(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 264 403**

(21) Número de solicitud: 200601682

(51) Int. Cl.:
G01N 33/80 (2006.01)
G01N 33/96 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN B1

(22) Fecha de presentación: **22.06.2006**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **16.12.2006**

Fecha de la concesión: **25.09.2007**

(45) Fecha de anuncio de la concesión: **01.11.2007**

(45) Fecha de publicación del folleto de la patente: **01.11.2007**

(73) Titular/es: **GRIFOLS S.A.**
Marina, 16-18, T. Mapfre, Pl. 26
08005 Barcelona, ES

(72) Inventor/es: **Martorell Pena, Daniel;**
Través Polo, María del Carmen;
Farré León, Jordi y
Castells Parera, Josefina

(74) Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

(54) Título: **Medio de suspensión de hematíes.**

(57) Resumen:
Medio de suspensión de hematíes.
El medio de suspensión de hematíes comprende una combinación de aminoácidos de cualquier grupo, así como tampón fosfato, cloruro sódico, glucosa, adenina, conservantes, EDTA y glicina, y además inosina, citrato, ácido cítrico y bicarbonato, siendo las concentraciones de los aminoácidos superiores a las necesarias para disminuir la fuerza iónica.

ES 2 264 403 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Medio de suspensión de hematíes.

Sector al que pertenece la invención

La presente invención concierne a nuevo medio de suspensión de hematíes para la realización de las principales pruebas inmunohematológicas de aglutinación que requieren de eritrocitos que se llevan a cabo en los hospitales y centros de transfusión sanguínea. La determinación del grupo sérico, la detección e identificación de anticuerpos irregulares, la preparación de controles positivos y negativos, y la necesidad de conservar muestras para la investigación de resultados anómalos, requieren de hematíes resuspendidos en un medio acuoso que mantengan su funcionalidad.

Estado de la técnica

El avance clínico que supuso la transfusión sanguínea conllevó un desarrollo de la inmunohematología. Sin ello no hubieran sido posibles el número de transfusiones que se realizan actualmente en víctimas de accidentes, en cirugía o en el tratamiento de leucemia, cáncer y otras enfermedades. En España, se realizaron durante el año 2004 un total de 1,6 millones de donaciones de sangre (1), en EE.UU., se valora alrededor de 15 millones las bolsas de sangre donadas por año (2) y la Organización Mundial de la Salud a partir de los datos de 178 países estima en 81 millones las unidades de sangre total donadas anualmente (3). Este número de donaciones no seria útil sin una determinación inmunohematológica previa. Los principales grupos sanguíneos que se determinan son el sistema ABO y el sistema RH, y particularmente de este segundo sistema, el antígeno D (RH1).

En una situación de emergencia todos los individuos podemos recibir hematíes o glóbulos rojos del grupo O y los individuos AB pueden recibir glóbulos rojos de cualquier grupo ABO. De ahí que los individuos del grupo O son conocidos como donantes universales y los individuos AB como receptores universales. La aceptación de glóbulos rojos o hematíes procedentes de una persona de un determinado grupo sanguíneo por parte de otra persona, está condicionada por los anticuerpos presentes en el plasma de la persona receptora. Así, los individuos del grupo O tienen anticuerpos contra antígenos A y B, los individuos del grupo A anticuerpos contra B, viceversa por los individuos del grupo B, y no presentan anticuerpos los individuos del grupo AB. En consecuencia, no los hematíes, pero sí el plasma de los individuos AB, puede ser donado a todos los grupos sanguíneos.

La base del análisis inmunológico es pues la determinación del grupo ABO y el grupo RH. El sistema ABO se determina por antígenos y anticuerpos (conocidos como anticuerpos regulares), mientras que el sistema RH y los otros sistemas solo presentan anticuerpos (conocidos como anticuerpos irregulares) como consecuencia del embarazo y de la practica transfusional. Sin embargo, a pesar de su baja frecuencia en la población, la determinación de anticuerpos irregulares es de cabal importancia y se va implementando en todos los hospitales y centros de transfusión sanguínea para evitar riesgos y lograr transfusiones de alta seguridad. También se han implementado las determinaciones neonatales, tanto para diagnosticar posibles enfermedades hemolíticas del recién nacido, como para profilaxis a realizar a la madre en caso que sea Rh - (carece del antígeno D) y el hijo sea Rh + (presenta en antígeno D).

