

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 664 831**

51 Int. Cl.:

<b>B01L 3/00</b>	(2006.01)
<b>B01D 63/08</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/28</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/40</b>	(2006.01)
<b>G01N 15/10</b>	(2006.01)
<b>G01N 1/04</b>	(2006.01)
<b>G01N 33/50</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.04.2012 PCT/EP2012/056872**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12159822**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.04.2012 E 12714701 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2696956**

54 Título: **Disposición y procedimiento para el análisis óptico y el aislamiento específico de muestras biológicas**

30 Prioridad:

**20.05.2011 DE 102011076238**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.04.2018**

73 Titular/es:

**SIEMENS HEALTHCARE GMBH (100.0%)  
Henkestraße 127  
91052 Erlangen, DE**

72 Inventor/es:

**GUMBRECHT, WALTER;  
BANGERT, JOACHIM;  
FRIEDRICH, KATJA;  
HILTAWSKY, KARSTEN;  
PAULICKA, PETER y  
STANZEL, MANFRED**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

ES 2 664 831 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

Disposición y procedimiento para el análisis óptico y el aislamiento específico de muestras biológicas.

La presente invención hace referencia a un procedimiento para detectar células en una muestra líquida, así como a una disposición que puede utilizarse para realizar el procedimiento.

5 La microscopía es un medio ampliamente difundido en la analítica. En particular en las ciencias "Life-Science" representa una herramienta imprescindible, por ejemplo para caracterizar tejido y células. Como "interfaz" entre el medio que debe ser analizado y los componentes de un microscopio relacionados con la imagen se establece el portaobjetos. Éste se trata de plaquitas de vidrio de 26 x 76 mm (ISO 8255-2) y de un grosor de 1 a 1,5 mm. Los objetos se aplican sobre el portaobjetos por ejemplo en una capa delgada (corte de tejido, película de líquido) y en la mayoría de los casos se cubren con un cubreobjetos. La técnica de filtración es también una técnica de laboratorio muy difundida, en particular para la separación de cuerpos sólidos de diferente tamaño, así como de líquidos.

10 En caso de combinar microscopía y técnica de filtración, después del proceso de filtración, el producto de la filtración se analiza mediante técnica microscópica. Para ello, el medio de filtro, por ejemplo la membrana de filtración, debe extraerse del aparato de filtración y colocarse sobre el portaobjetos. Ese proceso, en particular en el caso de membranas más delgadas (por ejemplo con un grosor de 10 mm y un diámetro de 25 mm), exige una habilidad experimental elevada e implica una gran inversión de tiempo. Si ese proceso debe aplicarse de forma habitual y de forma conveniente en cuanto a los costes, por ejemplo en el diagnóstico médico, por ejemplo en el análisis de células tumorales que fueron filtradas desde una muestra de sangre, debe entonces desarrollarse una solución económica que también pueda ser realizada por personal no capacitado. En particular un aislamiento de células individuales seleccionadas, por ejemplo células tumorales circulantes (circulating tumor cells mCTCs) o de las uniones de células para un análisis consecutivo de diagnóstico molecular, tendrá en el futuro cada vez una mayor importancia debido a los progresos científicos en ese campo.

15 Por ese motivo, el objeto de la presente invención consiste en proporcionar una disposición y un procedimiento para el análisis óptico y el aislamiento específico de muestras biológicas, los cuales puedan utilizarse en métodos estándar de elevada calidad, se estructuren de forma sencilla, puedan manejarse de forma sencilla, así como sean convenientes en cuanto a los costes. En particular, el objeto de la presente invención consiste en proporcionar una disposición y un procedimiento para el análisis óptico y el aislamiento específico de muestras biológicas, los cuales sean muy adecuados para un análisis microscópico consecutivo. De este modo, la disposición puede utilizarse en aparatos estándar con soportes estándar, por ejemplo para poder realizar análisis mediante microscopía óptica o microscopía por fluorescencia de forma simple y económica, en el producto de la filtración. Un objeto consiste en particular en posibilitar el uso en la obtención y el análisis de células tumorales (circulantes) (CTC).

