos aberturas circulares 117.

25

[0077] Para garantizar una filtración adaptada, el volumen de los compartimentos es proporcional al número de aberturas circulares 117, de modo que el volumen total del compartimento o más exactamente la cantidad de líquido máxima que puede recibir el compartimento esté comprendida entre 0,14 ml/cm² y 40 ml/cm² multiplicado por la suma de las superficies de las aberturas de que consta el fondo del compartimento. En particular, la altura del compartimento y la sección del fondo es tal que no solamente estas condiciones son respetadas para un compartimento completo sino también para que sean respetadas por cualquier compartimento parcial delimitado por medio de una o de varias paredes amovibles de separación 119 estancas. En particular, cuando una abertura 117 está aislada por dos paredes amovibles 119, o por una pared amovible 119 y por la pared del compartimento, de modo que conste solamente de una abertura 117 en el fondo, el volumen situado por encima de la abertura 117 está adaptado para recibir como máximo 20 ml de líquido a filtrar. A modo de ejemplo, cada compartimento puede tener un volumen de 110 ml y constar de 5 aberturas en el fondo.

30

35

40

[0078] En una variante representada en la figura 8, el bloque de depósito 11 comprende un compartimento 113, que consta de cinco zonas elementales de filtración, un compartimento 113A que consta de una zona elemental de filtración y dos compartimentos 113B que constan de dos zonas elementales de filtración. Cada compartimento comprende un tapón amovible 17, 17A, 17B. Se observará que con esta disposición, es posible seleccionar el número de zonas elementales de filtración utilizadas entre 1 y 10.

45

[0079] En su cara inferior 110, el bloque de depósito consta de dos agujeros de diámetros diferentes (no visibles en la figura) dispuestos en diagonal, que cooperarán con espigas 153A y 153B del cajón de soporte de filtro 15, para garantizar el posicionamiento preciso y la localización de la posición del filtro con respecto al fondo del bloque de depósito.

50

[0080] La junta estriada 12 dispuesta justo por debajo del bloque de depósito es una junta de silicona moldeada que consta de una pluralidad de agujeros 121 que se situarán en frente de las aberturas 117 previstas en el fondo del bloque de depósito, estando estos agujeros 121 rodeados por labios 122, y preferentemente por dos labios, circulares que garantizarán una buena estanqueidad. La junta puede constar, además, de nervaduras longitudinales 123 de separación de una primera serie de agujeros y de una segunda serie de agujeros, para garantizar la separación entre los agujeros que están en frente de un primer compartimento y los agujeros que están en frente del segundo compartimento del bloque de depósito. Esta junta tiene la función de garantizar una perfecta estanqueidad entre cada uno de los agujeros de forma que el líquido que pasa a través de un agujero no pueda

55

mezclarse con el líquido que pasa por otro agujero, lo que permite filtrar simultáneamente dos líquidos diferentes. Los labios sobresalientes 122, y eventualmente 123, están dispuestos en la cara 124 de la junta que cooperará con la parte inferior del bloque de depósito 11. La segunda cara 125 de la junta, que cooperará con el filtro 13, es plana.

5 **[0081]** El filtro 13, que constituye una plaquita de forma general rectangular y que es plana, consta de una zona central de filtración 131 constituida por una membrana de policarbonato microporosa de 100 µm de grosor aproximadamente y que tiene una porosidad adaptada al procedimiento. Esta parte central está fijada con ayuda de una cola biológica a un marco 132 de PVC que puede utilizarse para sujetar la plaquita y para llevar en ella inscripciones de referencia. El marco 132 consta de medios de posicionamiento y de localización de la orientación
10 de la plaquita constituidos por dos agujeros 133A y 133B dispuestos en diagonal en la plaquita y que tienen diámetros diferentes y que cooperarán con las espigas 153A y 153B del soporte de filtro. Con esta disposición de los agujeros de localización 133A y 133B, una sola orientación es posible para disponer la plaquita sobre un soporte que consta de espigas de localización complementarias a los agujeros 133A y 133B. Esto permite de localizar de forma muy exacta la orientación de la plaquita, por un lado, cuando está dispuesta en el módulo de separación y, por otro
15 lado, cuando está dispuesta en un aparato de análisis tal como un equipo de tinción o de lectura en un microscopio.

[0082] En una variante representada en la figura 9, la plaquita consta de dos zonas de filtración centrales 131A, 131B, paralelas entre sí y que pueden constar de membranas de porosidades diferentes.

20 **[0083]** La junta de placa 14 es una junta de placa plana de silicona que consta de aberturas circulares 140 que corresponden a las aberturas 121 de la junta estriada y a las aberturas 117 previstas en el fondo del bloque de depósito. Ésta consta también de agujeros 141A y 141B de diámetros diferentes que corresponden a los agujeros 133A y 133B del filtro.

25 **[0084]** El cajón de soporte de filtro 15 es una placa de material plástico inyectado que consta de una cara superior 150 que sujetará al conjunto del filtro y las juntas contra la cara inferior 110 del bloque de depósito 11. Esta placa soporte de filtro consta de una serie de agujeros 152 que se situarán en frente de los agujeros correspondientes 140 de la junta de placa, 121 de la junta estriada y 117 del bloque de depósito.

30 **[0085]** La cara superior 150 del cajón de soporte de filtro consta, además, de espigas 153A y 153B que cooperarán con los agujeros de señalización 133A y 133B de la plaquita de filtro 13, con los agujeros correspondientes 141A y 141B de la junta de placa 14 y con los agujeros de centrado previstos en la cara inferior 110 del bloque de depósito.

