

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 784 011**

51 Int. Cl.:

**G01N 1/31** (2006.01)

**A01N 1/00** (2006.01)

**B01L 3/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.10.2003 E 07008752 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 1816461**

54 Título: **Procedimiento y dispositivo para recoger y preservar las células para su análisis**

30 Prioridad:

**16.10.2002 US 418978 P**

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

**21.09.2020**

73 Titular/es:

**STRECK, INC. (100.0%)  
7002 South 109th Street  
La Vista, NE 68128, US**

72 Inventor/es:

**RYAN, WAYNE L.**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 784 011 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 recoger y preservar las células para su análisis

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación y uso para estabilizar una muestra de sangre completa, células epiteliales o células del líquido cefalorraquídeo.

5 En análisis biológicos y bioquímicos, y las técnicas relacionadas, es frecuentemente necesario recoger y preservar tejidos biológicos (es decir, células y componentes celulares), durante periodos de tiempo útiles. Las células recogidas y preservadas se utilizan a menudo en una amplia variedad de aplicaciones, incluyendo, aunque no de forma limitativa como material pedagógico y para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Por ejemplo, dichas células se utilizan en estudios histológicos, citológicos, inmunitarios y proteínicos, y similares.

10 Se conocen en la técnica diversos procedimientos para analizar materiales histológicos, citológicos, inmunitarios y proteínicos. Por ejemplo, el análisis de marcadores superficiales se ha desarrollado como herramienta de laboratorio, que es particularmente útil para el diagnóstico clínico para la investigación de patologías inmunodeficientes, diferenciación de tipos celulares y etapas de desarrollo, y otros procesos celulares. La expansión de usos para el análisis de marcadores superficiales ha dado como resultado el uso de la citometría de flujo y las sondas de anticuerpos para evaluar las propiedades celulares. Aunque existen otros medios para evaluar el análisis de marcadores superficiales, la citometría de flujo proporciona evaluaciones rápidas, objetivas y cuantitativas de los marcadores superficiales. Asimismo, incluso aunque el microscopio sigue siendo el medio convencional para examinar los materiales biológicos preservados y teñidos, los materiales biológicos pueden también examinarse con un citómetro de flujo. El citómetro de flujo es un importante procedimiento para examinar una pluralidad de células en un tiempo breve.

La citometría de flujo y los citómetros de flujo se describen generalmente en el texto de Keran, Flow cytometry in Clinical Diagnosis (1989). Los citómetros de flujo funcionan en principio mediante un análisis multiparamétrico de poblaciones de células heterogéneas (o componentes celulares) célula por célula. La citometría de flujo permite determinar las propiedades biológicas y físicas de las células y los componentes celulares. En la citometría de flujo, las células en suspensión se fuerzan a pasar en fila, mediante focalización hidrodinámica, a través de la ruta de un haz láser. La interacción de las células con el haz láser dispersa algo de la luz y produce excitación y emisión de moléculas fluorescentes presentes sobre la superficie o el interior de la célula. Una serie de lentes recoge la luz dispersa o emitida y la pasa a un fotomultiplicador. Cada fotomultiplicador mide un parámetro diferente. Los parámetros medidos incluyen: la dispersión de luz hacia delante, que mide el tamaño de partículas relativo; la dispersión de luz lateral, que mide la granularidad relativa de diferentes estructuras internas; y la emisión de fluorescencia. Las señales ópticas se convierten informáticamente en una presentación de datos para su análisis y la interpretación. Las células recogidas y preservadas usando procedimientos e instrumentos convencionales requieren generalmente dilución y/o tratamiento adicional antes de que se puedan analizar mediante citometría de flujo. Por tanto, es deseable en la técnica obtener un procedimiento y un dispositivo de recogida que permita que las células se analicen directamente mediante citometría de flujo sin dilución y/o tratamiento adicional. (Se necesita un procedimiento para recoger y transportar especímenes de sangre humana para el análisis de citometría de flujo. Los procedimientos actuales son poco adecuados ya que las muestras han de analizarse poco después de la recogida).

El objetivo primario de la preservación del tejido es proporcionar tanto detalle estructural de las células y componentes de las mismas como sea posible. Para hacer esto, es necesario mantener las células en su morfología original inalterada de forma que se pueda observar un detalle celular máximo. Con la aplicación química de la inmunotinción, existe también el requisito de que los antígenos no se alteren por el procedimiento de preservación. Por tanto, es deseable en la técnica obtener un procedimiento y un dispositivo de recogida que mantenga las células en su morfología original sin alterar y que preserve sus sitios antigénicos.