20 La invención hace referencia a un procedimiento según la reivindicación 1 y a una disposición según la reivindicación 11. La solicitud US 3,731,806 (McCORMICK), del 8 de mayo de 1973, puede considerarse como el estado del arte más próximo.

25 En un proceso de filtración en el sentido de la invención, una suspensión se filtra a través de un filtro, por ejemplo una membrana de filtro. De este modo, permeato es presionado a través del filtro y concentrado es retenido sobre la superficie del filtro (o también en los poros y cavidades del filtro). Durante el proceso de filtrado, por tanto, existe una dirección de flujo dominante del permeato a través del filtro, de modo que puede hablarse de un área aguas arriba del filtro, en donde es retenido el concentrado (el cual como componente esencial contiene las células), y un área aguas abajo, en donde el permeato pasa de forma forzada, por ejemplo acumulándose allí. Independientemente de esa dirección de flujo dominante, en casos excepcionales, la dirección de flujo también puede invertirse, por ejemplo en el caso de una limpieza del filtro. Para presionar el permeato a través del filtro puede generarse una diferencia de presión, donde aguas arriba del filtro existe una presión más elevada que aguas abajo. Esto puede lograrse a través de la aplicación de una sobrepresión aguas arriba del filtro, de la aplicación de una presión negativa aguas abajo o de una combinación de ambos. Para detener el flujo de permeato a través del filtro (reducirlo a cero), puede regularse una diferencia de presión de cero. Esto no depende de la orientación del filtro en el espacio. Para el caso especial de que la dirección de flujo en el filtro se extienda de forma vertical o de que se extienda un componente vertical (por tanto en la dirección o en contra de la fuerza de gravedad terrestre), debe considerarse además que la columna de agua en el filtro contribuye a la diferencia de presión. Para algunas aplicaciones del procedimiento de acuerdo con la invención se considera preferente que la dirección de flujo de la filtración en el filtro se extienda esencialmente en la dirección de la fuerza de gravedad terrestre. Debido a ello, concentrado retenido alcanza la superficie del filtro, lo cual posibilita por ejemplo un procesamiento posterior sencillo del concentrado (de las células). Para aplicaciones determinadas puede ser preferente filtrar no en dirección de la fuerza de gravedad terrestre, sino en contra de la fuerza de gravedad terrestre, por ejemplo cuando el concentrado flota, o para acumular células en un recipiente colector después del filtrado, desde el lado inferior del filtro. La invención hace referencia a un procedimiento para detectar células en una muestra líquida, el cual presenta los siguientes pasos:

- 5 i) filtración de la muestra líquida a través de una membrana porosa que es adecuada para retener células que deben ser detectadas, donde al menos una subárea de un soporte está diseñada como un cuerpo de apoyo transparente, estructurado, y donde la membrana está dispuesta de forma plana sobre el cuerpo de apoyo transparente, de manera que células que deben ser detectadas son retenidas en al menos una parte de la superficie de la membrana y de manera que al menos una parte de la muestra de líquido atraviesa la membrana,
- 10 ii) aplicación de un medio óptico líquido, el cual presenta esencialmente el mismo índice de refracción que el cuerpo de apoyo, donde el medio óptico líquido se aplica de modo que el mismo llena los espacios intermedios entre la membrana y el cuerpo de apoyo,
- 10 iii) detección óptica de al menos una superficie parcial de la membrana, para la detección de células que deben ser detectadas.

15 Sobre el cuerpo de apoyo puede disponerse la membrana. El mismo se utiliza para soportar la membrana y posibilitar la salida de filtrado. La membrana puede apoyarse sobre el cuerpo de apoyo. Para ello, en la superficie del cuerpo de apoyo pueden estar realizados canales, para garantizar una salida de filtrado. De acuerdo con una forma de ejecución alternativa, en el cuerpo de apoyo pueden proporcionarse también orificios o poros. El cuerpo de apoyo puede estar realizado como parte separada en una escotadura del soporte, pero también puede estar realizado de forma integral con el soporte, en una subárea del soporte.