35 **[0086]** Como puede verse en la figura 5B, los agujeros 152 que dejarán pasar el líquido filtrado constan de una parte superior en forma de embudo que se prolonga mediante pequeños tubos 154 sobresalientes en la cara inferior 155 del cajón de soporte de filtro 15. Los pequeños tubos 154 sobresalientes con respecto a la cara inferior 155 del cajón de soporte de filtro tienen como función garantizar un correcto flujo del líquido después de la filtración para no formar gotas que mojarán la cara inferior del soporte de filtro. Se observará que el diámetro de la parte
40 superior de los agujeros 152, del mismo modo que los diámetros de los agujeros 140 de la junta de placa y 151 de la junta estriada, son prácticamente iguales al diámetro de los agujeros 117 previstos en el fondo del bloque de depósito, para delimitar en el filtro zonas de filtración elementales de diámetro correspondiente. La placa cajón de soporte de filtro 15 consta, además, en sus dos bordes laterales de agujeros 151 que recibirán a los ejes de ensamblaje 16. Estos agujeros tienen formas adaptadas para poder introducir los ejes de ensamblaje y bloquear el
45 conjunto en posición cuando se garantiza el montaje del conjunto del módulo de filtración.

[0087] Los ejes de ensamblaje 16 constan, cada uno, de un cabeza 161 coronada por una varilla 162, de diámetro más pequeño, cuyo extremo constituye un gancho 163. La longitud del eje de ensamblaje está adaptada para permitir el bloqueo del apilamiento constituido por el cajón de soporte de filtro, por las juntas y por el filtro
50 cuando está apoyado contra el bloque de depósito. De este modo, un eje de ensamblaje tiene una longitud suficiente para que, cuando se introduce en un agujero 151 del cajón de soporte de filtro, pueda penetrar en el agujero 112 del reborde inferior del bloque de depósito 11, de modo que el gancho 163 situado en el extremo del eje de ensamblaje pueda engancharse en la superficie superior del reborde 111 del bloque de depósito, cooperando la cabeza 161 del eje de ensamblaje 16 con la cara inferior del cajón de soporte de filtro 15 para mantener bloqueado al cajón de
55 soporte de filtro contra el fondo del bloque de depósito 11.

[0088] El módulo de filtración, tal como se acaba de describir, estará dispuesto sobre un bloque de soporte 2 de módulo de filtración que consta, por un lado, de una cara de apoyo 200 que consta de una abertura central 201 que se situará en frente del conjunto de las aberturas de la cara inferior de un bloque de filtración, por otro lado de

una palanca 202 que pivota alrededor de un eje 203 que manejará dos excéntricos 204 (uno solo visible en la figura) que garantizarán una buena sujeción de la parte inferior del módulo de filtración contra la superficie 200 del bloque de soporte, y garantizarán del mismo modo una buena sujeción del bloque de depósito 11 contra el cajón de soporte de filtro 15 durante las operaciones de filtración.

5

[0089] En una variante preferida, representada en la figura 8, el reborde inferior 111 del bloque de depósito y, eventualmente el cajón de soporte de filtro 15, constan en un extremo, de una parte ensanchada 114 que cooperará con una parte ensanchada 203 de la corredera 204 del bloque de soporte 2 que recibirá a la base del módulo de filtración. Esta disposición permite imponer una orientación del módulo de filtración con respecto al bloque de soporte.

10

[0090] Cuando el módulo de filtración 1 está dispuesto en el bloque de soporte 2, los excéntricos están en frente del reborde 111 del bloque de depósito 11, de modo que, cuando la palanca está en una posición de apertura, los excéntricos dejan espacio en el reborde 111 para deslizarse sobre la cara superior 200 del bloque de soporte, y cuando la palanca está en posición de sujeción, los excéntricos se apoyarán fuertemente sobre el reborde 111 del bloque de depósito 11, para sujetar al conjunto constituido por el bloque de filtración, el filtro, el soporte de filtro, así como las juntas asociadas, contra la cara 200 del soporte de módulo de filtración.

15

[0091] Además, cada excéntrico consta de una paleta 205 sobresaliente hacia el exterior que, en el momento de la sujeción del reborde del módulo de filtración cooperará con el extremo del eje de ensamblaje 16 correspondiente, para romper el gancho de modo que, cuando la sujeción completa está garantizada, el gancho del eje de ensamblaje esté roto. Debido a esta última disposición, cuando el módulo de filtración está sujeto contra el bloque de soporte 2 por medio del excéntrico, el conjunto está sujeto por la sujeción, mientras que, después del aflojamiento del excéntrico, estando rota la cabeza del gancho, el bloque de soporte de filtro y el bloque de depósito ya no están unidos como se representa en la figura 7. Esto permite extraer el filtro, y al mismo tiempo, hace al módulo de filtración inutilizable para otro análisis. De este modo, el módulo de filtración es de un solo uso.

25

[0092] También se puede utilizar un bloque que no comprende ganchos divisibles. Dicho bloque puede utilizarse a continuación para un uso repetido, lo que es menos fiable que el uso único, pero que, no obstante, puede presentar interés en algunos casos.

30

[0093] Antes de cualquier utilización, el módulo de filtración está cerrado mediante tapones superiores y esterilizados. Cuando se desea realizar una filtración de una muestra con fines de análisis, se toma un módulo de filtración esterilizado que se dispone sobre un bloque de soporte de una máquina de filtración. Con ayuda de la palanca de sujeción, se bloquea el módulo de filtración en la máquina de filtración garantizando una buena sujeción de la placa de soporte de filtro contra el fondo del bloque de depósito. Haciendo esto y cuando el módulo es de un solo uso, se rompen los extremos que constan de ganchos de los ejes de ensamblaje. Se abre a continuación al menos uno de los compartimentos en el que se introduce el líquido a filtrar de modo que, en cada compartimento, la relación de cantidad de líquido contenido con la suma de las superficies de las aberturas del fondo del compartimento esté comprendida entre 0,14 y 40 ml/cm². Se realiza a continuación la filtración. Una vez realizada la filtración, se desbloquea el sistema volviendo a levantar la palanca de sujeción, y se retira el módulo de filtración.

