

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 456**

51 Int. Cl.:

A61B 10/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2005 PCT/GB2005/002641**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2006 WO06003447**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2005 E 05762810 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 1776048**

54 Título: **Dispositivo para el muestreo de células colorrectales**

30 Prioridad:

07.07.2004 GB 0415277

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

07.03.2017

73 Titular/es:

**COLONIX LIMITED (100.0%)
Thavies Inn House, 3-4 Holborn Circus
London EC1N 2HA, GB**

72 Inventor/es:

**LOKTIONOV, ALEXANDRE;
BANDALETOVA, TATIANA;
LLEWELYN, ANDREW HUMPHREY;
FERRETT, COLIN GEORGE;
LYWOOD, RUPERT CHARLES GIFFORD y
LYWOOD, HUGO GEOFFREY GIFFORD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 604 456 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

Dispositivo para el muestreo de células colorrectales

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un dispositivo para tomar una muestra de células exfoliadas de la superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, y a un kit que comprende dicho dispositivo. Asimismo, en este documento se describen métodos de muestreo de células colorrectales usando dicho dispositivo.

Antecedentes de la invención

10 El cáncer colorrectal esporádico (CRC) es una de las enfermedades oncológicas mortales que afectan con mayor frecuencia a los habitantes de países occidentales desarrollados. Afecta de manera predominante a personas mayores de 50 años.

15 Un obstáculo importante para el diagnóstico precoz del CRC es la ausencia de manifestaciones clínicas tempranas y fácilmente identificables en la mayoría de los casos. La enfermedad se diagnostica con facilidad sólo en sus etapas avanzadas, cuando se han formado tumores de mayor tamaño, cuyos resultados son dolor, hemorragias y síntomas de obstrucción. Sin embargo, las etapas finales de la enfermedad se asocian también con tumores invasivos o metastásicos. De este modo, la detección de tumores colorrectales antes de alcanzar las fases avanzadas de la enfermedad aumentaría de manera importante las posibilidades de una intervención quirúrgica exitosa y los índices globales de supervivencia.

20 Debido a la ausencia de indicaciones clínicas precoces y fácilmente identificables, durante décadas se han investigado métodos analíticos apropiados para el CRC. Desgraciadamente, en la actualidad no existe ninguna técnica analítica del CRC que combine una baja invasividad, simplicidad y coste reducido con niveles elevados de sensibilidad y especificidad. Dos métodos de análisis del CRC son la colonoscopia/sigmoidoscopia flexible y la prueba de sangre oculta en heces (FOBT, por sus siglas en inglés) [Rennert, G., *Recent Results Cancer Res.* 2003; 163: 248-253, Atkin, W., *Scand. J. Gastroenterol. (Suppl.)* 2003; 237: 13-16, Walsh, J.M. y Terdiman J.P. *JAMA* 2003; 289: 1288-1296]. No obstante, estos dos métodos exhiben inconvenientes importantes.

25 La colonoscopia/sigmoidoscopia flexible se considera un procedimiento diagnóstico preciso y fiable, si bien su invasividad, coste y la necesidad de que especialistas expertos y con experiencia lleven a cabo el procedimiento, determinan que su uso como análisis rutinario no sea práctico. Lo mismo se puede aplicar a la colonografía por tomografía computarizada (colonoscopia virtual) que se ha introducido recientemente.

30 FOBT es económica y sencilla, sin embargo, ofrece índices inaceptablemente altos de resultados tanto falsos negativos como falsos positivos. A pesar de estas limitaciones, FOBT es actualmente el método analítico de elección.

35 Se han investigado métodos alternativos para diagnosticar el CRC basados en un indicador directo de la presencia de un tumor. Uno de los indicadores que se han identificado es el análisis de colonocitos exfoliados. La exfoliación de colonocitos (es decir, el desprendimiento espontáneo de células a partir de la capa epitelial de la mucosa del colon, que exhibe una organización ordenada) es un mecanismo importante de la renovación celular en el intestino humano [Eastwood, G.L., *Gastroenterology* 1977; 41: 122-125]. Hace aproximadamente unos 50 años se llevaron a cabo análisis citológicos de colonocitos obtenidos por lavados de colon o recto (es decir, por irrigación de la mucosa colorrectal) [Bader, G.M. y Papanicolau, G.N., *Cancer* 1952; 5: 307-14]. En este trabajo, se puso de manifiesto la posibilidad de detectar células neoplásicas exfoliadas, morfológicamente diferentes, en pacientes con CRC. Sin embargo, el método para obtener estas muestras (un procedimiento invasivo de lavado del colon) mostraba los mismos inconvenientes de la sigmoidoscopia/colonoscopia y requería del mismo análisis citológico detallado de la muestra después de haberla obtenido.

