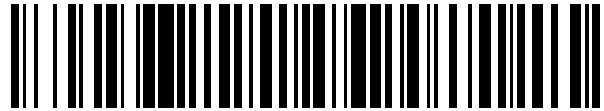


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 213**

21 Número de solicitud: 201830428

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

A61B 10/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.04.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.10.2019

71 Solicitantes:

**LIFE LENGTH S.L. (100.0%)
CALLE MIGUEL ANGEL 11 PLANTA 2
28010 MADRID ES**

72 Inventor/es:

ESTRADA RODRIGUEZ, Juan Camilo

74 Agente/Representante:

HIDALGO CASTRO, Angel Luis

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN Y PRESERVACIÓN DE NÚCLEOS DE CÉLULAS EPITELIALES DE MUCOSA BUCAL HUMANA**

57 Resumen:

Procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana que comprende las siguientes etapas:

- a) ayuno durante un tiempo de entre 3 a 4 horas,
- b) eliminación de la boca de contaminantes sólidos mediante lavado y posterior enjuagado,
- c) enjuague bucal durante un tiempo de entre 15 a 30 segundos con una solución tampón de fosfato salino obteniendo una primera suspensión celular,
- d) la primera suspensión celular obtenida en la etapa c) se deposita en un recipiente y se mezcla con un alcohol alifático primario en una proporción en volumen de entre 60 a 80% de alcohol alifático primario y de entre 40 a 20% de la suspensión celular, obteniendo una segunda suspensión celular,
- e) se almacena la segunda suspensión celular obtenida en la etapa d) a temperatura ambiente.

ES 2 729 213 A1

DESCRIPCIÓN

Procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana

5

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es un novedoso procedimiento para la extracción y conservación de células epiteliales extraídas de la mucosa bucal humana. El procedimiento incluye la extracción y conservación íntegra de los núcleos celulares para su posterior uso en análisis de carácter citogenético. Así mismo, es objeto de la presente invención un kit para llevar a cabo el procedimiento anteriormente descrito y conservar la muestra de manera íntegra durante un tiempo prolongado, semanas, a temperatura ambiente.

15 Antecedentes de la invención

La citogenética molecular es la ciencia que comprende el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas, generalmente mediante el uso de técnicas de hibridación por fluorescencia *in situ* (*FISH – Fluorescence In Situ Hybridization*). Estas técnicas consisten en la tinción de regiones específicas del genoma mediante el uso de sondas marcadas fluorescentemente que permiten identificar tanto el número como la intensidad de cada una de estas regiones. Estas técnicas se utilizan de manera rutinaria para identificar distintas anomalías genéticas de carácter hereditario o adquirido. Dependiendo del tipo de muestra, el FISH puede emplearse tanto en los cromosomas metafásicos como en los núcleos interfásicos. Finalmente, sus aplicaciones pueden ir desde la evaluación de causas de antecedentes de infertilidad, diagnóstico de anomalías congénitas, análisis de leucemias y/o linfomas o diagnóstico prenatal dependiendo del tipo celular evaluado. A día de hoy, para la realización de estos ensayos, las células se pueden extraer tanto de la mucosa bucal, de la sangre o de la médula ósea, entre otros.

30

Cabe destacar que otras técnicas de carácter citogenético basadas en FISH se han introducido recientemente en el mercado, y aunque no tienen un carácter diagnóstico presentan una gran relevancia para en la determinación de la estabilidad genética del individuo. Así, por ejemplo, recientemente se ha incorporado en el mercado la técnica del HT-QFISH (*High-Throughput Quantitative Fluorescence In Situ Hybridization*) que permite

35

cuantificar la longitud telomérica de distintos tipos celulares la cual es relevante para la determinación de la estabilidad genética de las células.

5 Los procedimientos para la extracción y conservación de células epiteliales de la boca, están enfocados fundamentalmente a la preservación del ADN contenido en dichas células ya que la mayoría de estos procedimientos están basados en el análisis genético mediante técnicas de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en la cual la integridad del núcleo no es determinante. Sin embargo, a día de hoy existen muchos estudios citogenéticos en los que se requiere que la integridad del núcleo de la célula sea completa como por ejemplo para la detección
10 de aneuploidías genéticas o recientemente estudios relacionados con la longitud telomérica.

A día de hoy, en la mayoría de estudios citogenéticos se requiere que la persona visite el laboratorio para que se haga la extracción de la biopsia in situ lo cual dificulta en gran medida la realización de este tipo de ensayos de una manera generalizada.