Las formulaciones usuales para la preservación de células contienen uno o más agentes, que reaccionan intensamente con las proteínas de las células para desnaturalizar e insolubilizar los componentes de la célula. Un agente típico de este tipo es el ácido pícrico, los iones mercúricos, el formaldehído y el glutaraldehído. Además, se pueden utilizar también algunos compuestos menos tóxicos que desnaturalizan y estabilizan las proteínas tales como el ácido acético y el ácido fórmico. Desafortunadamente, la toxicidad asociada con dichos compuestos hace que su uso sea menos que satisfactorio. Por ejemplo, una solución de formaldehído al 37 %, el más común de estos fijadores, es un gas nocivo que es también tóxico, inflamable y carcinógeno. Aunque cuando se utiliza este producto químico se realizan esfuerzos para proteger a los operarios y para evitar la contaminación del sistema de drenaje cuando se deshecha, estos esfuerzos son normalmente caros e incómodos, y los fijadores tales como el formaldehído siguen presentando un peligro para los operarios de laboratorio y los profesionales de la atención sanitaria. Por tanto, es muy deseable desarrollar un procedimiento y un dispositivo de recogida, que pueda preservar las células con baja toxicidad y un entorno no inflamable de forma que se puedan utilizar con seguridad, eficacia y de manera cómoda en estudios histológicos y en otros estudios.

En el documento US5849517 A se proporciona un procedimiento y una composición para fijar y estabilizar tejidos, células y componentes celulares de forma que se preserven sitios antigénicos y ácidos nucleicos. El fijador se selecciona entre el grupo que consiste en imidazolidinil urea, diazolidinil urea, y las mezclas de los mismos.

Para una manipulación incluso más fácil, es también deseable desarrollar un procedimiento y un dispositivo de recogida que permita el transporte (por ejemplo, desde el sitio de recogida hasta el sitio del análisis) de las células a temperatura ambiente. Este problema se resuelve mediante la materia sujeto de las reivindicaciones 1-5.

5 La presente solicitud aborda muchos de los desafíos que se encuentran cuando se usan procedimientos convencionales para recoger y preservar células proporcionando un procedimiento y un dispositivo de recogida que pueden mantener las células en su morfología original sin alterar; preservando los sitios antigénicos celulares; y permitiendo transportar las células a temperatura ambiente, para manipularlas en un entorno de baja toxicidad y no inflamable, y analizarse directamente mediante citometría de flujo sin dilución y/o tratamiento adicional. La materia objeto reivindicada se refiere más específicamente a un procedimiento y un dispositivo que permite que las células (por ejemplo, sangre completa, células epiteliales, líquido cefalorraquídeo, y similares) se recojan y preserven para su análisis y aborda muchos de los desafíos que aparecen cuando se usan procedimientos e instrumentos convencionales. De manera específica, la materia objeto reivindicada describe un procedimiento y un dispositivo de recogida que (1) utiliza un reactivo menos tóxico y no inflamable para fijar y estabilizar células; (2) permite que las células permanezcan con su morfología original sin alterar; (3) permite preservar los sitios antigénicos durante un periodo de tiempo útil; (4) permite que las células se transporten a temperatura ambiente; y/o (5) permite analizar las células directamente mediante citometría de flujo sin dilución y/o tratamiento adicional.

15 La presente solicitud incluye un dispositivo para recoger y preservar las células que comprende: (1) un recipiente de recogida comprendido por un tubo que tiene un extremo abierto y un extremo cerrado, un cierre en el extremo abierto del tubo, un vacío aplicado hasta un nivel predeterminado en el interior del recipiente; y (2) compuestos que incluyen un agente anticoagulante y un agente fijador seleccionado entre el grupo que consiste en: diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetioilol-5,5-dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetil glicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-laza-3, 7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxipoli[metileno-oxi]metil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, adamantina cuaternaria y combinaciones de los mismos. La materia objeto reivindicada puede incluir opcionalmente poli(ácido acrílico) o un ácido adecuado que tiene un pH comprendido de aproximadamente uno a aproximadamente siete en el interior del tubo. Los compuestos del dispositivo deben estar en cantidad suficiente para preservar la morfología original de las células recogidas y los sitios antigénicos sin dilución significativa de las células (es decir, en un volumen que no sea clínicamente significativo), y permitir que las células, almacenadas junto con los compuestos, se analicen directamente en un citómetro de flujo.