40 El abordaje predominante para obtener muestras de células epiteliales exfoliadas ha sido aislarlas de las heces humanas. Las heces humanas se han identificado como una fuente de dichas células, dado que se pueden excretar células exfoliadas del epitelio del colon junto con el resto de la materia fecal.

45 P.P Nair y colaboradores realizaron hace aproximadamente 15 años los primeros intentos de utilizar colonocitos aislados de heces humanas con fines de diagnóstico e investigación. Afirmaron que eran capaces de recuperar miles de células exfoliadas "viables" a partir de unos pocos gramos de materia fecal dispersa, empleando un procedimiento de aislamiento basado en la centrifugación por gradiente de densidad [Iyengar, V. et al., *FASEB J* 1991; 5: 2856-2859; Albaugh, G.P. et al., *Int. J. Cancer* 1992; 52: 347-350]. Sin embargo, estas ambiciosas declaraciones generaron dudas considerables, debido a las escasas probabilidades de que en un ambiente anaeróbico agresivo tal como el que se observa en las heces haya presentes colonocitos adecuadamente preservados. Adicionalmente, las evidencias morfológicas que expusieron en su estudio de referencia de 1991 no fueron convincentes. P.P. Nair y miembros de su grupo continúan asegurando que su abordaje es válido [Nair, P. et al., *J. Clin. Gastroenterol.* 2003; 36(5 Suppl.), pág. 84-93], pero no se han producido avances prácticos basados en los resultados de sus estudios.

No obstante, y a pesar de la ausencia de avances prácticos a cargo de P.P. Nair y sus colaboradores, el uso de las heces humanas con fines de diagnóstico e investigación sigue siendo un campo de estudio activo, debido a que no se asocia con una intervención invasiva. Una serie de grupos de investigadores han llevado a cabo intentos de aislar material genético (ADN) derivado de colonocitos a partir de muestras fecales humanas, con el objetivo de desarrollar procedimientos diagnósticos, usando biomarcadores moleculares de tumores malignos. Mientras que el ADN aislado directamente de heces homogeneizadas se puede amplificar y analizar en busca de alteraciones genéticas asociadas con el cáncer, la ausencia de un biomarcador molecular único del cáncer, dotado de una alta fiabilidad, ha llevado al uso de múltiples marcadores moleculares que reflejan diversas alteraciones genéticas cuya presencia es conocida en células malignas con frecuencias relativamente elevadas. Se han descrito varios métodos de abordaje que proponen la detección simultánea de múltiples mutaciones de los genes APC, K-ras y p53, combinada con el análisis de marcadores microsatélites [Ahlquist, D.A. et al, *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-1227; Dong, S.M. et al., *J. Natl. Cancer Res.* 2001; 93: 858-865; Rengucci, C. et al., *Clin. Cancer Res.* 2001; 93: 858-865; Traverso, G. et al., *N. Engl. J. Med.* 2002; 346: 311-320]. Asimismo, los cambios de metilación del ADN fecal se han considerado como un posible marcador diagnóstico [Muller, H.M. et al., *Lancet* 2004; 363: 1283-1285]. Aunque la detección de tumores colorrectales a través de ensayos moleculares multi-diana parece factible, la validez de estos métodos con fines analíticos sigue siendo cuestionable debido al alto coste y la relativa complejidad de los procedimientos de laboratorio implicados.

La búsqueda de marcadores moleculares en el ADN extraído de muestras fecales homogeneizadas ha eclipsado la importancia de la recolección/aislamiento inicial de colonocitos exfoliados. Sin embargo, resulta evidente que las heces homogeneizadas constituyen un material difícil para la extracción de ADN humano. De manera particular, la abundancia de bacterias en las heces puede interferir con los procedimientos de recuperación de ADN de los colonocitos y, en presencia de flora bacteriana anaeróbica del colon humano, el ADN de mamífero resulta rápidamente dañado y degradado.