15 La presente invención preconiza un método de extracción y preservación de células epiteliales de fácil uso y gran simplicidad que mantiene la integridad de los núcleos de dichas células durante semanas, lo que facilita su potencial uso para análisis de citogenética molecular principalmente los relacionados con FISH en interfase. Adicionalmente, el desarrollo del kit solventa la problemática asociada a la logística de extracción y envío de
20 muestras, además evita que el paciente se tenga que desplazar a un laboratorio para que le realicen la extracción, pudiendo hacerlo en su propio domicilio y enviar la muestra al laboratorio.

25 **Descripción de la invención**

El procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, que es uno de los objetos de la presente invención, comprende las siguientes etapas:

- 30
- a) ayuno durante un tiempo de entre 3 a 4 horas,
 - b) eliminación de la boca de contaminantes sólidos mediante lavado y posterior enjuagado,
 - c) enjuague bucal durante un tiempo de entre 15 a 30 segundos con una solución tampón de fosfato salino para la obtención de una primera suspensión celular,

- d) la primera suspensión celular obtenida en la etapa c) se deposita en un recipiente y se mezcla con un alcohol alifático primario en una proporción en volumen de entre 60 a 80% de alcohol alifático primario y de entre 40 a 20% de la suspensión celular obteniendo una segunda suspensión celular,
- 5 e) se almacena la segunda suspensión celular obtenida en la etapa d) a temperatura ambiente.

Otro de los objetos de la presente invención es un kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, para la puesta en práctica del procedimiento descrito en el párrafo anterior, que comprende un primer recipiente que contiene una solución tampón fosfato salino, para un enjuague bucal y posterior depósito en dicho primer recipiente, y un segundo recipiente que contiene un alcohol alifático primario para la fijación de la muestra. El tercer objeto de la invención es una composición para la preservación de núcleos de células utilizada en el kit y en el procedimiento, que es una solución de un alcohol alifático primario en una solución tampón fosfato salino, que es utilizada en el procedimiento y forma parte del kit.

10

15

Realizaciones preferentes

- 20 El procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, que es uno de los objetos de la presente invención, comprende las siguientes etapas:
- a) ayuno durante un tiempo de entre 3 a 4 horas antes de la extracción,
- b) eliminación de la boca de contaminantes sólidos mediante lavado y posterior enjuagado,
- 25 c) enjuague bucal durante un tiempo de entre 15 a 30 segundos con una solución tampón de fosfato salino, también llamada por sus siglas en inglés PBS, *phosphate buffered saline*, obteniendo una primera suspensión celular,
- d) la primera suspensión celular obtenida en la etapa c) se deposita en un recipiente y se mezcla con un alcohol alifático primario en una proporción en volumen de entre 60 a 80% de alcohol alifático primario y de entre 40 a 20% de la suspensión celular obteniendo una segunda suspensión celular. El alcohol alifático primario puede ser etanol, metanol o una disolución de 3 partes en volumen de metanol y una parte de ácido acético,
- 30

e) se almacena la segunda suspensión celular ya fijada, obtenida en la etapa d) a temperatura ambiente.

5 El kit para llevar a cabo el procedimiento comprende un primer recipiente, que contiene una solución tampón de fosfato salino, para un enjuague bucal y posterior depósito en dicho primer recipiente, y un segundo recipiente que contiene un alcohol alifático primario para la fijación de la muestra. Tanto el primer recipiente como el segundo recipiente, que pueden ser sendos tubos con tapones, pueden ser acoplables entre sí por sus bocas para realizar la mezcla del alcohol alifático primario con la suspensión celular por inversión.

10

El primer recipiente puede contener entre 5 y 10 ml de solución tampón fosfato salino y el segundo recipiente entre 30 y 40 ml de un alcohol alifático primario, dicho alcohol alifático primario puede ser etanol, metanol o una solución de 3 partes en volumen de metanol y 1 parte de ácido acético.

15

La composición para la preservación de núcleos de células utilizada en el procedimiento y cuyos componentes contendrá el kit, es una solución de un alcohol alifático primario en una solución tampón fosfato salino, preferentemente la proporción en volumen será de entre 60 a 80% de alcohol alifático primario y de entre 40 a 20% de la solución tampón de fosfato salino, y el alcohol alifático primario puede ser etanol, metanol o una disolución de 3 partes en volumen de metanol en 1 parte de ácido acético.