35

40

[0094] En este módulo de filtración, la parte inferior constituida por la placa de soporte de filtro está separada del bloque de depósito. Se separa a continuación el conjunto y a continuación se extrae el filtro que se dispone sobre la platina de un microscopio de observación, eventualmente después de realizar cierto número de preparaciones con ayuda de reactivos para poder observar convenientemente las células que eventualmente han sido retenidas por el filtro.

45

[0095] El resto del dispositivo a saber el depósito, el soporte de filtro y la junta se tira a continuación a la basura para no reutilizarlo. Este dispositivo de un solo uso presenta la ventaja de garantizar una buena seguridad de análisis. En efecto, el mismo dispositivo solamente se utiliza para el análisis de una única extracción, lo que evita cualquier riesgo de contaminación de una extracción con extracciones anteriores que habrían sido analizadas con ayuda del mismo dispositivo. Además, debido a las características geométricas particulares a la vez de los agujeros dispuestos en el fondo del depósito y de los tamaños del depósito, las cantidades de líquido filtrado por el dispositivo están adaptadas para que las cantidades filtradas en cada una de las zonas elementales de filtración del filtro respondan a las condiciones impuestas por el procedimiento para obtener resultados fiables.

55

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para buscar células raras en suspensión en una muestra de un líquido biológico, para permitir un diagnóstico, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 a) tratamiento de una muestra de un líquido biológico para lisar células que no presentan interés;
- b) filtración vertical de la muestra tratada obtenida de la etapa a) a través de un filtro que comprende poros calibrados de un tamaño comprendido entre $3\ \mu\text{m}$ y $100\ \mu\text{m}$ y una densidad de poros comprendida entre 3×10^3 y 5×10^6 poros/cm², comprendiendo dicho filtro al menos una zona elemental de filtración, teniendo cada zona elemental de filtración una superficie igual a la de un disco que tiene un diámetro comprendido entre 0,6 cm y 3 cm, y estando el número de zonas elementales de filtración seleccionado para que la relación del volumen de líquido a filtrar y de la suma de las superficies de las zonas elementales de filtración, esté entre 0,14 y 40 ml/cm²; y
- 10 c) análisis de las células que pudieron recuperarse en cada zona elemental de filtración del filtro que sirvió para filtrar la muestra.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada zona elemental de filtración tiene una superficie igual a la de un disco que tiene un diámetro superior o igual a 0,8 cm.
- 20 3. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que la etapa de filtración se efectúa mediante una presión negativa comprendida entre 0,05 bares y 1 bar con, eventualmente, una sobrepresión inferior a 1 bar.
- 25 4. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el líquido biológico es sangre y los poros calibrados del filtro tienen un tamaño comprendido entre $5\ \mu\text{m}$ y $25\ \mu\text{m}$.
5. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el líquido biológico es orina y los poros calibrados del filtro tienen un tamaño comprendido entre $8\ \mu\text{m}$ y $100\ \mu\text{m}$.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que, durante la etapa de análisis, las células retenidas en el filtro son trasladadas a un portaobjetos.
7. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que siendo el líquido biológico sangre, el tratamiento de la etapa a) consiste en lisar glóbulos rojos de la sangre y en anticoagular la sangre.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que la etapa a) comprende además la adición de saponina y de EDTA al líquido biológico para lisar los glóbulos rojos de la sangre y anticoagular la sangre.
- 40 9. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la etapa a) consta además de la fijación de las células nucleadas.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, en el que la fijación de células nucleadas se realiza mediante la adición de formaldehído al líquido biológico.
- 45 11. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicho procedimiento comprende además una etapa para la determinación del volumen de la muestra de líquido biológico a filtrar, y una etapa de división de un compartimento de un módulo de filtración en compartimentos parciales de volumen más pequeño y tal que la relación del volumen del líquido biológico en cada compartimento parcial con la suma de las superficies de las zonas elementales de filtración asociadas a dicho compartimento parcial está entre 0,14 ml/cm² y 40 ml/cm².
- 50 12. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que en la etapa c), el análisis de las células recuperadas en las zonas elementales de filtración durante la etapa b) se realiza mediante tinción citológica, inmunomarcado, FISH, PRINS, PCR *in situ*, espectrofotometría, o microdissección láser seguida de análisis moleculares dirigidos al ADN, ARN o proteínas.
13. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado porque** durante la etapa c), las células recuperadas se desprenden del filtro mediante lavado con un tampón apropiado, y a continuación se someten a análisis del ADN, ARN o proteínas.

14. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que cada zona elemental de filtración tiene una superficie igual a la de un disco de diámetro comprendido entre 0,8 cm y 1,5 cm.
- 5 15. Módulo de filtración (1) para la implementación del procedimiento definido por una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, del tipo que comprende:
- un bloque de depósito (11) que comprende al menos un compartimento (113) cerrado en su parte inferior por un fondo (116) que consta al menos de una abertura (117);
 - 10 - un cajón de soporte de filtro (15) que comprende al menos un agujero (152), estando cada agujero dispuesto en frente de una abertura (117) del bloque de depósito;
 - un filtro (13) sujeto entre la cara inferior (110) del bloque de depósito y el cajón de soporte,
 - 15 **caracterizado porque** dicho filtro comprende poros calibrados de un tamaño comprendido entre 3 μm y 100 μm y una densidad de poros comprendida entre 3×10^3 y 5×10^6 poros/cm², **porque** las dimensiones de cada abertura (117) del fondo del bloque de depósito y las dimensiones de cada agujero (152) del cajón de soporte de filtro están adaptadas para que cada par constituido por una abertura del fondo del bloque de depósito y por el agujero del
 - 20 cajón de soporte de filtro asociado, defina una zona de filtración elemental de superficie limitada, **porque** el volumen útil de cada compartimento es proporcional al número de zonas elementales de filtración situadas en el fondo del compartimento, **porque** la superficie de una zona elemental de filtración es igual a la de un disco que tiene un diámetro comprendido entre 0,6 cm y 3 cm, y **porque** la relación del volumen útil de cada compartimento (113) con la suma de las superficies de las zonas elementales de filtración está entre 0,14 ml/cm² y 40 ml/cm²,
 - 25 y **porque** al menos un compartimento (113) puede dividirse en compartimentos parciales mediante al menos una pared de separación amovible (119), de modo que al menos un compartimento parcial conste en su fondo de al menos una abertura, estando la relación del volumen de dicho compartimento parcial con la suma de las superficies de las aberturas de que consta el fondo del compartimento parcial entre 0,14 ml/cm² y 40 ml/cm².
 - 30 16. Módulo de filtración según la reivindicación 15, en el que las dimensiones de al menos una abertura (117) del fondo del bloque de depósito y de un agujero correspondiente (152) del cajón de soporte de filtro están adaptadas para que la superficie de la zona elemental de filtración correspondiente sea superior o igual a la de un disco de 0,8 cm de diámetro.
 - 35 17. Módulo de filtración según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 16, que comprende, además, una junta de estanqueidad estriada (12) dispuesta entre el fondo (110) del bloque de depósito (11) y el filtro (13), que consta al menos de un agujero (121) correspondiente a un agujero (117) del fondo del bloque de depósito, estando el agujero rodeado por al menos un labio (122) sobresaliente.
 - 40 18. Módulo de filtración según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, que comprende, además, entre el filtro (13) y el soporte de filtro (15), una junta de placa (14) que consta al menos de una abertura (140) en frente de un agujero (152) del soporte de filtro (15).
 - 45 19. Módulo de filtración según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en el que el filtro (13) constituye una plaquita cuya parte central consta al menos de una zona porosa (131, 131A, 131B) y cuya periferia constituye un marco (132) que consta de medios de indexación de su posición en el soporte de filtro.
 - 20. Módulo de filtración según la reivindicación 19, en el que los medios de indexación son al menos dos
 - 50 agujeros (133A, 133B) de diámetros diferentes que cooperarán con espigas (153A, 153B) de diámetros correspondientes previstas en el soporte de filtro (15).
 - 21. Módulo de filtración según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 20, que consta, además, de al menos, un tapón (17) para el cierre de la abertura superior de un compartimento (113).
 - 55 22. Módulo de filtración según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 21, **caracterizado porque** el bloque de depósito (11) consta, en su parte inferior, de un reborde (111) que se extiende hacia el exterior y que coopera con al menos un eje de ensamblaje (16) que permite sujetar el filtro (13) entre el soporte de filtro (15) y el bloque de depósito (11), constando el eje de ensamblaje (16) de un extremo divisible (163) que se extiende por

encima del reborde del bloque de depósito.

23. Módulo de filtración según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 22, en el que todas sus piezas están constituidas por materiales adaptados a una operación de esterilización o que les dejará libres de ARNasa, 5 ADNasa o proteinasa.