El desarrollo de abordajes basados en el aislamiento de colonocitos exfoliados ha sido lento debido, en parte, a la sorprendente falta de conocimientos sobre la exfoliación celular en el intestino, tanto bajo condiciones fisiológicas normales como de tipo patológico. Las opiniones actuales sobre la exfoliación de colonocitos todavía están influidas por la antigua hipótesis, no confirmada, que implica una exfoliación "obligatoria" de prácticamente todos los colonocitos tras su migración al epitelio luminal desde las criptas colónicas (es decir, se supone que debería haber millones de colonocitos presentes en la materia fecal debido a que la velocidad de proliferación celular del epitelio del colon es alta y se exfolian finalmente todas las células). Resulta, no obstante, cada vez más evidente que la muerte celular programada o apoptosis *in situ* es al menos tan importante como la exfoliación [Hall, P. A. et al., *J. Cell Sci.* 1994; 107: 3569-3577; Barkla, D.H. y Gibson, P.R., *Pathology* 1999; 31: 230-238; Ahlquist, D.A. et al., *Hum. Pathol.* 2000; 31: 521-57]. La relación entre estos dos mecanismos principales de eliminación celular desde la mucosa del colon puede estar sometida a variaciones importantes en la neoplasia colorrectal [Ahlquist, D.A. et al, (véase más arriba)]. De hecho, se ha comprobado que las vías regulatorias normales que llevan a las células a la apoptosis experimentan una grave desregulación en los tumores malignos [Bedi, A. et al., *Cancer Res.* 1995; 55: 1811-1816; LaCasse, E.C. et al., *Oncogene* 1998; 17: 3247-3259; Jass, J.R., *Gastroenterology* 2002; 123: 862-876; Oren, M., *Cell Death Differ.* 2003; 10: 431-442; Boedefeld, W.M. 2nd et al., *Ann. Surg. Oncol.* 2003; 10: 839-851], dando lugar a una reducción importante del potencial apoptótico de las células cancerosas. Al mismo tiempo, es sabido que la adhesión de las células tumorales disminuye de manera llamativa a medida que progresa el cáncer [Yamamoto, H. et al., *Cancer Res.* 1996; 56: 3605-3609; Haier, J. y Nicolson, G.L., *Dis. Colon Rectum* 2001; 44: 876-884; Leeman, M.F. et al., *J. Pathol.* 2003; 201: 528-534]. Este último fenómeno es importante para la diseminación metastásica, pero en la neoplasia colorrectal, la supresión de la apoptosis combinada con la reducción de la adhesión/comunicación intercelular incrementan de forma muy importante las probabilidades de que se desprendan células malignas desde la superficie de tumores en crecimiento. De ser éste el caso, las células tumorales exfoliadas, algunas de las cuales pueden retener probablemente su potencial proliferativo, deberían diferir de sus homólogas exfoliadas normales (no tumorales) por: i) ser más abundantes debido a la exfoliación facilitada desde la superficie del tumor; y ii) tener una capacidad de "supervivencia" mucho mayor debida, en particular, a la mayor resistencia a la ausencia de oxígeno [Graeber, T.G. et al., *Nature* 1996; 379: 88-91]. Tras la exfoliación, estas células se incorporan a una "capa mucocelular" relativamente bien oxigenada que separa la mucosa del colon del contenido fecal del intestino y se desplaza de manera permanente en dirección distal con el flujo fecal [Ahlquist, D.A. et al., (véase más arriba)].

Tan sólo recientemente se ha comprendido la importancia de la capa mucocelular, que proporciona una interface entre la mucosa colorrectal y el contenido fecal del intestino. Los estudios experimentales indicaban que era posible obtener fácilmente ADN de buena calidad a partir de la superficie de las heces de rata, utilizándolo para una posterior amplificación y el análisis de mutaciones génicas [Loktionov, A. y O'Neill, I.K., *Int. J. Oncol.* 1995; 6: 437-445]. Estos primeros experimentos daban a entender que el ADN extraído de colonocitos aislados de la superficie de las heces humanas (la superficie fecal se puede considerar una fracción de la capa mucocelular excretada con las heces) se podría usar para el análisis molecular. Se ha desarrollado un método para aislar células exfoliadas de muestras fecales humanas enteras mediante la eliminación por lavado de las células a partir de la superficie de heces refrigeradas, recolectándolas por un procedimiento de separación inmunomagnética [Loktionov, A. et al., *Clin. Cancer Res.* 1998; 4: 337-342]. Aunque el trabajo en esta dirección se planificó inicialmente en términos del desarrollo de un ensayo diagnóstico molecular para el CRC, se llegó a la conclusión de que para el diagnóstico y