El índice de refracción indica la relación de la velocidad de luz en vacío  $c_0$  con respecto a la velocidad de propagación  $c_M$  de la luz en el medio M:

20 
$$n = c_0 / c_M$$

El índice de refracción es un número adimensional. Un índice de refracción esencialmente igual significa que el índice de refracción no se diferencia en más de 0,1; preferentemente en no más de 0,01; de forma aún más preferente en no más de 0,001.

De manera preferente, el soporte presenta esencialmente las dimensiones de un portaobjetos de microscopio.

25 La membrana y el cuerpo de apoyo pueden presentar por ejemplo una superficie base esencialmente cuadrática, circular o elíptica.

A través de la utilización según la invención de un medio óptico que está adaptado al material del cuerpo de apoyo se mejora esencialmente la detección óptica.

30 Preferentemente, la membrana y el cuerpo de apoyo se seleccionan de modo que éstos esencialmente posean el mismo índice de refracción.

De acuerdo con un aspecto de la invención, las células que deben ser detectadas se marcan antes o después del filtrado con un primer medio para marcar las células que deben ser detectadas, el cual contiene un primer marcador.

35 Medios adecuados para el marcado comprenden marcadores que pueden colorear células de forma no específica o de forma específica. Los marcadores no específicos pueden ser por ejemplo colorantes que colorean proteínas, ácidos nucleicos u otros componentes celulares. Los marcadores específicos pueden ser por ejemplo anticuerpos, oligonucleótidos de sonda, péptidos u otras moléculas que se fijan específicamente en proteínas, secuencias de ácidos nucleicos u otras estructuras específicas de la célula.

40 El marcador puede marcarse directamente con una marcación detectable, por ejemplo colorantes cromógenos, colorantes fluorescentes, marcación isotópica, o similares. De forma alternativa, el marcador puede detectarse también mediante un reactivo de detección secundario (por ejemplo anticuerpo secundario o sistema de enzima - sustrato). De acuerdo con un aspecto preferente de la invención, en el procedimiento, después de la filtración, las células sobre la membrana se colorean con un colorante a través de incubación, con un líquido correspondiente del proceso. Para ello pueden seleccionarse colorantes que colorean células o componentes celulares, los cuales son conocidos en las áreas de la citología y de la histología. Éstos pueden ser colorantes vivos o muertos, colorantes que colorean específicamente núcleos celulares u otros orgánulos, o los cuales colorean componentes celulares específicamente determinados, por ejemplo ácidos nucleicos o proteínas. Colorantes celulares conocidos son, por ejemplo, azul de tripano, DAPI, y similares. Las células que deben ser detectadas, coloreadas o no coloreadas, sobre la membrana, también pueden ser analizadas de forma microscópica. Preferentemente, la membrana se

45

apoya de forma plana sobre el cuerpo de apoyo (3) transparente, cubriéndolo al menos de forma parcial o también por completo.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el soporte es un portaobjetos para la microscopía, el cual está realizado de vidrio o de plástico, en particular de copolímero de olefina cíclica (COC) o de policarbonato. Un COC considerado como preferente es el conocido bajo la denominación comercial TOPAS®.