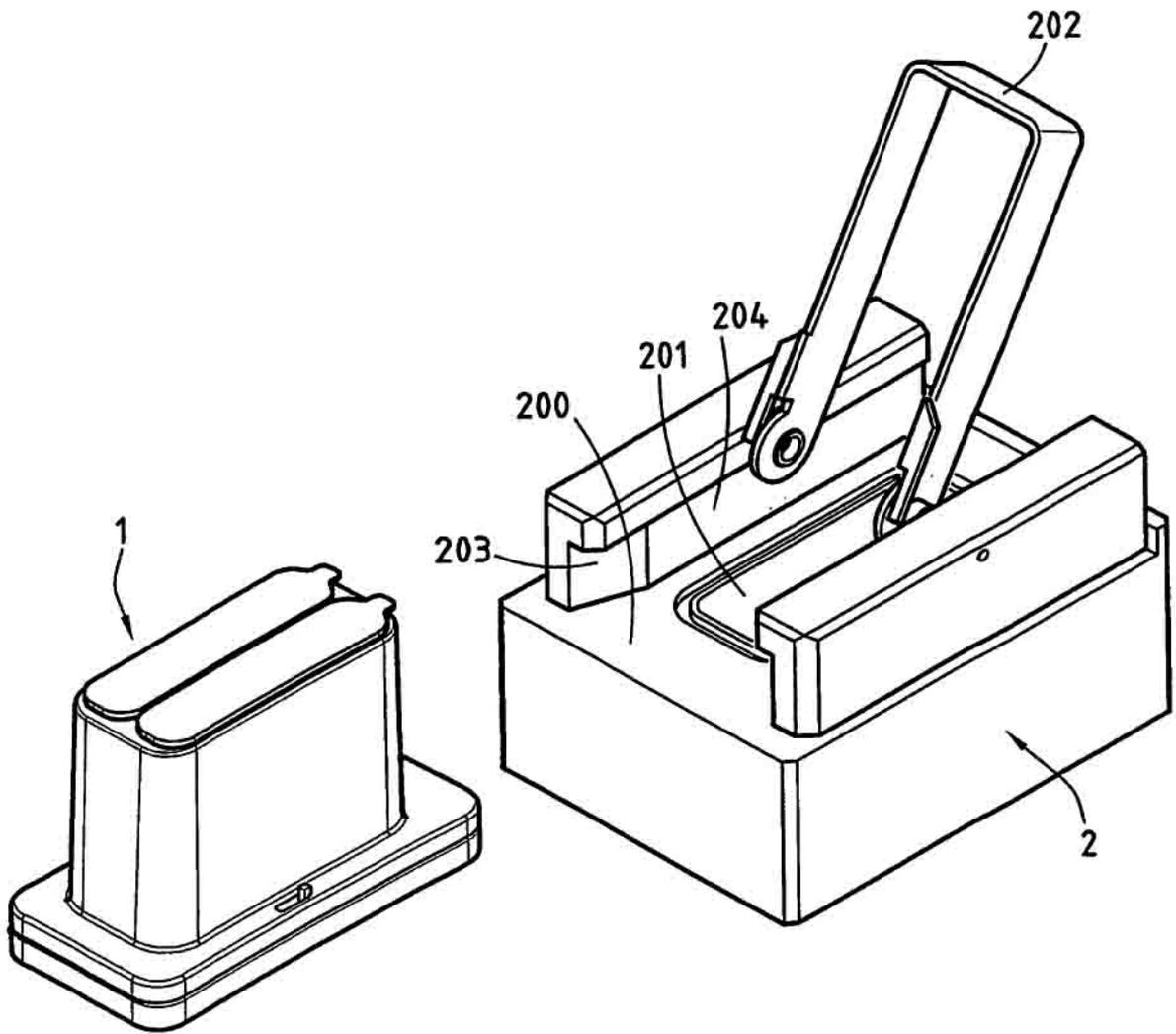


FIG.1

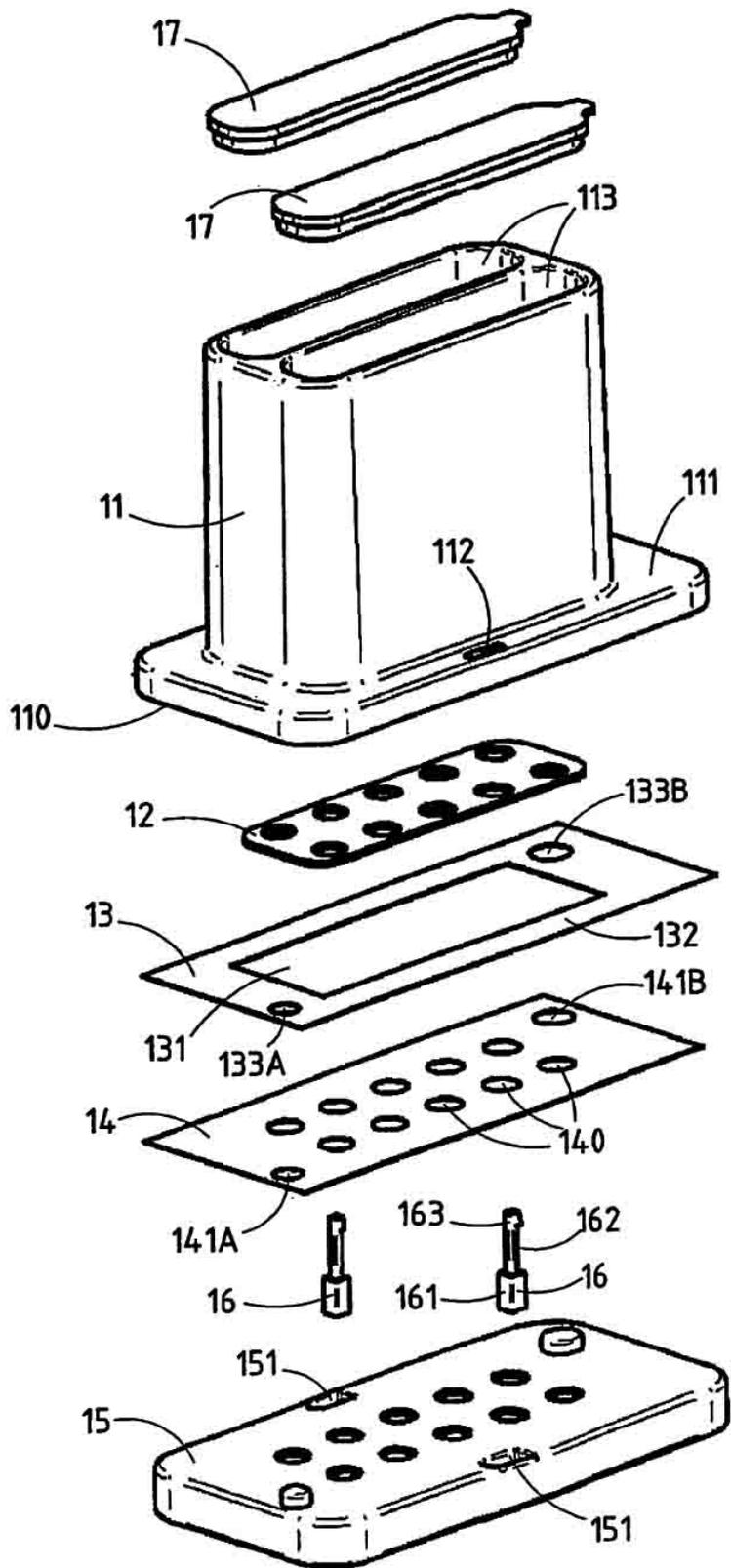


FIG.2