En inmunohematología, la introducción de nuevas tecnologías para el tipaje de hematíes, pruebas de compatibilidad y detección de anticuerpos regulares e irregulares, han representado los avances más significativos en esta área. Las mejoras han estado relacionadas con los componentes que favorecen la aglutinación específica (e.g. solución de Coombs, solución LISS [solución de baja fuerza iónica], soluciones con albúmina, soluciones con enzimas proteolíticos u otros potenciadores de la unión antígeno-anticuerpo), la mejora de anticuerpos reactivos (e.g. anticuerpos monoclonales), así como aportándose metodologías nuevas o sustancialmente diferentes para visualizar la aglutinación (e.g. microplaca y técnica en gel). La aparición de la técnica de microtubos en columna, también conocida como técnica en gel o tarjeta, presenta la base para la modernización de la inmunohematología. Desde su aparición en 1986 la técnica de microtubos en columna (4) no ha dejado de experimentar un crecimiento espectacular. Debido a su facilidad de automatización esta metodología desplazará al resto de técnicas, preveyéndose como la única que permanecerá para la determinación fenotípica. Conjuntamente con la técnica genotípica que prevalezca formarán la base del análisis inmunológico. Actualmente, la mayoría de metodologías para la determinación genotípica se encuentran en fases preliminares, a unos costes limitados a laboratorios de investigación.

La técnica en gel separa las células aglutinadas de las que no han aglutinado a través de una centrifugación en una matriz de filtración formada por pequeñas bolas de gel (EP 194212, EP 305337), de vidrio u otro material esférico (EP 485228, EP725276, EP 755719). En la parte superior del microtubo, cámara de reacción, situada sobre la columna del gel, se dispensan las muestras. En la columna donde está contenido el gel o matriz de filtración, hay una solución tamponada que dependiendo del análisis puede contener anticuerpos específicos (e.g. anti-A, anti-B o anti-D) o antiglobulina humana (anticuerpos anti-IgG o anti-IgM humanos), conocida como solución de Coombs. La matriz de filtración son partículas esféricas que sedimentan en una solución acuosa tamponada. Para visualizar la aglutinación inmunohematológica se centrifuga, forzando las células (hematíes) a que atraviesen la matriz de filtración. El espacio que queda entre partículas es suficientemente grande para dejar pasar las células que no han aglutinado, es decir células individuales. Mientras que en el caso que haya habido aglutinación las células aglutinadas quedan retenidas entre las bolas. Aunque estrictamente se trata de una técnica cualitativa, el recorrido a través de la matriz de filtración permite distinguir distintos grados de aglutinación. En muestras positivas en la parte superior del gel quedarán retenidos los aglutinados muy fuertes, mientras que aglutinados débiles podrán realizar un cierto recorrido a través de la matriz,

quedándose por ejemplo a mitad de camino. La ausencia de aglutinación hará que todas las células alcancen la base del microtubo (reacción negativa). Tal y como ocurre en inmunohematología clásica, debido al intenso color rojo de los hematíes, la técnica no requiere de ningún marcador o amplificador de la unión antígeno (hematíes) - anticuerpos.

La técnica en gel ha permitido separar físicamente los resultados positivos de los negativos, i.e. los positivos en la parte superior del gel (aglutinado de alta intensidad), a lo largo de la columna (aglutinados medios o débiles), y en la parte inferior de la columna los resultados negativos (hematíes no aglutinados).

En las pruebas de inmunohematología para la detección de anticuerpos regulares e irregulares en plasma o suero, se utilizan hematíes reactivo. Dichos hematíes se preparan en una solución con la finalidad de mantener su funcionalidad e integridad durante un cierto periodo de tiempo, habitualmente entre 1 y 4 semanas. En los laboratorios de banco de sangre o responsables de transfusiones sanguíneas se seleccionan los hematíes con antígenos específicos para que puedan servir como hematíes reactivo en cada una de las pruebas de inmunohematología. Las combinaciones necesarias para preparar las células de screening, conjunto de 2, 3 o 4 hematíes con especificidades antigénicas concretas que permiten detectar anticuerpos, o los paneles, conjunto de 11 o más hematíes que permiten identificar la especificidad de los anticuerpos detectados, no son de fácil elaboración e incluso pueden llegar a ser complicadas en centros medianamente grandes. Las dificultades de obtener dichas células de screening o paneles, sumado a la necesidad de prepara estos hematíes reactivo a menudo, son bien conocidas por cualquier experto en la materia, así como la necesidad imprescindible de disponer de una solución de suspensión de hematíes o diluyente de hematíes. Adicionalmente también se preparan células de screening o paneles con un tratamiento enzimático (e.g. papainización) para potenciar la reactividad de determinados grupos sanguíneos. Los grupos sanguíneos potenciados por este tratamiento son bien conocidos por cualquier experto en la materia.