De acuerdo con un aspecto de la invención, el cuerpo soporte es poroso, está realizado de plástico, de copolímero de olefina cíclica (COC) o de policarbonato, donde en particular está realizado del mismo material que el soporte. De acuerdo con un aspecto de la invención, el soporte y el cuerpo de apoyo están realizados de forma integral en base a un cuerpo, y la membrana cubre completamente la escotadura en el soporte y en particular se apoya de forma plana, en particular de forma paralelamente plana, sobre el cuerpo de apoyo en el área de la escotadura. De acuerdo con un aspecto de la invención, el cuerpo de apoyo comprende canales realizados sobre un lado orientado hacia la membrana de filtro, los cuales están diseñados en contacto de fluido con la membrana de filtro. Los canales pueden estar realizados formando aberturas en el cuerpo de apoyo y/o en el soporte, debido a lo cual líquido puede salir a través del cuerpo de apoyo o del soporte, o puede ser succionado. Las aberturas pueden estar realizadas por ejemplo como perforaciones verticales, desde el lado superior hacia el lado superior del cuerpo de apoyo o del soporte. La membrana y el cuerpo de apoyo pueden presentar por ejemplo una superficie base esencialmente cuadrática, circular o elíptica. Las aberturas pueden estar presentes a distancias regulares en el borde de la superficie base. Esa disposición preferente posibilita una salida regular del filtrado. Al mismo tiempo, la membrana cubre esencialmente el cuerpo de apoyo, de modo que al llenarse los espacios intermedios entre la membrana y el cuerpo de apoyo con el medio óptico, y también en el caso de un llenado eventual de los poros de la membrana con el medio, se produce una unidad óptica con índice de refracción uniforme, en la cual puede trabajarse con el microscopio de forma especialmente conveniente. De manera alternativa, las aberturas pueden estar distribuidas esencialmente de modo uniforme sobre la superficie base del cuerpo de apoyo. De acuerdo con un aspecto de la invención, la membrana y el cuerpo de apoyo forman una superficie de contacto común con una pluralidad de puntos de contacto comunes que se sitúan en un plano llano, plano - paralelo, de la superficie de contacto, donde en particular la membrana presenta una distancia máxima desde el cuerpo de apoyo, de menos de 100 mm. De manera preferente, la membrana se apoya en los puntos de contacto.

De acuerdo con un aspecto de la invención, la membrana de filtro es una membrana de filtro Track Etched que está estructurada en base a una lámina de policarbonato y comprende poros con un diámetro de 2mm - 100µm, en particular de 5-20 µm, de modo aún más preferente de aproximadamente 8µm. De acuerdo con un aspecto de la invención, una célula que debe ser detectada puede ser aislada. La célula aislada puede entonces caracterizarse en detalle o puede someterse a otros análisis funcionales. De acuerdo con un aspecto de la invención, la célula que debe ser detectada puede ser aislada a través de microdissección por láser. Preferentemente, la detección óptica y la microdissección por láser subsiguiente pueden tener lugar en el mismo aparato, en pasos de trabajo consecutivos. La microdissección por láser es una técnica microscópica para la microdissección asistida por láser, de tejidos y células. De este modo, desde una sección de tejido, con la ayuda de un láser (por ejemplo un láser infrarrojo o ultravioleta), puede ser cortada una célula individual o una región deseada. Es posible "cortar" de forma conjunta la célula con la sección de superficie de la membrana sobre la que se apoya. La célula pura es aislada, precipitando en un recipiente para reacción bajo el efecto de la gravitación, es expulsada hacia un recipiente de esa clase en contra de la gravitación o, de forma indirecta, es elevada desde la cubierta adhesiva del recipiente para reacción. De acuerdo con un aspecto de la invención, la célula que debe ser detectada es una célula tumoral. La invención hace referencia además a una disposición para detectar células en una muestra líquida, la cual presenta un soporte que es adecuado para retener células que deben ser detectadas, donde la membrana está dispuesta de forma plana sobre un cuerpo de apoyo estructurado, donde el cuerpo de apoyo está dispuesto y/o realizado en una escotadura del soporte y un medio óptico líquido que posee esencialmente el mismo índice de refracción que el cuerpo de apoyo llena los espacios intermedios entre la membrana y el cuerpo de apoyo, donde al menos el cuerpo de apoyo es transparente. Como disposición en el sentido de la invención se considera aquí una agrupación ("conjunto de partes") formado por el soporte, la membrana y el medio óptico líquido. La membrana puede estar unida al soporte y/o al cuerpo de apoyo, por ejemplo a través de adhesión, de soldadura, de una unión por apriete o similares. De acuerdo con una forma de ejecución preferente, la membrana cubre el cuerpo de apoyo y, por ejemplo, está unida en el borde con el soporte, por ejemplo mediante soldaduras en forma de puntos. Se considera preferente que el soporte sea un portaobjetos para la microscopía, el cual está realizado de vidrio o de plástico, en particular de policarbonato, y/o que el cuerpo de apoyo esté realizado de forma porosa, de plástico, en particular de policarbonato. A continuación, a modo de ejemplo, la invención se describe mediante la figura, la cual representa esquemáticamente una forma de ejecución del procedimiento de acuerdo con la invención. En la figura 1, en una vista en sección, se muestra un cuerpo de apoyo 1 plano, el cual por ejemplo se compone de COC, en particular del COC con la denominación comercial TOPAS. En el cuerpo de apoyo 1, sobre el lado superior que está orientado hacia una membrana 5, están realizados canales 3. Los canales mencionados pasan por la superficie del cuerpo de apoyo y pueden desembocar en perforaciones (que se extienden a través del cuerpo de apoyo) o en aberturas, a través de las cuales líquidos pueden ser succionados desde el lado superior del cuerpo de apoyo. En lugar de proporcionar canales, también es posible proporcionar elevaciones sobre el lado superior del cuerpo de apoyo, las cuales por ejemplo están realizadas como conos truncados o troncos de pirámides, y cuyas superficies se sitúan en