20 La presente solicitud incluye también un procedimiento comprendido por (1) proporcionar un tubo con un extremo abierto y un extremo cerrado, (2) precargar el tubo con compuestos que incluyen: un agente anticoagulante, un agente fijador seleccionado entre el grupo que consiste en: diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetioilol-5,5-dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, oxazolidinas, hidroximetil glicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-laza-3,7-di-oxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxipoli[metileno-oxi]metil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, y adamantina cuaternaria, y opcionalmente un poli(ácido acrílico) o un ácido adecuado que tiene un pH comprendido de aproximadamente uno a aproximadamente siete, en el que los compuestos están en cantidad suficiente para preservar la morfología original de las células recogidas y los sitios antigénicos sin dilución significativa de las células, y permitir por tanto que las células, almacenadas junto con los compuestos; se analicen directamente en un citómetro de flujo; insertando un cierre en el extremo abierto del tubo; y aplicando un vacío a un nivel predeterminado en el interior del tubo.

30 El procedimiento y el dispositivo de la presente solicitud pueden incluir también opcionalmente otros componentes desvelados en la técnica usados convencionalmente en la recogida y el análisis de células como una gasa, guante, torniquete, lanceta, aguja, tira reactiva (por ejemplo, inmunoensayo), hisopo con alcohol, gradilla para tubos, tubos adicionales de recogida de células (con o sin aditivos convencionales de análisis de células en el interior de estos tubos), tira adhesiva, jeringa, tira de vidrio o de plástico, medios de empaquetado para almacenar los componentes deseados y el dispositivo, y medios de empaquetado para transportar al menos las células recogidas y preservadas almacenadas en el dispositivo. El procedimiento de la materia objeto reivindicada puede incluir también opcionalmente procedimientos adicionales desvelados en la técnica e instrumentos usados para el análisis de células tales como un citómetro de flujo, un analizador para hematología y otros instrumentos de hematología, etc.

35 Se describirán ahora las realizaciones de la presente invención, únicamente por medio de ejemplos que se refieren a los dibujos acompañantes, en los que:

FIG. 1. Una ilustración de la sección transversal de una realización ilustrativa del dispositivo de recogida de la materia objeto reivindicada; y

40 FIG. 2 A Un diagrama de flujo que ilustra un procedimiento para preparar el dispositivo de recogida ilustrado en la FIG. 1.

Volviendo ahora a los dibujos, La FIG. 1 muestra una ilustración de la sección transversal de un dispositivo 100 que incorpora una realización preferida de esta materia objeto reivindicada y que se puede usar para recoger y preservar tejidos biológicos tales como células y componentes celulares para su análisis. El dispositivo 100 es especialmente útil en la recogida de sangre completa, pero se puede usar para recoger otros tipos de fluidos corporales y/o tejidos biológicos (por ejemplo, células epiteliales, médula ósea, líquido cefalorraquídeo y similares) incluyendo, aunque no

de forma limitativa, muestras de tejidos anómalos tales como leucemias, tejido canceroso y cáncer, y similares, siempre que las muestras de tejido se puedan transformar en una suspensión celular.

5 El dispositivo 100 incluye un recipiente 10 de recogida purgado que comprende (1) un tubo 12 que tiene un extremo abierto 14 y un extremo cerrado 16; un cierre (por ejemplo, un tapón) 18 en el extremo abierto del tubo 12 y un nivel predeterminado de vacío (no se muestra) en el interior del recipiente 10. Se prefiere que el tubo 12 esté fabricado de material transparente tal como vidrio o plástico para una mejor visibilidad. Se prefiere también que el tubo 12 tenga una superficie interior que sea estéril y resista la adherencia a las células 20 (no se muestra) durante la recogida, el almacenamiento, y el análisis. El cierre 18 preferentemente se puede perforar con una aguja y se puede volver a cerrar de forma que permite una transferencia fácil de las células 20 (por ejemplo, las células 20 desde de su hospedador al recipiente 10 y desde el recipiente 10 a otro sustrato si se desea). Se prefiere también que el cierre 18 y el tubo 12 formen conjuntamente un cierre hermético capaz de mantener una presión diferencial entre la presión atmosférica y una presión menor de la presión atmosférica dentro del tubo 12.

15 El tamaño del recipiente 10 no es muy crítico y es dependiente del volumen de muestra celular que se desea recoger y preservar. Por ejemplo, un tamaño típico para el recipiente 10 puede ser un volumen interno entre 100  $\mu$ l y 10 ml. El recipiente 10 puede construirse usando procedimientos desvelados en la técnica y está comercialmente disponible (por ejemplo, Vacutainer Plus Plastic Tubes with Hemogard Closure disponible de Becton Dickinson and Company situada en Franklin Lakes, Nueva Jersey; el tubo de recogida de la muestra evacuada descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5.860.937, que se ha incorporado por referencia). Como es evidente, debe entenderse que se puede realizar una amplia gama de cambios y modificaciones en la realización preferida descrita anteriormente para el recipiente 10.