Actualmente se utilizan soluciones diluyentes que son variaciones de la solución de Alsever originaria. Estas soluciones contienen de forma general un anticoagulante (e.g. citrato), un tampón fosfato, una fuente energética (e.g. glucosa), purinas y nucleósidos (e.g. adenina y inosina), cloruro de sodio, y conservantes (antibióticos). Sin embargo, los hematíes reactivo preparados con estas soluciones tradicionales pueden presentar problemas en la tecnología en gel. La separación física que ha permitido la tecnología en gel puede verse afectada porqué a menudo una parte de los hematíes no aglutinados quedan retenidos a lo largo de la columna. Esta retención inespecífica provoca resultados falsos positivos ya que se confunde con un aglutinado medio o débil.

La solución de suspensión de los hematíes reactivo debe permitir mantener las características funcionales y su capacidad de atravesar la columna de gel hasta la parte baja de la columna en caso que no hayan aglutinado. Estas características deben mantenerse durante el máximo tiempo posible debido a las dificultades expuestas anteriormente de preparación de hematíes en los laboratorios de inmunohematología. Los parámetros que deben mantenerse constantes a lo largo de este periodo son entre otros, el pH, la osmolaridad y la fuerza iónica. Así mismo es imprescindible proporcionar glucosa y adenina para que los hematíes mantengan su viabilidad. El conjunto y la concentración de estas sustancias provocan un aumento de la fuerza iónica que se reduce con la adición de glicina. Los hematíes han perdido el núcleo genético y toda capacidad de biosíntesis por lo que la adición de este aminoácido no está relacionada para nada con la síntesis proteica.

Descripción de la invención

En las investigaciones realizadas por los inventores para reducir la pérdida de especificidad que se observa en los hematíes reactivo, han descubierto que sorprendentemente, la adición en estas soluciones diluyentes de hematíes reactivo de combinaciones de aminoácidos aparte de la glicina, en concentraciones superiores a las necesarias para disminuir la fuerza iónica, permite reducir la perdida de especificidad que se observa en los hematíes reactivo, es decir reduce considerablemente la retención inespecífica de hematíes no aglutinados a lo largo de la columna de gel.

Por esta razón, se describen en la presente solicitud de patente las composiciones de soluciones diluyentes para hematíes reactivo que permiten mantener la integridad y funcionalidad de los hematíes reactivo a lo largo de un período de tiempo prolongado, por ejemplo, 8 semanas. Durante este período de tiempo los hematíes conservan su capacidad de pasar a través del gel o cualquier otro espacio estrecho y la capacidad de no aglutinar inespecíficamente, manteniendo la característica de deformabilidad, integridad y antigenicidad, por lo que pueden ser utilizados como reactivo inmunohematológico para la determinación del grupo sérico, prueba de detección de anticuerpos regulares, y en la investigación e identificación de anticuerpos irregulares.

La incorporación de las combinaciones de aminoácidos según la invención en una solución diluyente o medio de suspensión de hematíes mantiene los hematíes en un estado de integridad y características de funcionalidad que permiten su uso en la tecnología en gel. El paso de los hematíes a través de una matriz de gel no presenta una retención diferente entre los hematíes frescos (tiempo inicial de preparación de la suspensión) y los conservados durante 8 semanas. Es decir, los aminoácidos incorporados en la solución diluyente permiten mantener a los hematíes las características físicas iniciales de los hematíes frescos. Cuando más tiempo tienen las preparaciones de hematíes más posibilidades existen que aparezcan resultados falsos positivos. Los hematíes reactivo son células vivas por lo que la degradación en un tiempo relativamente corto es perfectamente conocida por cualquier experto en la materia.