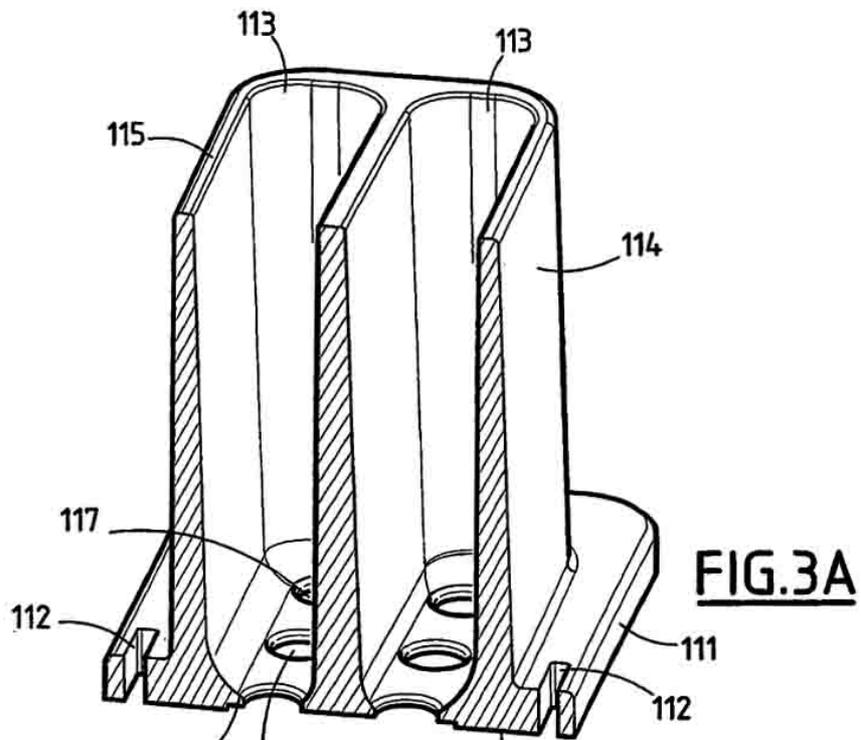


FIG.3A

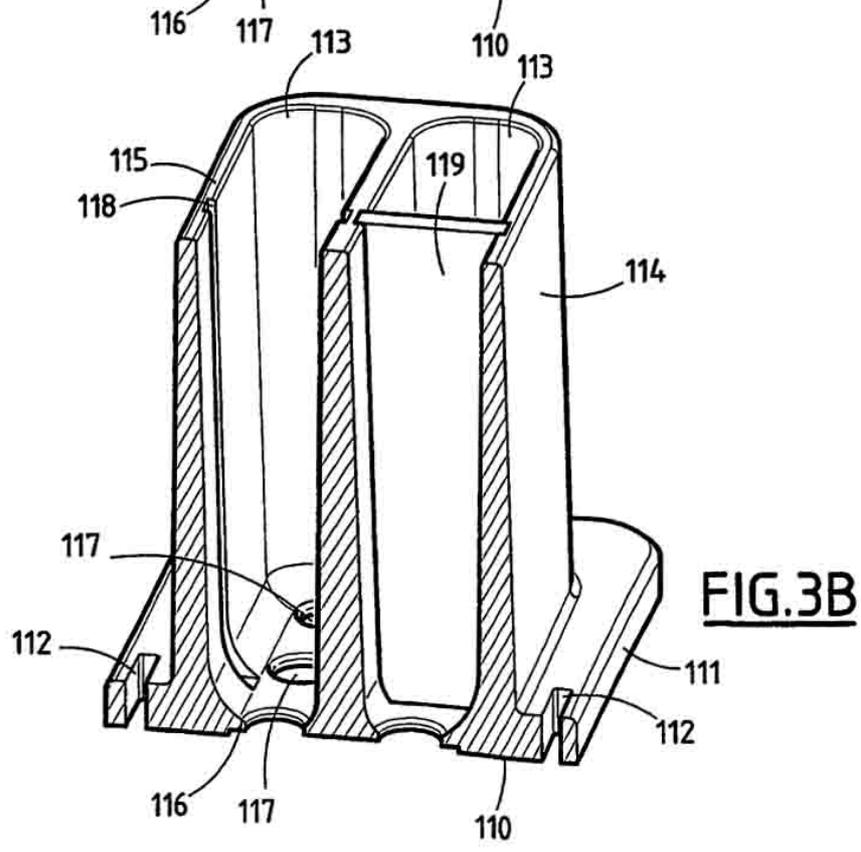
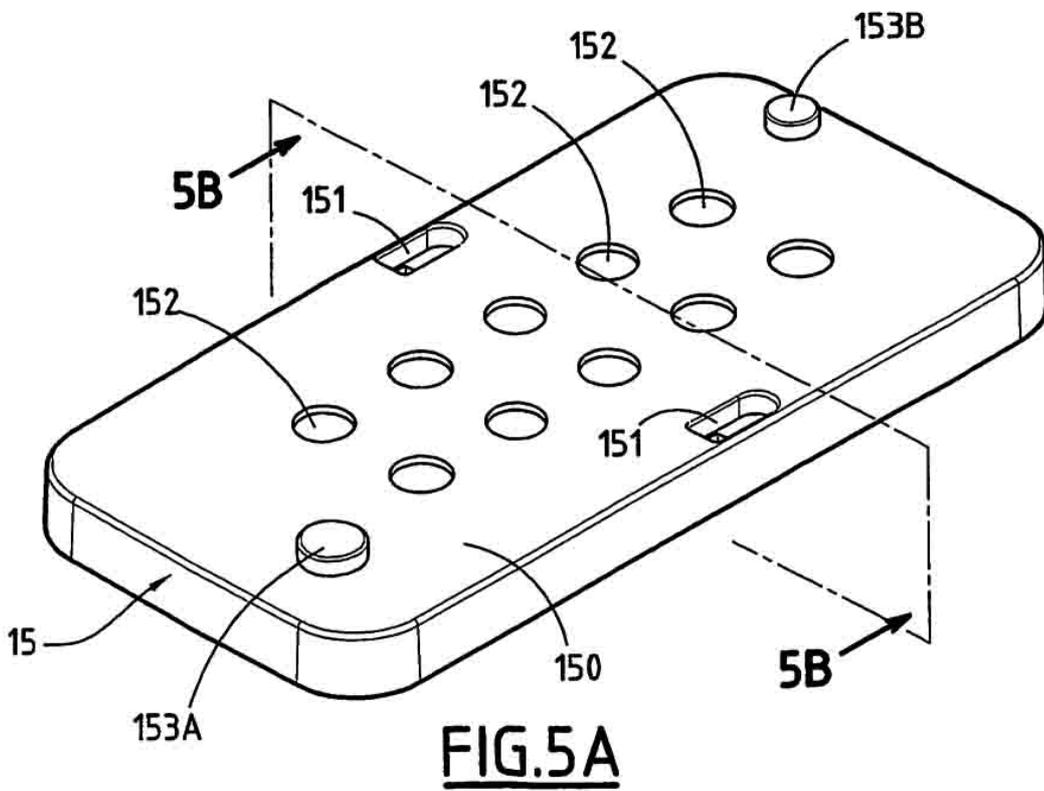