20 Para la preservación (por ejemplo, fijación, estabilización y similares) de las células 20, el dispositivo 100 incluye además los compuestos 22 que incluyen un agente anticoagulante 24, un agente fijador 26 seleccionado entre el grupo que consiste en: diazolidinil urea, imidazolidinil urea, dimetiloil-5,5-dimetilhidantoína, dimetilol urea, 2-bromo-2-nitropropano-1,3-diol, oxaizolidinas, hidroximetil glicinato de sodio, 5-hidroximetoximetil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroximetil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, 5-hidroxi poli[metileno]metil-1-laza-3,7-dioxabicyclo[3.3.0]octano, y adamantina cuaternaria, y opcionalmente un poli(ácido acrílico) 28 o cualquier ácido adecuado que tenga un pH comprendido de aproximadamente uno a aproximadamente siete, en el que los compuestos están en cantidad suficiente para preservar la morfología original de las células recogidas y los sitios antigénicos sin dilución significativa de las células 20, y permitir por tanto que las células 20, almacenadas junto con los compuestos 22, se analicen directamente en un citómetro de flujo. Se prefiere que los compuestos 22 se hayan esterilizado (por ejemplo, esterilizando mediante filtración).

35 Se puede usar una cantidad adecuada de cualquier agente anticoagulante desvelado en la técnica tal como ácido etilendiaminetetraacético (EDTA) y sus sales, ácido etilenglicoltetraacético (EGTA) y sus sales, hirudina, heparina, ácido cítrico, sales del ácido cítrico, ácido oxálico, sales del ácido oxálico, o sus mezclas. Un agente anticoagulante 24 preferido es  $K_3$ EDTA. La cantidad adecuada del agente anticoagulante 24 para la materia objeto reivindicada es la efectiva para prevenir la coagulación de las células 20 (por ejemplo, sangre completa) sin producir una dilución significativa de las células 20 (es decir, no clínicamente significativa) y permitir por tanto almacenar las células 20 con los compuestos 22, para analizarse directamente por un citómetro de flujo). Por ejemplo, en una realización preferida,  $K_3$ EDTA es el agente anticoagulante 24 y su concentración en peso/volumen es preferentemente menor de 40 aproximadamente 0,3 g/ml, más preferentemente menor de aproximadamente 0,2 g/ml, y lo más preferentemente aproximadamente menor de aproximadamente 0,15 g/ml.

45 El agente fijador 26 preferido es una urea heterocíclica (por ejemplo, diazolidinil urea (conocida como DU), imidazolidinil urea (conocida como IDU) o una mezcla de las mismas). El agente fijador más preferido es diazolidinil urea. La cantidad adecuada del agente fijador 26 para la materia objeto reivindicada es la eficaz para fijar o estabilizar las células 20 sin producir una dilución significativa de las células 20 (es decir, no clínicamente significativa) y que permita que las células 20, almacenadas junto con los compuestos 22, se analicen directamente en un citómetro de flujo. Por ejemplo, en una realización preferida, diazolidinil urea es el agente fijador 26 y su concentración en peso/volumen es preferentemente de aproximadamente menor de aproximadamente 1 g/ml, más preferentemente menor de aproximadamente 0,75 g/ml, y lo más preferentemente menor de aproximadamente 0,5 g/ml. (concentración de la solución de DU antes de que se añada la muestra de sangre).

50 Se sabe que el ácido 28 puede aumentar la relación entre la señal y el ruido durante la citometría de flujo; y por tanto, se puede añadir opcionalmente el ácido 28 como uno de los compuestos 22 en el dispositivo 100. El ácido 28 preferido es un poli(ácido policarboxílico), y más preferentemente un poli(ácido acrílico) con un peso molecular de 5.000. La cantidad adecuada del ácido 28 para la materia objeto reivindicada es la eficaz para aumentar la relación entre la señal y el ruido durante la citometría de flujo sin producir una dilución significativa en las células 20 (es decir, no clínicamente significativa) de manera que las células 20, almacenadas junto con los compuestos 22, se pueden analizar directamente mediante una citometría de flujo. Por ejemplo, en una realización preferida, el poli(ácido acrílico) con un peso molecular de 5.000 está incluido en el recipiente 10.