cribado del CRC era posible usar un análisis cuantitativo simple del ADN derivado de los colonocitos de la superficie de las heces humanas, puesto que la cantidad relativa de ADN en pacientes con CRC es mucho mayor en comparación con individuos sanos. Igualmente, otros autores también han notificado cantidades mayores de células exfoliadas [Dutta, S.K. et al., *Gastroenterology* 1995; 108 (Suppl.): A463] o de ADN [Villa, E. et al., *Gastroenterology* 1996; 110: 1346-1353] en muestras fecales dispersadas u homogeneizadas obtenidas de pacientes con CRC, si bien las diferencias entre personas sanas y pacientes con cáncer observadas en estos estudios no fueron lo suficientemente importantes para ser consideradas válidas para el diagnóstico. Por el contrario, Loktionov et al. (véase más arriba) pudieron demostrar la existencia de una marcada diferencia entre pacientes con CRC e individuos sanos por medio del cálculo de un índice relacionado con la cantidad de ADN extraído de células aisladas de la superficie fecal con respecto al peso de las heces (índice de ADN en heces o SDNAI, por sus siglas en inglés).

El método diagnóstico basado en SDNAI se describe en la patente de EE.UU. número 6.187.546. Aunque la técnica y los resultados de sus ensayos iniciales señalaban, aparentemente, un abordaje muy eficaz, sencillo y económico para el cribado del CRC, presentaba una serie de errores sustanciales (aparentes dificultades de la manipulación de heces enteras y, en especial, la imposibilidad de estandarizar el procedimiento), que impidieron su comercialización e introducción real en la práctica clínica. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que se pueden obtener cantidades relativamente bajas de células bien preservadas a partir de la superficie de las heces humanas empleando esta técnica [Bandaletova et al., *APMIS* 2002; 110: 239-246]. Estos problemas, de los que la dificultad de estandarización es el de mayor importancia, arrojan serias dudas en relación con el empleo de colonocitos exfoliados aislados de muestras fecales para un cribado a gran escala del CRC.

Existe un gran volumen de pruebas que indican que la capa mucocelular que recubre la mucosa rectal humana es especialmente rica en colonocitos exfoliados bien conservados. Además, el contenido celular de esta capa en pacientes con CRC parece ser mucho mayor que en individuos sanos, debido principalmente a la presencia muy aumentada de colonocitos malignos altamente resistentes. Por lo tanto, en las células tumorales de pacientes con CRC, que están mucho mejor adaptadas a una existencia autónoma, debería predominar cuantitativamente una combinación de células rectales exfoliadas. Varios informes recientes que describen la implantación distal (por ejemplo, anal) de células exfoliadas persistentes derivadas de tumores colorrectales extirpados [Jenner, D.C. et al., *Dis. Colon Rectum* 1998; 41: 1432-1434; Wind, P. et al., *Dis. Colon Rectum* 1998; 41: 1432-1434; Isbister, W.H., *Dig. Surg.* 2000; 17: 81-83; Hyman, N. y Kida, M., *Dis. Colon Rectum* 2003; 46: 835-836; Abbasakoor, F. et al., *Ann. R. Coll., Surg. Engl.* 2004; 86: 38-39] avalan con fuerza esta hipótesis.

El acceso directo a la mucosa rectal se puede llevar a cabo por exploración digital rutinaria del recto con el dedo enguantado de un examinador. Sin embargo, aunque con el empleo de esta sencilla manipulación es posible establecer contacto con la capa mucocelular del recto, resultan inevitables las pérdidas importantes de material y la contaminación simultánea con epitelio escamoso irrelevante del canal anal cuando se retira el dedo del recto. Los frotis preparados a partir de guantes usados para la exploración rectal han mostrado la presencia de colonocitos bien conservados, combinados con un alto nivel de contaminación de células del epitelio escamoso.