un plano, debido a lo cual se define una superficie de apoyo o superficie de contacto sobre la cual se apoya la membrana 5. De acuerdo con una forma de ejecución preferente, la superficie del cuerpo de apoyo se encuentra estructurada como paquete hexagonal de conos truncados con una altura de 150  $\mu\text{m}$ , con una dimensión del retículo de 300  $\mu\text{m}$ . Los espacios intermedios de los conos truncados definen canales en los cuales puede salir el líquido y las superficies truncadas de los conos truncados definen una superficie de apoyo para la membrana.

Una subárea del soporte está realizada como cuerpo de apoyo. Preferentemente, el soporte presenta las dimensiones de un portaobjetos, tal como éste se utiliza en la microscopía. El tamaño de los poros de la membrana se selecciona de modo que células 9 que deben ser detectadas no puedan pasar la membrana. La muestra se filtra en un primer paso A de la figura 1, de modo que células 9 que deben ser detectadas alcanzan a apoyarse sobre la membrana. La membrana presenta un tamaño de los poros de 0,1 a 200 $\mu\text{m}$ . Debido a ello pueden retenerse células, mientras que fragmentos de células, trombocitos y componentes sólidos más pequeños de la muestra pasan a través del filtro (la membrana). Preferentemente, la membrana presenta un tamaño de los poros de 2 a 50 $\mu\text{m}$ , más preferentemente de 5 a 20 $\mu\text{m}$ , de modo aún más preferente de 5 a 10 $\mu\text{m}$ . Los tamaños de los poros del rango de tamaño de 2 a 50 $\mu\text{m}$ , de 5 a 20 $\mu\text{m}$  o en particular de 5 a 10 $\mu\text{m}$ , ofrecen la ventaja de que las células son retenidas, pero parcialmente se mantienen adheridas en los poros, adhiriéndose así particularmente bien sobre la membrana, quedando a disposición para otros análisis. Como particularmente adecuado ha resultado un tamaño del poro de aproximadamente 8  $\mu\text{m}$ . Las células que deben separarse del líquido de la muestra se separan debido a que las mismas permanecen sobre la superficie de una membrana de filtro que es impermeable para los sólidos que deben separarse (por ejemplo células), pero que es permeable para el entorno y también para sólidos (por ejemplo fragmentos de células) que ensucian el sólido (células) que debe ser separado.

En un paso opcional B de la figura 1 pueden marcarse células 9 que deben ser detectadas, para que puedan diferenciarse mejor de otras células 7. Esto puede tener lugar por ejemplo con una coloración inmunohistoquímica de determinados antígenos. En el caso de que deban detectarse células tumorales se dispone de una gran cantidad de antígenos tumorales conocidos, los cuales pueden marcarse con un anticuerpo correspondiente. De este modo es posible detectar células tumorales de forma específica. Anticuerpos y protocolos de coloración correspondientes son conocidos por el experto.