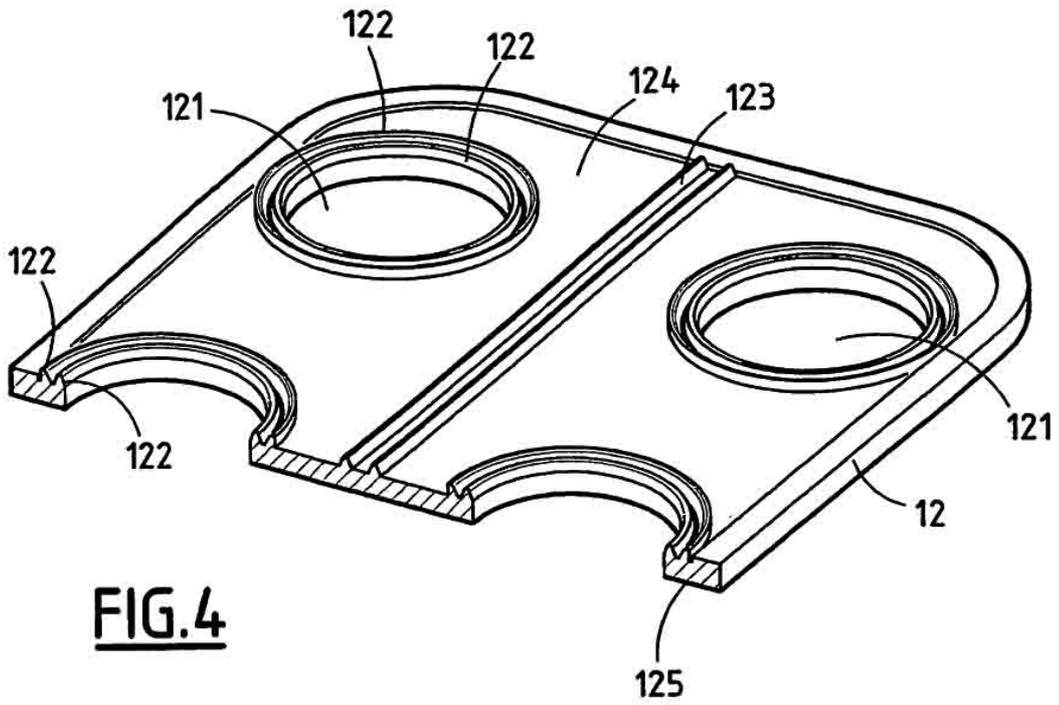
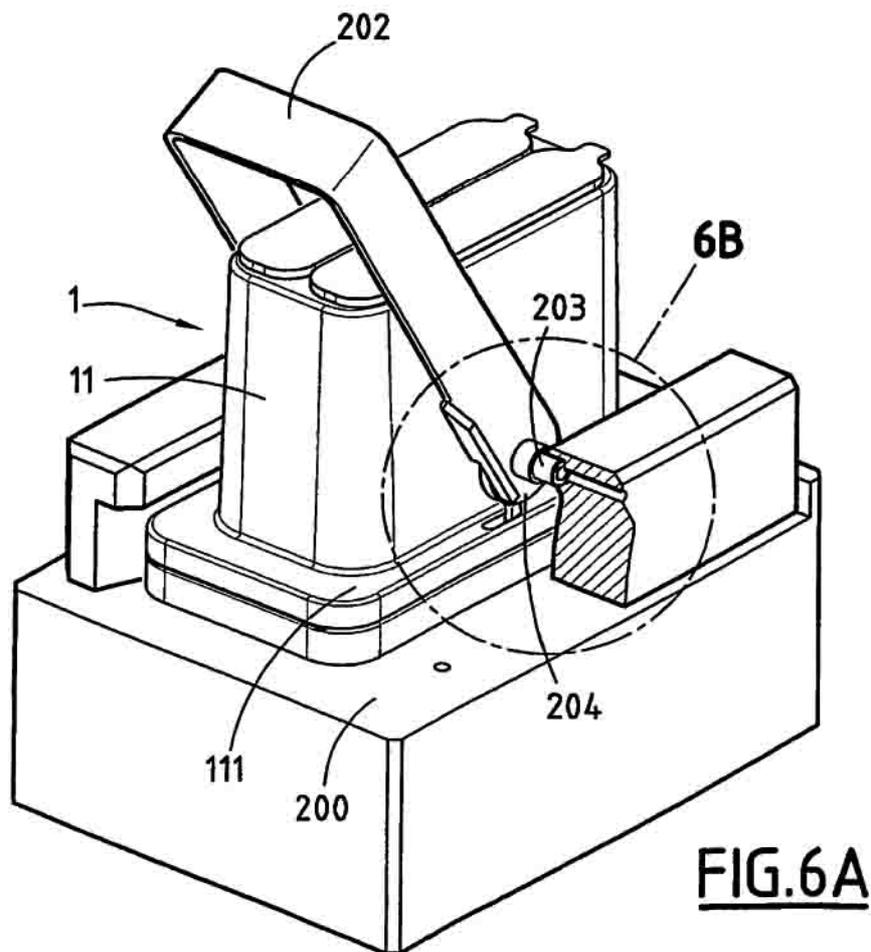
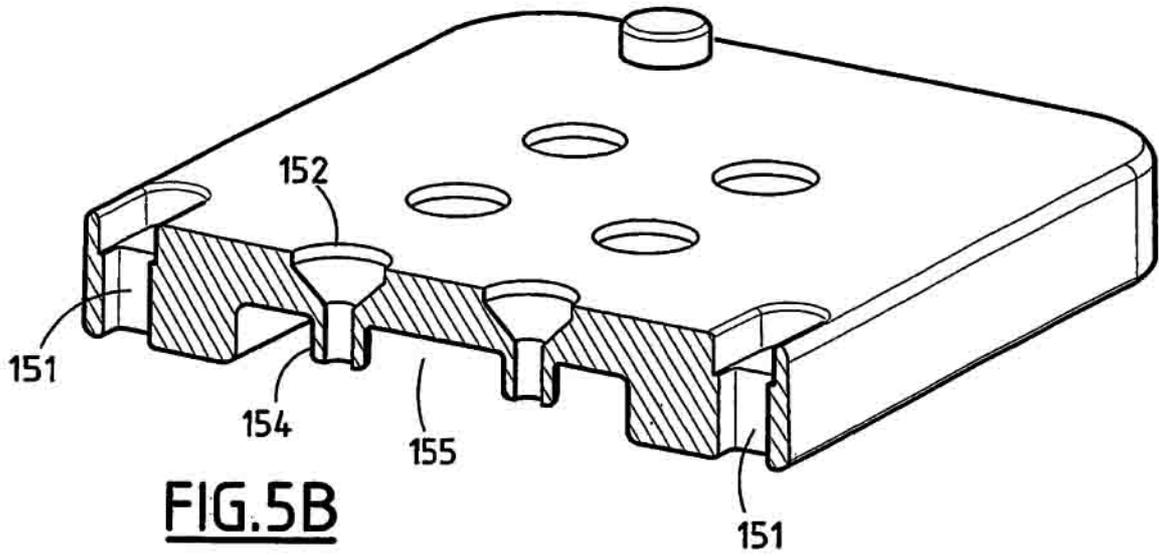