La técnica en gel permite una cuantificación visual entre aglutinados de distinto tamaño. Habitualmente los resultados de la aglutinación se asignan con una graduación en score similar a la de la Tabla 1. Tal y como se ha descrito

anteriormente hematíes no aglutinados, hematíes que deberían encontrarse al fondo de la columna, pueden presentar resultados similares a +/- y 1+ que llevarían a un diagnostico erróneo, a una interpretación positiva errónea.

TABLA 1

Interpretación	Grado	Score	Descripción
Negativo:	-	0	Banda de hematíes en el fondo de la columna, resto de la columna sin aglutinados visibles.
Positivo:	+/-	3	Escasos aglutinados de pequeño tamaño en la mitad inferior de la columna, con hematíes al fondo de la columna.
	1+	5	Algunos aglutinados de pequeño tamaño en la columna.
	2+	8	Aglutinados de tamaño pequeño o mediano a lo largo de la columna.
	3+	10	Banda superior de aglutinados, de tamaño mediano en la mitad superior de la columna.
	4+	12	Banda de hematíes aglutinados en la parte superior de la columna.

La adición de las combinaciones de aminoácidos de acuerdo con la presente invención en un líquido que contenga los componentes habituales y conocidos por cualquier experto en la materia, reduce considerablemente las retenciones inespecíficas de los hematíes reactivo. Estos componentes son tampón fosfato, cloruro sódico, glucosa, adenina, conservantes (e.g. cloramfenicol y neomicina), EDTA y glicina.

La concentración de cada uno de los aminoácidos que forman las combinaciones de aminoácidos de la presente invención, pude variar de acuerdo con su solubilidad en soluciones acuosas y de manera que en su conjunto la osmolaridad total de la solución diluyente de hematíes se encuentre en un rango de 100-700 miliosmol/kg.

A continuación se describen ejemplos de combinaciones de aminoácidos en una solución de suspensión de hematíes de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, si en un líquido base sin aminoácidos (líquido #1) se añaden aminoácidos (líquido #2) el número total de falso positivos que se obtiene en 50 determinaciones individuales durante 10 semanas se reduce de 13 a cero en un screening de dos células en técnica Coombs para anticuerpos irregulares.

Cabe mencionar que 10 semanas desde la fabricación de los hematíes reactivo es un tiempo que sobrepasa los limites tradicionales de conservación de los hematíes reactivo. Otra forma de cuantificar las diferencias entre líquidos es comparar los scores medio obtenidos a partir de todas las determinaciones individuales. Los scores medios obtenidos en 50 determinaciones de 10 viales evaluados durante 10 semanas para el líquido #1 y el líquido #2 son, respectivamente, de 2,44 y 1,52. Para una técnica de screening de 2 células con hematíes papainizados el número de falsos positivos se reduce de 40 a 7 entre el líquido sin aminoácidos (líquido #1) y el líquido con aminoácidos (líquido #2). Los 7 falsos positivos se han obtenidos en la semana 10, mientras que los falsos positivos del líquido #1 se obtienen en tiempos inferiores desde la preparación de la suspensión. Comparando los scores medio en esta técnica de screening de 2 células con hematíes papainizados también se muestran claramente las diferencias entre líquidos, siendo el valor de score medio de 50 determinaciones para el líquido #1 y el líquido #2, de 5,92 y 1,84, respectivamente.

Líquido #1

Ingredientes	Concentración (g/L)
KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico anhidro)	1,36
Na_2HPO_4 (Fosfato disódico)	1,42
Cloramfenicol	0,17
Neomicina	0,10
NaCl	1,0
Dextrosa (D-Glucosa anhidra)	3,5
Adenina	0,02
EDTA (disódico dihidratado)	2,80
Glicina	14,70

Líquido #2

Ingredientes	Concentración (g/L)
KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico anhidro)	1,36
Na_2HPO_4 (Fosfato disódico)	1,42
Cloramfenicol	0,17
Neomicina	0,10
NaCl	1,0
Dextrosa (D-Glucosa anhidra)	3,5
Adenina	0,02
EDTA (disódico dihidratado)	2,80
Glicina	14,70
L-Valina	3,20
L-Metionina	2,52
L-Leucina	2,60
L-Isoleucina	6,48

Si en un líquido base (e.g. líquido #1) se incorporan aparte de los aminoácidos otros componentes descritos y utilizados ampliamente en soluciones de hematíes como inosina, citrato, ácido cítrico y bicarbonato (e.g. líquido #3) el efecto de los aminoácidos aún puede ser mayor. En el caso de un screening de dos células en técnica Coombs para anticuerpos irregulares no se obtienen falsos positivos en 50 determinaciones durante 10 semanas y el score medio es de 0,96. En el screening de dos células papainizadas tampoco se obtienen falsos positivos y el score medio es de 0,80.