60 Se pueden añadir opcionalmente compuestos adicionales como uno de los compuestos 22 en el dispositivo 100. Dichos compuestos adicionales y opcionales pueden incluir: agentes permeabilizantes de células para conseguir

5 sustancialmente acceder a analitos/epítomos intracelulares y/o para lisar glóbulos rojos de la sangre; proteínas que protegen sustancialmente las células durante el procesamiento y/o reducen sustancialmente la unión no específica de las sondas; suero/lipoproteínas que protegen sustancialmente las células durante el procesamiento y/o reducen sustancialmente la unión no específica de las sondas; inhibidores de la ARNasa que inhiben sustancialmente la digestión del ARN y/o mantienen sustancialmente la integridad del ARN; estabilizantes de ácidos nucleicos que inhiben sustancialmente la degradación de los ácidos nucleicos y compuestos que contienen ácidos nucleicos; aminoácidos/polipéptidos que potencian sustancialmente la unión de sondas/anticuerpos a epítomos y/o aumentan sustancialmente la señal observable; fijadores que preservan sustancialmente la integridad de las células, especialmente de los agentes de permeabilización y pueden preservar algunos epítomos; anticoagulantes que disminuyen sustancialmente la coagulación de los glóbulos rojos, quelan el calcio y/o pueden ayudar a mantener la integridad/viabilidad de WBC; inhibidores de las proteasas que disminuyen sustancialmente la degradación de los epítomos de proteínas; antioxidantes/agentes reductores que evitan sustancialmente la hemólisis de los glóbulos rojos de la sangre y/o que evitan sustancialmente la oxidación de los péptidos, y/o mantienen sustancialmente los epítomos; colorantes de ácidos nucleicos que generalmente sirven para marcar/identificar ácidos nucleicos; carbohidratos que mantienen sustancialmente la integridad y/o la osmolaridad celular; y, poli(ácidos acrílicos) que potencian sustancialmente la unión de las sondas y/o anticuerpos a epítomos; y/o aumentan sustancialmente la señal. Un experto en la materia debe ser capaz de determinar la utilidad y las cantidades de dichos compuestos opcionales mediante ensayos rutinarios y el conocimiento de la técnica. En las múltiples realizaciones específicas, los compuestos adicionales y opcionales anteriores pueden incluir más específicamente: Agentes permeabilizantes de las células tales como: DMSO (Dimetilsulfóxido), Etilenglicol, Polietilenglicol, Glicerina, Cellosolves (etilenglicol dimetil éter) (fenoxietanol), Triton X 100, Triton X 705 (detergentes no iónicos), 1-metil-2-pirrolidinona, Tween 20, Tween 40 (no iónico), Brij 35 (detergente), Éter de polioxietileno (Poliox), Colato de sodio, Polímeros de óxido de etileno, Monensina, Monactina, Pentaclorofenol, 2,4 dinitrofenol, saponina, SDS (dodecilsulfato de sodio); Proteínas tales como: Biotina, Albúminas (por ejemplo, de bovino), Gelatina, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; inhibidores de la ARNasa tales como: inhibidor de la ARNasa derivado de placenta humana, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Estabilizantes del ácido nucleico tales como: Clorhidrato de guanidinio, Policationes tales como Polietilenimina, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Aminoácidos/polipéptidos tales como: Ácido glutámico, Glicina, Ácido aspártico, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Fijadores tales como: Aldehídos(formaldehído y glutaraldehído), Alcoholes (etanol, metanol), y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Anticoagulantes tales como: EDTA (Ácido etilendiaminetetraacético) y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; ACD (Citrato dextrosa ácida), Heparina; y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; inhibidores de las proteasas tales como: EDTA, PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo), AEBSF (fluoruro de 2-aminoetilbencenosulfonilo), y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Agentes antioxidantes/reductores tales como: Trolox, a-tocoferol, B-mercaptoetanol, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Colorantes de ácidos nucleicos tales como: DAPI (Diamidino 2-fenilindol), Yoduro de propidio, Diacetato de fluoresceína, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia; Carbohidratos tales como: Azúcares (sacarosa), celulosa, y compuestos similares a los mencionados tal como ya es conocido por un experto en la materia. Debe apreciarse que los listados específicos anteriores de los compuestos pueden contener una medida del solapamiento, que reconoce la función algunas veces solapantes de determinados compuestos específicos. Un experto en la materia debe comprender y apreciar este aspecto de la divulgación.