La siguiente lista muestra algunos antígenos preferentes, específicos de la célula:

- Alfa-1-fetoproteína (AFP), en el caso de hepatocarcinoma y tumores de células germinales gonadales y extragonadales
- Proteína de Bence-Jones, en el caso de mieloma múltiple
- Beta-HCG (subunidad beta de gonadotropina coriónica humana), en el caso de tumores de células germinales del ovario y tumores no seminomatosos del testículo
- CA 15-3, en el caso de cáncer de mama (carcinoma de mama) o cáncer del ovario (carcinoma de ovario)
- CA 19-9 y CA 50, en el caso de cáncer de páncreas (carcinoma pancreático)
- CA-125, en el caso de cáncer del ovario (carcinoma de ovario)
- Calcitonina (calcitonina humana, hCT), en el caso de carcinoma de tiroides medular
- Antígeno carcinoembrionario (CEA), en el caso de cáncer de intestino, carcinoma pancreático, así como adenocarcinoma del pulmón
- Fragmento de citoqueratina 21 (CYFRA 21-1) y serpina B4 (SCC), en el caso de todas las variantes del cáncer de pulmón (carcinoma bronquial)
- HER-2/neu
- Anticuerpos de HPV, así como antígenos de HPV
- Ácido homovanílico, en el caso de neuroblastoma
- Ácido 5-hidroxiindolacético, en el caso de carcinoide
- Catecolamina, ácido vanilmandélico, en el caso de feocromocitoma

- Lactato deshidrogenasa (LDH), en el caso de tumores de células germinales
  - Isoenzima de lactato deshidrogenasa 1 (LDH-1), en el caso de tumores de células germinales; pero según las pautas actuales no se recomienda una determinación habitual
  - Antígenos MAGE
- 5
- Metanefrina, en el caso de feocromocitoma
  - MUC1, en el caso de carcinoma bronquial de células no pequeñas (NSCLC) o de carcinoma de mama
  - NSE, en el caso de carcinoma bronquial de células pequeñas (SCLC), neuroblastoma, así como tumores seminomatosos de células germinales
  - Fosfatasa alcalina placentaria (PLAP), en el caso de tumores seminomatosos de células germinales
- 10
- PSA, en el caso de cáncer de próstata (carcinoma de próstata)
  - Tireoglobulina (Tg) en cualquier concentración, en el caso de carcinoma de tiroides papilar o folicular
  - Timidina quinasa
  - Citoqueratinas, por ejemplo citoqueratina 8, 18, 19
- 15
- A través del marcado puede detectarse así un tipo de célula específico. De este modo es posible por ejemplo diferenciar en una muestra de sangre células tumorales que deben ser detectadas, de leucocitos. De forma alternativa o adicional, sin embargo, también pueden marcarse células con un colorante no específico (el cual no diferencia entre diferentes tipos de células), por ejemplo un colorante vivo (por ejemplo fluoresceína) o un colorante muerto (por ejemplo azul de tripano). Gracias a ello pueden seleccionarse por ejemplo células vivas o muertas para análisis posteriores. En otro paso C de la figura 1 se aplica un medio óptico líquido 11 que esencialmente posee el mismo índice de refracción que el cuerpo de apoyo. El medio óptico líquido 11 se aplica de modo que éste llena los espacios intermedios entre la membrana 5 y el cuerpo de apoyo 1, los cuales están definidos por ejemplo a través de la estructura del canal 3 en el cuerpo de apoyo 1. Además, el medio óptico líquido 11 llena también los poros de la membrana 5 y, preferentemente cubre también la superficie de la membrana 5 y las células que se sitúan encima, en una capa delgada. Debido a ello se mejoran marcadamente las propiedades ópticas relativas a la imagen, de la disposición formada por el cuerpo de apoyo 1 y la membrana 5, lo cual posibilita una detección óptica simplificada de células sobre la membrana. Esto se simplifica proporcionando una buena transparencia del material plástico del soporte de la membrana en el rango UV-A (por ejemplo 337nm). Antes de la detección tiene lugar el llenado de los canales de fluidos entre el cuerpo de apoyo 1 y la membrana 5, a través de un medio óptico líquido 11 con al menos un índice de refracción aproximadamente idéntico al del soporte de la membrana ( $n=1,533$ ), de manera que la muestra biológica sobre la superficie de la membrana se encuentra aún en contacto con el medio óptico. La producción de un medio óptico correspondiente con un índice de refracción predeterminado es conocida por el experto. El índice de refracción del medio óptico (por ejemplo de una solución de azúcar) puede determinarse con un refractómetro y la solución puede regularse de forma correspondiente a través de dilución. Preferentemente, las presiones de vapor de los componentes del medio óptico son mínimas.
- 20
- 25
- 30
- 35
- De manera preferente, en el paso D de la figura 1 tiene lugar el análisis óptico de las células desde el lado posterior, a través del material plástico del soporte que presenta un grosor de aproximadamente 1 mm. Esto puede tener lugar por ejemplo con un microscopio inverso. La flecha indica aquí la dirección desde la cual se detecta la célula 9. A continuación, en un paso E opcional de la figura 1, una célula que debe ser detectada, ya detectada, se aísla con la ayuda de disección por láser.
- 40
- La flecha indica aquí la dirección desde la cual la célula 9 (y eventualmente una superficie parcial de la membrana sobre la que se sitúa la célula), se separa desde la membrana con un haz de láser, y es recolectada en un recipiente para muestras 13. La célula aislada puede someterse a otras pruebas.
- El procedimiento de acuerdo con la invención es especialmente adecuado para esa combinación con la disección por láser, puesto que la utilización del medio óptico posibilita un trabajo particularmente preciso.
- 45
- De manera alternativa, la célula puede permanecer también sobre la membrana y ser sometida allí a otras pruebas, por ejemplo en un procedimiento EPISPOT o ELISPOT (ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas de puntos). En ese caso se detectan sobre la membrana sustancias inmunoquímicas que son secretadas por la célula.