Líquido #3

Ingredientes	Concentración (g/L)
KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico anhidro)	0,30
Na_2HPO_4 (Fosfato disódico)	0,28
Cloramfenicol	0,17
Neomicina	0,10
NaCl	1,00

(Continuación)

Ingredientes	Concentración (g/L)
Dextrosa (D-Glucosa anhidra)	3,50
Adenina	0,02
EDTA (disódico dihidratado)	2,80
Inosina	0,02
$NaHCO_3$	0,80
Na_3 Citrato dihidratado	2,00
Ácido cítrico monohidratado	0,18
Glicina	6,00
L-Valina	3,20
L-Metionina	2,52
L-Leucina	2,60
L-Isoleucina	6,48

Se ha descrito (5) que determinados antígenos de grupos sanguíneos (*M, P1, Fy*^{a}*, Fy*^{b}*, S y s*) pueden perderse o reducir su antigenicidad al resuspender los hematíes en soluciones de baja fuerza iónica. La adición de aminoácidos no altera la expresión de dichos antígenos observándose la misma reactividad, potencia antigénica, desde la preparación de la suspensión hasta las 10 semanas de esta, i.e. durante el tiempo de vida útil del producto.

La hemólisis observada en los líquidos que incorporan aminoácidos es inferior a la obtenida con el líquido sin aminoácidos o solo con glicina. Lo que indica que la adición de estas sustancias no altera negativamente la fragilidad osmótica de la célula.

En el caso de los hematíes reactivo para la determinación del grupo sérico, es decir la detección de anticuerpos regulares, las suspensiones de hematíes que incorporan aminoácidos muestran un funcionamiento correcto.

En técnicas de grupo sérico con un líquido base sin aminoácidos, liquido #1, en 240 determinaciones utilizando 4 células de grupo sérico (A_1, A_2, B y O) durante 10 semanas se obtiene 187 falsos positivos, mientras que si se añaden aminoácidos, liquido #2 y líquido #3, el número total de falso positivos se reduce a cero. Los falsos positivos del líquido #1 se obtienen a partir de las 2 y 4 semanas desde la preparación de la suspensión de hematíes, mientras que con los líquidos que incorporan aminoácidos a las 10 semanas desde su fabricación aún no se observan falsos positivos. Los scores medio de 240 determinaciones utilizando 4 células de grupo sérico, con 10 viales para cada célula, evaluados durante 10 semanas para el líquido #1, líquido #2 y líquido #3, son respectivamente, de 4,06, 1,37 y 0,94.

La adición de aminoácidos distintos de la valina, leucina, isoleucina y metionina, los tres primeros pertenecientes a los alifáticos no polares y el último a los que contienen azufre, también provoca el efecto de disminución de las retenciones inespecíficas. Por ejemplo, con el líquido #4 que contiene aminoácidos alifáticos no polares, aromáticos, hidrofílicos y polares con carga positiva, negativa o neutra, se obtiene igualmente una disminución de las retenciones inespecíficas de hematíes en la columna de gel.

Líquido #4

Ingredientes	Concentración (g/L)
KH_2PO_4 (Fosfato monopotásico anhidro)	0,30
Na_2HPO_4 (Fosfato disódico)	0,28
Cloramfenicol	0,17
Neomicina	0,10
NaCl	1,00
Dextrosa (D-Glucosa anhidra)	3,50
Adenina	0,02
EDTA (disódico dihidratado)	2,80
Inosina	0,02
$NaHCO_3$	0,80
Na_3 Citrato dihidratado	2,00
Ácido cítrico monohidratado	0,18
Glicina	6,00

(Continuación)

Ingredientes	Concentración (g/L)
L-Valina	1,60
L-Metionina	1,26
L-Leucina	1,30
L-Isoleucina	3,24
L-Fenilalanina	2,00
L-Lisina	1,22
L-Histidina	0,50
L-Triptófano	0,50
L-Arginina	1,60
L-Treonina	1,10

Gracias a la presente invención ha sido posible ampliar notablemente la vida útil en almacenamiento de suspensiones de hematíes con finalidad de análisis desde el periodo habitual de cuatro semanas a un periodo mínimo de ocho semanas, tal como resulta de las pruebas llevadas a cabo.