Resulta, por lo tanto, muy necesaria de recolección directa de células epiteliales exfoliadas a partir de la superficie de la mucosa rectal, libre de los problemas de pérdida de material y contaminación importante con elementos de otros tejidos en la etapa de retirada de la superficie de recolección celular del recto. Estas células se podrían utilizar no sólo para el análisis cuantitativo de células y ADN, sino también para estudiar en ellas la presencia de biomarcadores adicionales de cáncer (por ejemplo, proteínas) y, por último, analizarlas desde los aspectos inmunoquímico y citológico.

El documento US 3.664.328 se refiere a un dispositivo para recolectar muestras experimentales de cáncer cervical para uso domiciliario. El dispositivo incluye un tubo de inserción y un balón de toma de muestras normalmente colapsado dentro de un extremo del tubo. El otro extremo del tubo está conectado a una pera de succión que se puede colapsar manualmente y que se restaura automáticamente. El balón incorpora una capa de material de recogida de muestras, que se desplaza con el balón desde el interior del tubo hasta una posición exterior de toma de muestras y que retrocede a su posición inicial cuando se colapsa y se suelta la pera de succión.

El documento US 4.467.816 hace referencia a un dispositivo para recolectar material celular desde una cavidad del cuerpo, que incluye un tubo de guía y un elemento de muestreo celular que se retrae en el tubo de guía, el cual tiene una porción frontal y una porción trasera. El elemento de muestreo celular tiene la forma de un balón hinchable que se retrae en sí mismo y que se vuelca sobre el extremo de la porción frontal del tubo de guía. El dispositivo posee también un medio de hinchado para introducir un gas en el elemento de muestreo para hincharlo. Se provee un medio de retracción, que pasa a través del tubo de guía y que está conectado con la pared interior del elemento de muestreo celular de tipo balón, para retraer el elemento de muestreo celular al interior del tubo de guía.

Compendio de la invención

De acuerdo con la invención, se proporciona un dispositivo de muestreo de células colorrectales según la definición de la reivindicación 1 adjunta.

El dispositivo supera las dificultades que se encuentran con el muestreo digital, al mantener la membrana flexible en

el interior del miembro de inserción tanto durante la inserción como en su retirada, de manera que no se produce pérdida de material y la muestra no resulta contaminada por células de otras superficies (por ejemplo, el epitelio escamoso).

5 Al tomar muestras directamente desde la superficie mucosa, el dispositivo supera las dificultades asociadas con el muestreo de heces enteras, incluidas la desagradable naturaleza del trabajo, la baja concentración de células que se obtienen, los elevados niveles de contaminación con materia fecal (en especial, bacterias) y, sobre todo, las dificultades para estandarizar el método relacionadas con tales problemas, por ejemplo, la gran variabilidad de tamaño y consistencia de las heces.

10 Aunque el dispositivo es invasivo, lo es en mucho menor medida que los dispositivos usados actualmente para colonoscopia/sigmoidoscopia y no exige la intervención de un técnico especializado en su funcionamiento. Incluso, el dispositivo puede ser usado por el propio paciente. El bajo nivel de invasividad y la ausencia de riesgo de complicaciones conducen, probablemente, a una mejor aceptación por parte del paciente. Por su parte, estas ventajas deberían permitir llevar a cabo más muestreos con un coste más reducido.

15 En una realización preferida de la invención, la membrana flexible es expandible y está construida con un material elástico. Más preferiblemente, la membrana flexible se fabrica con una sustancia basada en nitrilo, látex o caucho.

En una realización preferida de la invención, la cavidad interior que se puede cerrar del miembro de inserción está cerrada.

20 En una realización preferida de la invención, el dispositivo de muestreo celular comprende, además, medios de presurización de la cavidad interior, en donde dichos medios están acoplados al extremo proximal del miembro de inserción.

Preferiblemente, dichos medios de presurización de la cavidad interior están unidos al dispositivo de muestreo celular a través de una válvula (por ejemplo, una válvula autosellable) presente en el extremo proximal del miembro de inserción.

25 Se apreciará que los medios de presurización de la cavidad interior pueden comprender cualquier medio adecuado para aplicar un fluido (por ejemplo, líquido o gas) a la membrana flexible. Preferiblemente, los medios de presurización de la cavidad interior comprenden una fuente de aire comprimido, una jeringa o una bomba (por ejemplo, pera).