45 La materia objeto reivindicada permite que se transporte la composición final 30 a temperatura ambiente. Posteriormente, se prefiere que la composición final 30 se almacene a temperaturas menores de aproximadamente 40 °C. Las células 20 almacenadas en la composición final 30 tienen más de aproximadamente 3 días, preferentemente más de aproximadamente 5 días, más preferentemente más de aproximadamente 7 días de estabilidad. La materia objeto reivindicada permite que las células 20 almacenadas en la composición final 30 se analicen directamente en un citómetro de flujo sin dilución y/o tratamiento adicional ya que los compuestos 22 pueden preservar las células 20 sin diluir significativamente las células 20. Es probable que cualquier dilución significativa de las células 20 produzca errores en las mediciones de la citometría de flujo (disminuyendo, por ejemplo, el recuento de linfocitos). Para evitar una dilución significativa, los compuestos 22 (que comprenden el agente anticoagulante 24, el agente fijador 26, y opcionalmente, el ácido 28) están en formas concentradas, preferentemente en una relación con la composición final 30 que es menor de aproximadamente 2:100, más preferentemente menor de aproximadamente 1,5:100 y lo más preferente menor de aproximadamente 1:100.

60 El dispositivo 100 puede estar incluido en un kit de la materia objeto reivindicada que contiene los componentes 32 (no se muestran) convencionalmente utilizados para recoger y analizar las células 20 tal como un hisopo de alcohol, gasa, gradilla para tubos, torniquete, guante, tubos adicionales de recogida de células (con o sin aditivos convencionales de análisis de células en el interior de dichos tubos), aguja (con conector, parte de un conjunto de jeringa que incluye cilindro y émbolo, o con aletas conectadas mediante un conector a otra aguja para el suministro al dispositivo 100 u otros tubos de recogida), lanceta, tira adhesiva, jeringa, tira reactiva (que permita que las células 20 fluyan directamente sobre una tira de vidrio o plástico que contiene reactivos para el análisis de células), tiras de vidrio o de plástico que contienen reactivos para el análisis de células (por ejemplo, inmunoensayo), medios de empaquetado (por ejemplo, bolsas de plástico, cerramiento de plástico compartimentado, y similares) para almacenar los

componentes 32 deseados y el dispositivo 100 y medios de empaquetado para transportar las células 20 almacenadas en el dispositivo 100 después de la recogida. Se prefiere que los medios de empaquetado y cualesquiera otros componentes 32 puedan ponerse en contacto físico con las células 20 que se van a esterilizar y que los medios de empaquetado se construyan para mantener este entorno estéril.

- 5 A diferencia de los agentes fijadores histológicos típicos, el agente fijador 26 de la materia objeto reivindicada tiene una toxicidad extremadamente baja. Por ejemplo, los estudios de toxicidad que comparan diazolidinil urea, con el formaldehído de la técnica anterior muestran lo siguiente:

	TOXICIDAD POR INHALACIÓN	TOXICIDAD DÉRMICA	DL50
Formaldehído	500 mg/kg	270 mg/kg	800 mg/kg
Diazolidinil Urea	Ninguno	2000 mg/kg	2570 mg/kg

10 Esta toxicidad reducida hace que la eliminación y la manipulación sean menos problemáticas. Además, como no existe toxicidad por inhalación, no existen dispositivos de detección en forma de distintivo como los necesarios para el formaldehído.

Otra ventaja ofrecida por el agente fijador 26 es el hecho de que no es inflamable y, por tanto, no presenta riesgo de incendio como muchos de los agentes fijadores de la técnica anterior.

15 El mecanismo por el cual el agente fijador 26 proporciona la estabilización del tejido y la membrana celular deseados no se sabe con certeza. Se cree que el agente fijador se une de alguna manera con la membrana celular o el tejido. Se ilustra esta hipótesis ya que muchos elementos del agente activo son conocidos desinfectantes, que destruyen bacterias uniéndose a la estructura celular. Esto no es una explicación completa del mecanismo responsable de los resultados de la materia objeto reivindicada ya que otros muchos desinfectantes tales como KATHON y OMADINE no consiguen proporcionar efectos estabilizantes al tejido y a las células.

20 La capacidad del agente fijador 26 para preservar sitios antigénicos tampoco se comprende, pero se debe probablemente a una diferencia en la reacción entre las proteínas y el agente fijador 26 en comparación con los conservantes de la técnica anterior tales como reticulaciones de formaldehído-formaldehído consigo mismo y las proteínas para tapar el antígeno. Para determinar si esto es verdadero, se añadió diazolidinil urea a la proteína, albúmina. Tras la incubación de mezcla de diazolidinil urea y a proteínas durante 24 horas, la electroforesis en disco-gel no indicó cambio en la tasa de migración de la proteína. Cuando se llevó a cabo este experimento con formaldehído, dio como resultado un gran número de proteínas insolubles, y se alteró la migración electroforética.