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para detectar células en una muestra líquida, el cual presenta los siguientes pasos:
  - 5 i) filtración de la muestra líquida a través de una membrana porosa que es adecuada para retener células (9) que deben ser detectadas, donde al menos una subárea de un soporte está diseñada como un cuerpo de apoyo (1) transparente, estructurado, y donde la membrana (5) está dispuesta de forma plana sobre el cuerpo de apoyo transparente (1), de manera que células (9) que deben ser detectadas son retenidas en al menos una parte de la superficie de la membrana (5) y de manera que al menos una parte de la muestra de líquido atraviesa la membrana (5),
  - 10 ii) aplicación de un medio óptico líquido (11), cuyo índice de refracción se diferencia del índice de refracción del cuerpo de apoyo en no más de 0,1, donde el medio óptico líquido (11) se aplica de modo que el mismo llena los espacios intermedios (3) que se encuentran presentes a través de la estructuración del cuerpo de apoyo, entre la membrana (5) y el cuerpo de apoyo (1),
  - iii) detección óptica de al menos una superficie parcial de la membrana (5), para la detección de células (9) que deben ser detectadas.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde las células (9) que deben ser detectadas se marcan antes o después de la filtración con un primer medio para marcar las células que deben ser detectadas, el cual contiene un primer marcador.
3. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el soporte es un portaobjetos para la microscopía que está realizado de vidrio o de plástico, en particular de COC, y/o porque el cuerpo de apoyo (1) está diseñado de forma porosa, de plástico, en particular del mismo material.
- 20 4. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el soporte y el cuerpo de apoyo (1) están realizados de forma integral en base a un cuerpo, y la membrana (5) cubre completamente el cuerpo de apoyo (1), y en particular se apoya de forma plana sobre el cuerpo de apoyo.
5. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde el cuerpo de apoyo (1) comprende canales (3) realizados sobre un lado orientado hacia la membrana de filtro, los cuales están diseñados en contacto de fluido con la membrana (5).
- 25 6. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde la membrana (5) y el cuerpo de apoyo (1) presentan una pluralidad de puntos de contacto comunes que se sitúan en un plano llano, plano - paralelo, de la superficie de contacto, donde en particular la membrana (5) presenta una distancia máxima desde la superficie de contacto plana, de menos de 100  $\mu\text{m}$ .
- 30 7. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde la membrana (5) es una membrana de filtro Track Etched que está estructurada en base a una lámina de policarbonato y comprende poros con un diámetro de 2 $\mu\text{m}$  - 100 $\mu\text{m}$ , en particular de 5-10  $\mu\text{m}$ .
8. Procedimiento según una de las reivindicaciones precedentes, donde se aísla al menos una célula (9) que debe ser detectada.
- 35 9. Procedimiento según la reivindicación 8, donde la célula (9) que debe ser detectada se aísla a través de microdissección por láser.
10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 y 9, donde la célula (9) que debe ser detectada es una célula tumoral.
- 40 11. Disposición para detectar células en una muestra líquida, la cual presenta un soporte, una membrana porosa (5) que es adecuada para retener células (9) que deben ser detectadas, donde al menos una subárea del soporte está realizada como cuerpo de apoyo (1) estructurado, donde la membrana está dispuesta de forma plana sobre el cuerpo de apoyo (1), y donde a través de la estructuración del cuerpo de apoyo se encuentran presentes espacios intermedios (3) entre la membrana y el cuerpo de apoyo (1); donde al menos el cuerpo de apoyo es transparente, y donde un medio óptico líquido (11), cuyo índice de refracción se diferencia del índice de refracción del cuerpo de apoyo en no más de 0,1; llena los espacios intermedios (3) mencionados.
- 45