20

Las ventajas tanto del procedimiento, el kit y la composición son evidentes para cualquier persona del sector, pero se considera conveniente citar las siguientes:

25

- la metodología para la extracción es muy sencilla y no requiere actuaciones invasivas,
- mantiene no solo la integridad del ADN, sino la integridad de los núcleos completos de las células, lo que es de interés en algunos estudios citogenéticos,
- los núcleos completos se pueden preservar durante semanas a temperatura ambiente, lo que evita la utilización de contenedores isotérmicos o refrigerados que dificultan y encarecen su transporte y almacenamiento.

30

35

REIVINDICACIONES

- 5
1. Procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:
- 10
- a. ayuno durante un tiempo de entre 3 a 4 horas,
 - b. eliminación de la boca de contaminantes sólidos mediante lavado y posterior enjuagado,
 - c. enjuague bucal durante un tiempo de entre 15 a 30 segundos con una solución tampón de fosfato salino obteniendo una primera suspensión celular,
 - d. la primera suspensión celular obtenida en la etapa c) se deposita en un recipiente y se mezcla con un alcohol alifático primario en una proporción en volumen de entre 60 a 80% de alcohol alifático primario y de entre 40 a 20% de la suspensión celular, obteniendo una segunda suspensión celular,
 - 15 e. se almacena la segunda suspensión celular obtenida en la etapa d) a temperatura ambiente.
- 20
2. Procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el alcohol alifático primario es etanol.
- 25
3. Procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según reivindicación 1, **caracterizado** porque el alcohol alifático primario es metanol.
- 30
4. Procedimiento de extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según reivindicación 3, **caracterizado** porque el metanol está disuelto en ácido acético en una proporción en volumen de 3 partes de metanol en una parte de ácido acético.
- 35
5. Kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana **caracterizado** porque comprende un primer recipiente que contiene una solución tampón de fosfato salino, para un enjuague bucal y posterior depósito en dicho primer recipiente, y un segundo recipiente que contiene un alcohol alifático primario para la fijación de la muestra.

- 5 6. Kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según reivindicación 5, **caracterizado** porque el primer recipiente contiene entre 5 a 10 ml de un alcohol alifático primario y el segundo recipiente contiene entre 30 a 40 ml del alcohol alifático primario.
- 10 7. Kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según reivindicación 5 o 6, **caracterizado** porque el primer y el segundo recipientes son acoplables entre sí por sus respectivas bocas.
- 15 8. Kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, **caracterizado** porque el alcohol alifático primario es etanol.
- 20 9. Kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según cualquiera de las reivindicaciones 5 - 7, **caracterizado** porque el alcohol alifático primario es metanol.
- 25 10. Kit para la extracción y preservación de núcleos de células epiteliales de mucosa bucal humana, según reivindicación 9, **caracterizado** porque el metanol está disuelto en ácido acético en una proporción en volumen de 3 partes de metanol y una parte de ácido acético.
- 30 11. Composición para la preservación de núcleos de células **caracterizada** porque es una solución de un alcohol alifático primario en una solución de tampón fosfato salino.
- 35 12. Composición para la preservación de núcleos de células, según reivindicación 11, **caracterizada** porque la proporción en volumen es de entre 60 a 80% de alcohol alifático primario y de entre 40 a 20% de la solución tampón fosfato salino.
13. Composición para la preservación de núcleos de células, según reivindicación 11 o 12, **caracterizada** porque el alcohol alifático primario es etanol.
14. Composición para la preservación de núcleos de células, según reivindicación 11 o 12, **caracterizada** porque el alcohol alifático primario es metanol.

15. Composición para la preservación de núcleos de células, según reivindicación 14, **caracterizada** porque el metanol está disuelto en ácido acético en una proporción en volumen de 3 partes de metanol y una parte de ácido acético.



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ②① N.º solicitud: 201830428
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.04.2018
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)
A61B10/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HALDER, A. et al. Journal of Clinical and Diagnostic Research, 04/2007, Vol. 1, Nº 2, Páginas 32-38 [en línea][recuperado el 04/02/2019]. http://www.jcdr.net/back_issues.asp?issn=0973-709x&year=2007&month=April&volume=1&issue=2&page=32-38&id=23 Página 32, párrafo 2; página 33, columna derecha, párrafo2.	1-15
A	RUSSO, F.B. et al. Epithelial cells from oral mucosa: How to cultivate them? Cytotechnology, 2016, Vol. 68, Páginas 2105-2114, <DOI: 10.1007/s10616-016-9950-9>. Página 2107, columna izquierda	1-15
A	US 20160051415 A1 (KUAN et al.) 25/02/2016, Párrafos 0007-00019; figuras 1, 2, 4A, 4B, 6, 8.	1-15

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
11.02.2019

Examinador
J. López Nieto

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, INTERNET