30 Preferiblemente, los medios de presurización de la cavidad interior comprenden una fuente de aire comprimido que comprende un dispositivo mecánico capaz de suministrar una cantidad predefinida de una primera presión elevada y una segunda presión reducida al dispositivo de muestreo celular. Esta realización tiene la ventaja de poder regular con precisión la presión en el interior del miembro de inserción, y el dispositivo mecánico tiene la ventaja de ser reutilizado con un número indefinido de dispositivos desechables de muestreo de células colorrectales.

35 Más preferiblemente, los medios de presurización de la cavidad interior comprenden una jeringa. El uso de una jeringa permite una operación sencilla y el bombeo de un volumen fijo de aire hacia la membrana flexible (preferiblemente, un incremento de al menos diez veces del volumen de aire presente en la membrana flexible). Por ejemplo, en una realización de la invención en la que una jeringa de 100 mL está acoplada al extremo proximal del miembro de inserción, el émbolo de dicha jeringa se podría fijar inicialmente en la marca de 70 a 90 mL. Por lo tanto, se podría aplicar una cantidad predefinida de una primera presión elevada empujando el émbolo hasta su nivel máximo (por ejemplo, hasta la marca de 0 mL), lo cual llenaría la membrana flexible con un volumen de aire de 70 a 40 90 mL. Subsecuentemente, se podría aplicar una cantidad predefinida de una segunda presión reducida, tirando del émbolo de la jeringa de vuelta hasta su nivel mínimo (por ejemplo, hasta la marca de 100 mL), lo cual replegaría la membrana en la cavidad interior del miembro de inserción. En una realización preferida de la invención, la jeringa estaría provista de uno o múltiples puntos de retención (por ejemplo, posiciones de chasquido) para marcar las 45 posiciones del émbolo de la jeringa en cada etapa durante su uso (por ejemplo, una posición previa al uso, una durante la inserción y otra, después de la retirada). La ventaja de que el medio de presurización de la cavidad interior sea una jeringa es que el dispositivo de muestreo de células colorrectales se puede adaptar a los equipos desechables de laboratorio y hospital habitualmente disponibles.

50 En una realización preferida de la invención, el área de superficie de la superficie exterior de muestreo celular de dicha membrana flexible se puede controlar de manera reproducible. Esto permite que un área de superficie establecida entre en contacto con la superficie de la mucosa colorrectal que se está analizando por muestreo, ofreciendo de este modo una recolección cuantificable de células colorrectales que se correlaciona con la cantidad presente en la superficie de la mucosa colorrectal. Preferiblemente, el área de superficie se controla a través del medio de presurización de la cavidad interior. Esto permite que un área de superficie determinada entre en contacto con la superficie de la mucosa colorrectal en la que se practica el muestreo.

55 En una realización preferida de la invención, el miembro de inserción está adaptado para acoplarse con un tubo de acceso rectal. Esta realización tiene la ventaja de permitir la inserción de un tubo de acceso rectal y un obturador tal como un obturador con forma de oliva (el conjunto de tubo de acceso rectal y obturador se conoce habitualmente

5 como proctoscopio) para abrir, en primer lugar, la cavidad rectal, seguido de la retirada del obturador antes de la inserción del dispositivo de muestreo de la invención. Entonces, el dispositivo de muestreo se podría mantener en posición con el tubo de acceso rectal durante el tiempo necesario para obtener una muestra. Seguidamente, después de retirar el dispositivo de muestreo, el obturador se volvería a poner en su sitio, retirando conjuntamente el obturador y el tubo de acceso rectal.

10 En una realización preferida de la invención, el miembro de inserción se configura para permitir la auto-inserción. En una realización de este tipo, el miembro de inserción se inserta junto con un tubo de acceso rectal y se elimina, por lo tanto, la necesidad de un obturador (por ejemplo, el miembro de inserción tiene un extremo distal de inserción redondeado). Esta realización ofrece la ventaja de que el dispositivo de muestreo de la invención puede ser administrado por el propio paciente, por ejemplo, los pacientes podrán tomar muestras de células exfoliadas de su mucosa rectal con facilidad. En esta realización, se prevé que el miembro de inserción y el tubo de acceso rectal se inserten y retiren de manera conjunta, para separarlos tan sólo después de haberlos retirado.