FIG.3B





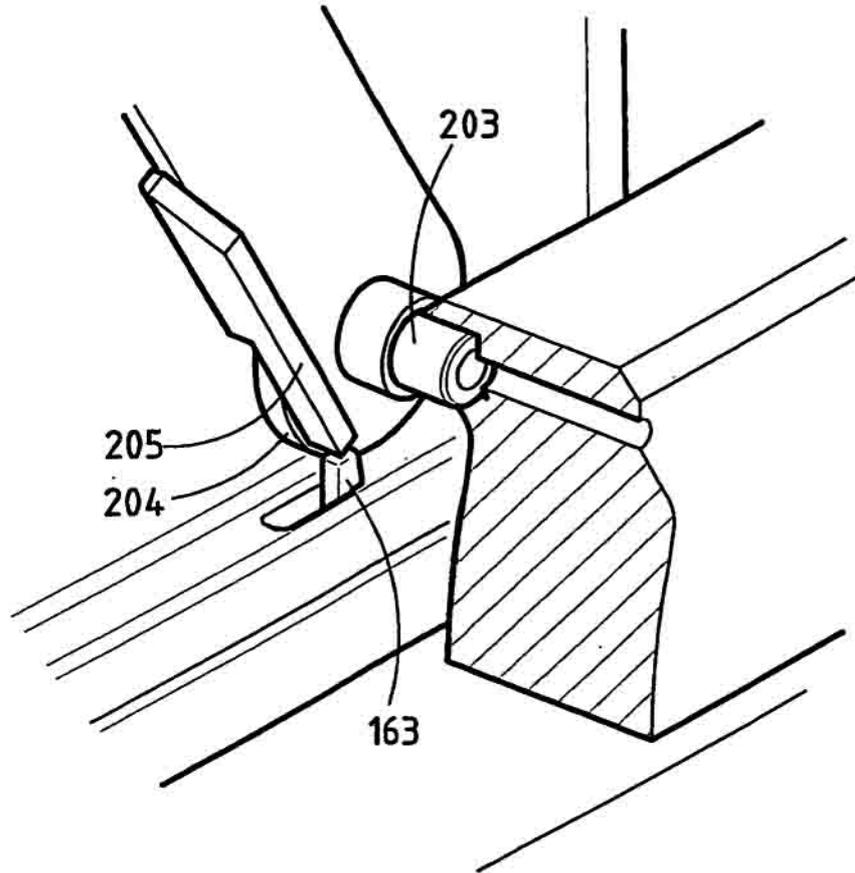


FIG.6B