25 En referencia a la FIG. 2, el procedimiento para preparar el dispositivo 100 de la materia objeto reivindicada comprende proporcionar el tubo 12 que tiene el extremo abierto 14 y el extremo cerrado 16 (202). Se prefiere que el tubo 12 sea estéril. El procedimiento comprende además precargar (es decir, introducir) los compuestos 22 que comprenden el agente anticoagulante 24, el agente fijador 26, y opcionalmente el ácido 28 en el tubo 12 usando los procedimientos desvelados en la técnica (204). Los tipos y las cantidades del agente anticoagulante 24, el agente fijador 26, y opcionalmente, el ácido 28 que incluye la relación entre los compuestos 22 y la composición final 30 son los mismos que se han descrito anteriormente para el dispositivo 100 de la materia objeto reivindicada. Se prefiere que los compuestos hayan sido esterilizados (por ejemplo, mediante filtración estéril). El procedimiento para precargar la etapa 204 puede incluir opcionalmente la criodsecación de los compuestos en el tubo 12. El procedimiento 200 incluye además insertar el cierre 18 en el extremo abierto 14 del tubo 12 (206). El procedimiento 200 incluye además aplicar un vacío en el interior del tubo 12 hasta un nivel predeterminado (208) utilizando los procedimientos desvelados en la técnica. La cantidad de vacío que se va a aplicar es dependiente de la naturaleza y el volumen de las células que se desean recoger y preservar. Por ejemplo, para la recogida de sangre completa, el vacío debe aplicarse a un nivel que permita que la presión de la sangre completa haga que esta fluya hacia el interior y llene el tubo 12 hasta el nivel deseado. El procedimiento 200 puede incluir opcionalmente proporcionar los componentes 32 convencionalmente usados para recoger y analizar las células 20. Los componentes 32 son los mismos que para el dispositivo 100 de la materia objeto reivindicada que se ha descrito anteriormente.

35 El procedimiento puede incluir opcionalmente también recoger las células 20 usando los procedimientos desvelados en la técnica (por ejemplo, venopunción, uso de una lanceta, etc.). Puede opcionalmente incluir cribar las células 20 usando instrumentos desvelados en la técnica tales como citómetros de flujo (por ejemplo, FACScan, FACSCalibur de BD y EPICS de Beckman Coulter), otros instrumentos de hematología son (por ejemplo, H3 de Bayer Corporation, el Beckman Coulter STKS o Gen-S Systems, el Abbott Cell-Dyn 4000 Hematology System, Bayer ADVIA 120 System, el Sysmex XE2100 System, y similares. El cribado de las células puede tener para cualquier fin, incluyendo, aunque no de forma limitativa, para el VIH, VPH, hepatitis, leucemia, cáncer y similares; otros cribados desvelados en la técnica tales como inmunoensayo, panel del SIDA, y similares; y el cribado mediante los procedimientos desvelados en la patente de Estados Unidos n.º 4.788.139 de titularidad compartida (Ryan) titulada "Platelet aggregation reagent, reagent container and method of determining platelet aggregation in EDTA-anticoagulated blood", que se ha incorporado por referencia al presente documento. Las células 20 recogidas y preservadas usando la materia objeto reivindicada pueden someterse a estudios histológicos de cualquier manera convencional conocida, tal como mediante el uso de equipo de corte de parafina, tinción, montaje en portas, u otras etapas comunes utilizadas antes del

microscopio u otro examen. La materia objeto reivindicada proporciona una solución segura, conveniente, y eficaz de recoger y preservar células para el análisis.

5 Debe señalarse que los expertos en la materia pueden usar la materia objeto reivindicada para preservar sitios antigénicos sobre o en o dentro de las células (o componentes de las mismas) derivados de cualquier fuente que incluya sangre normal, médula ósea, tejidos linfáticos o sólidos, o pueden derivarse de tejidos anómalos tales como leucemias o cánceres de tejidos sólidos. La materia objeto reivindicada se puede utilizar también con cualquier componente celular o material biológico que tenga al menos un sitio antigénico.