15 En la invención, la membrana flexible forma un receptáculo cuando se mantiene en la cavidad interior de dicho miembro de inserción, de modo que se puede agregar un líquido. Esta realización de la invención permitiría agregar reactivos al dispositivo de muestreo después de haber obtenido la muestra, sin necesidad de transferir la muestra a un recipiente separado, con la consiguiente pérdida de parte del material de la muestra en este paso.

20 En una realización preferida de la invención, la cavidad interior del miembro de inserción está provista de un medio de adhesión. Esta realización de la invención tiene el efecto de aproximar la membrana flexible hacia las paredes de la cavidad interior del miembro de inserción una vez que se ha obtenido la muestra y que la aplicación de la segunda presión reducida ha replegado la membrana flexible en la cavidad interior del miembro de inserción. Esta característica tiene la ventaja de proporcionar un receptáculo estable cuando se llena con un líquido.

En la invención, el miembro de inserción está adaptado para acoplarse con un medio de sellado para sellar dicho receptáculo. Esto permitiría conservar y transportar el dispositivo de muestreo que contiene la muestra, antes de llevar a cabo análisis adicionales en la muestra.

25 Preferiblemente, el medio de sellado es un tapón de rosca. Un tapón de rosca tiene la ventaja de sellar el receptáculo para prevenir la pérdida de la muestra, permitiendo igualmente su extracción para análisis posteriores.

30 En la realización en la que el dispositivo de muestreo celular comprende medios de presurización de la cavidad interior, dichos medios se pueden desprender preferiblemente del miembro de inserción. Esto tiene la ventaja de convertir el dispositivo de muestreo en un vial compacto de ensayo que se puede transportar y almacenar cómodamente junto con otros muchos viales compactos de ensayo, para subsiguientes reacciones de análisis.

En un segundo aspecto de la invención, se propone un kit para recoger una muestra de una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, que comprende un dispositivo de muestreo colorrectal según la definición de este documento y un tubo de acceso rectal y, opcionalmente, un obturador.

35 El uso de un tubo de acceso rectal ofrece una inserción más cómoda del dispositivo de muestreo, impidiendo al mismo tiempo el contacto entre el dispositivo de muestreo y cualquier superficie que no sea la superficie mucosa que se debe analizar. El uso de un obturador, además del tubo de acceso rectal, puede reducir las molestias de la inserción del tubo de acceso rectal.

40 En una realización preferida de la invención, el kit puede comprender, adicionalmente, un lubricante tal como un gel lubricante (por ejemplo, gel K-Y). Esto tiene la ventaja de reducir las molestias durante la inserción del obturador o del dispositivo de muestreo celular de la invención.

En una realización preferida de la invención, el obturador se desacopla del tubo de acceso rectal tras la inserción conjunta en la cavidad rectal del obturador y el tubo de acceso rectal.

En una realización preferida de la invención, el kit comprende además medios de sellado tales como un tapón de rosca, para acoplar con el miembro de inserción.

45 En una realización preferida de la invención, el kit comprende, además, uno o múltiples reactivos tales como una solución tampón. El uso de una solución tampón permite la preparación de la muestra antes de análisis posteriores.

50 En una realización preferida de la invención, la solución tampón puede estar presente en el tapón de rosca (por ejemplo, en un envase blíster), de manera que la fijación del tapón al miembro de inserción libera la solución tampón hacia el receptáculo (por ejemplo, mediante la perforación del envase blíster) para suspender las células presentes en la superficie de muestreo de la membrana flexible antes de análisis adicionales.

En una realización preferida de la invención, la solución tampón es un tampón de lisis celular que tiene la ventaja de proporcionar un paso clave previo a la extracción de ADN. En una realización alternativa preferida de la invención, el tampón es un medio de preservación de las células que tiene la ventaja de permitir la realización de análisis citológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos adicionales sobre la muestra celular resultante. Preferiblemente, el

medio para la preservación de células está suplementado con uno o múltiples componentes de cultivos celulares (por ejemplo, nutrientes y antibióticos).

5 El experto en la materia observará además que cualquiera de los dispositivos o kits descritos anteriormente es apropiado para tomar muestras de tejido epitelial exfoliado (por ejemplo, colonocitos) desde la superficie de la mucosa colorrectal humana.