Bibliografía

(1) Federación Española de donantes de sangre. www.donantesdesangre.net. Julio 2005.

(2) *Facts about blood*. American Association of Blood Banks (2004).

(3) *Global Database on Blood Safety: Report 2001-2002*. Blood Transfusion Safety, Essential Health Technologies, World Health Organization. Geneva, Switzerland.

(4) *The gel test: A new way to detect cell antigen-antibody reactions*. Y. **Lapierre** *et al*. Transfusion 33:639-643 (1990).

(5) *The preservation of red cell antigens at low ionic strength*. J.C. **Allan** *et al*. Transfusion 30:423-426 (1990).

Si bien la invención se ha descrito con respecto a ejemplos de realizaciones preferentes, éstos no se deben considerar limitativos de la invención, que se definirá por la interpretación más amplia de las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Medio de suspensión de hematíes reactivo del tipo utilizado en técnicas de análisis que requieren hematíes, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos de cualquier grupo.

2. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, del tipo que contiene tampón fosfato, cloruro sódico, glucosa, adenina, conservantes, EDTA y glicina.

3. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizada** por comprender además inosina, citrato, ácido cítrico y bicarbonato.

4. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** porque las concentraciones de los aminoácidos son superiores a las necesarias para disminuir la fuerza iónica.

5. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos alifáticos.

6. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 5, **caracterizada** por comprender una combinación de los aminoácidos alifáticos: Glicina, L-Alanina, L-Valina, L-Leucina y L-Isoleucina.

7. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos alifáticos, aminoácidos aromáticos y aminoácidos que contienen azufre.

8. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 7, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos alifáticos y de los aminoácidos: L-Fenilalanina, L-Tirosina, L-Triptófano, L-Metionina y L-Cisteína.

9. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de los aminoácidos: L-Valina, L-Metionina, L-Leucina, L-Isoleucina.

10. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos hidrofóbicos y hidorofílicos.

11. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos alifáticos y de aminoácidos polares sin carga, cargados positivamente y cargados negativamente.

12. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 11, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos alifáticos y de los aminoácidos: L-Serina, L-Treonina, L-Cisteína, L-Metionina, L-Asparagina, L-Glutamina, L-Lisina, L-Arginina, L-Histidina, L-Aspártico y L-Glutámico.

13. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos alifáticos, polares neutros o con carga (positiva y/o negativa) y aromáticos.

14. Medio de suspensión de hematíes reactivo, según la reivindicación 1, **caracterizada** por comprender una combinación de aminoácidos no polares y polares.

15. Utilización del medio de suspensión de hematíes, según las reivindicaciones 1-14, en técnicas de análisis inmunohematológico en gel o microtubos en columna.

16. Utilización del medio de suspensión de hematíes, según las reivindicaciones 1-14, en técnicas inmunohematológicas que requieren hematíes reactivo.

17. Utilización del medio de suspensión de hematíes, según las reivindicaciones 1-14, en técnicas de análisis que requieren hematíes.

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 264 403

(21) Nº de solicitud: 200601682

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **22.06.2006**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

(51) **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ES 2126521 A1 (CENTRO DE TRANSFUSION DE LA COMUNIDAD VALENCIANA) 13.06.1999, descripción; reivindicación 6.	1-5,15-17
X	WO 2004072306 A1 (KIWI INGENUITY LIMITED) 26.08.2004, página 16.	1-5,15-17
X	EP 0266194 A2 (SMITHKLINE BECKMAN CORPORATION) 04.05.1988	1-5,15-17
A	GREY D. et al. Çomparison of low ionic diluents for use with the Diamed antiglobulin gel test". Transfusion Medicine. 2002. Vol. 12, Nº 1, páginas 63-69.	1-17
A	DE CASTILHO LM. et al. "Evaluation of recent techniques for detection of red blood cell antibodies in sera of reference samples, patients, pregnant women, and blood donors". J Clin Lab Anal. 1996. Vol. 10, Nº 5, páginas 250-256.	1-17

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	Examinador	Página
17.11.2006	J. Manso Tomico	1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N 33/80 (2006.01)
G01N 33/96 (2006.01)
A61K 31/198 (2006.01)
C12N 5/06 (2006.01)