10 Debe señalarse que en las realizaciones preferidas de la materia objeto reivindicada se evita el agrupamiento celular, se preservan las propiedades de dispersión de la luz, se preservan los sitios antigénicos, y se pueden analizar los ácidos nucleicos.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso para estabilizar dentro de un tubo una muestra de células de sangre completa, epiteliales o del líquido cefalorraquídeo extraídas al interior del tubo para su análisis posterior en no más de 2 partes de una mezcla de un anticoagulante y un fijador por 100 partes de la muestra de anticoagulante y el fijador de la muestra, en el que el fijador (26) es seleccionado entre el grupo que consiste en diazolidinil urea e imidazolidinil urea y el anticoagulante comprende ácido etilendiaminatetraacético o sales del mismo.
2. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que la cantidad del anticoagulante es tal que proporciona menos de aproximadamente 0,3 g/ml.
- 10 3. El uso de acuerdo con la Reivindicación 1 o la Reivindicación 2 en el que la cantidad del fijador es tal que proporciona menos de aproximadamente 1 g/ml.
4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3 en el que la composición contiene un poli(ácido acrílico).
- 15 5. Un procedimiento de preparación de células de sangre completa, epiteliales o del líquido cefalorraquídeo para su análisis que comprende extraer una muestra de células bajo un vacío al interior de un tubo en el que el tubo contiene una composición estabilizante que comprende una mezcla de un fijador y un anticoagulante, en el que el fijador es seleccionado entre diazolidinil urea e imidazolidinil urea y el anticoagulante es seleccionado entre ácido etilendiaminatetraacético y sales del mismo en el que la cantidad de composición estabilizante dentro del tubo proporciona menos de 2 partes por 100 partes del anticoagulante y el fijador de la muestra cuando la muestra es sumergida en el tubo.
- 20 6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la composición estabilizante incluye glicina.
7. El procedimiento de la Reivindicación 5 o la Reivindicación 6 en el que las células son transportadas para su análisis a temperatura ambiente.
- 25 8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, que incluye transportar la muestra de células a temperatura ambiente para su análisis directamente mediante citometría de flujo sin dilución o tratamiento adicional.
9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que la concentración de diazolidinil urea es menor de 1 g/ml.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el que el anticoagulante es K<sub>3</sub>EDTA y la concentración de dicho anticoagulante es menor de 0,3 g/ml.
- 30 11. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en el que el procedimiento incluye cribar dicha muestra de células para el análisis de cánceres de tejidos sólidos.
12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 11, en el que la composición estabilizante en el tubo proporciona menos de 1 parte por 100 partes de la muestra, el anticoagulante y el fijador.
- 35 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, que incluye extraer la muestra de sangre mediante venopunción.
14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en el que el tubo es de plástico transparente.

FIG. 1

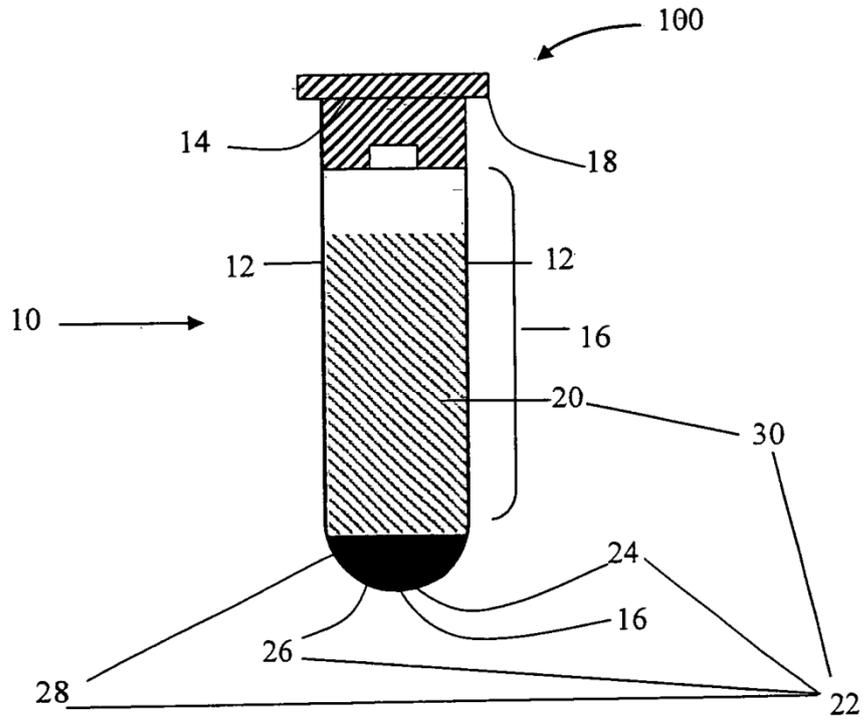


FIG. 2