## ES 2 664 831 T3

12. Disposición según la reivindicación 11, donde el soporte y el cuerpo de apoyo (1) están realizados de forma integral en base a un cuerpo, y la membrana (5) cubre completamente el cuerpo de apoyo, y en particular se apoya de forma plana sobre el cuerpo de apoyo en el área de una escotadura.
- 5 13. Disposición según la reivindicación 11 ó 12, donde el cuerpo de apoyo (1) comprende canales (3) realizados sobre un lado orientado hacia la membrana (5), los cuales están diseñados en contacto de fluido con la membrana de filtro.
- 10 14. Disposición según una de las reivindicaciones 11 a 13, donde la membrana (5) y el cuerpo de apoyo (1) presentan una pluralidad de puntos de contacto comunes que se sitúan en un plano llano, plano - paralelo, de una superficie de contacto, donde en particular la membrana (5) presenta una distancia máxima desde la superficie de contacto plana, de menos de 100  $\mu\text{m}$ .
- 15 15. Disposición según la reivindicación 14, donde el cuerpo de apoyo está realizado en el área del contacto entre la membrana de filtro y el cuerpo de apoyo, en forma de barras, en particular barras con sección transversal triangular, con una anchura en el rango de 50  $\mu\text{m}$  a 500  $\mu\text{m}$ , en forma de conos truncados, en forma de troncos de pirámides y/o en forma de columnas.
- 20 16. Disposición según una de las reivindicaciones 11 a 15, donde la membrana (5) es una membrana de filtro Track Etched que está estructurada en base a una lámina de policarbonato y comprende poros con un diámetro de 2-100 micrómetros, en particular de 8  $\mu\text{m}$ , y presenta una densidad de huecos de  $10^5$  poros por centímetro cuadrado.
17. Disposición según una de las reivindicaciones 11 a 16, donde el soporte es un portaobjetos para la microscopía que está realizado de vidrio o de plástico, en particular de COC, y/o porque el cuerpo de apoyo (1) está diseñado de forma porosa, de plástico, en particular del mismo material.