La presente descripción da a conocer también un método de muestreo cuantitativo de células exfoliadas de la superficie de una mucosa colorrectal de un sujeto humano, sin que la muestra resulte contaminada por el contacto con otras superficies del cuerpo, que comprende las etapas de:

10 aproximar un dispositivo de muestreo que comprende una superficie secuestrada de muestreo de células con la superficie de la mucosa colorrectal que se va a estudiar, impidiendo cualquier contacto previo con ninguna otra superficie corporal; hacer contactar la superficie de toma de muestras celulares con la superficie de la mucosa colorrectal de manera que se obtenga una muestra de la superficie mucosa; y

15 retirar el dispositivo de muestreo y la muestra de la proximidad de la superficie de la mucosa, sin que la superficie secuestrada de muestreo de células o la muestra entren en contacto con ninguna otra superficie corporal.

20 Este método comprende las etapas clave de muestrear directamente células exfoliadas desde una superficie mucosa, y garantiza que la muestra no resulte contaminada por el contacto de la membrana de muestreo celular con otras superficies del cuerpo. La contaminación se evita por el secuestro de la superficie de muestreo, en donde el término secuestro se puede definir como aislar o separar la superficie de muestreo antes de hacerla contactar con la superficie de la mucosa colorrectal o después de la recolección de células de la superficie de la mucosa colorrectal.

Asimismo, se da a conocer un método de muestreo de células exfoliadas desde una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, que comprende las etapas de:

25 insertar un dispositivo de muestreo de células colorrectales según la invención en la cavidad rectal y aproximar dicho dispositivo a la superficie de la mucosa colorrectal, sin que la superficie exterior de muestreo celular de la membrana flexible haga contacto previo con ninguna otra superficie del cuerpo;

presurizar la cavidad interior hasta al menos una primera presión elevada, de manera que la membrana flexible emerja desde el extremo distal del dispositivo de muestreo;

30 hacer contactar la superficie de la mucosa colorrectal con la superficie exterior de muestreo celular de dicha membrana, de modo que se obtenga una muestra de células exfoliadas de la superficie de la mucosa colorrectal;

aplicar una segunda presión reducida a la cavidad interior, de manera que la membrana flexible se invierta y la muestra presente en la superficie de muestreo celular de dicha membrana vuelva a la cavidad interior del dispositivo de muestreo celular; y

35 retirar el dispositivo de muestreo celular de la zona próxima a la superficie de la mucosa colorrectal y retirar dicho dispositivo de la cavidad rectal, sin que la membrana o la muestra hagan contacto con ninguna otra superficie del cuerpo.

Puede observarse que el dispositivo de muestreo celular puede requerir adicionalmente un tubo de acceso rectal, ya sea solo o combinado con un obturador.

De esta forma, el método puede comprender, además, las etapas de:

40 insertar un dispositivo de muestreo celular según la invención junto con un tubo de acceso rectal en la cavidad rectal; y retirar dichos dispositivo de muestreo y muestra del tubo de acceso rectal.

El método puede comprender, además, las etapas de:

insertar un tubo de acceso rectal junto con un obturador en la cavidad rectal;

retirar el obturador del tubo de acceso rectal antes de insertar un dispositivo de muestreo;

45 retirar el dispositivo de muestreo y la muestra;

colocar nuevamente el obturador a través del tubo de acceso rectal; y retirar de la cavidad rectal el tubo junto con el obturador.

Asimismo, se da a conocer un método de muestreo de células exfoliadas desde una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, que comprende las etapas de:

insertar en la cavidad rectal, a través del canal anal, un tubo de acceso rectal y un obturador;

retirar el obturador del tubo de acceso rectal;

5 insertar un dispositivo de muestreo de células colorrectales según la invención en la cavidad rectal, a través del tubo de acceso rectal, sin que la membrana flexible del dispositivo de muestreo entre en contacto con ninguna otra superficie del cuerpo;

presurizar la cavidad interior hasta al menos una primera presión elevada, de forma que la membrana flexible emerja desde el extremo distal del dispositivo de muestreo;

hacer contactar la superficie de la mucosa colorrectal con la superficie exterior de dicha membrana, responsable de tomar muestras celulares;

10 obtener una muestra de células exfoliadas de la superficie de la mucosa colorrectal;

aplicar una segunda presión reducida a la cavidad interior para que la membrana flexible se invierta y la muestra presente en la superficie de muestreo celular de dicha membrana vuelva a la cavidad interior del dispositivo de muestreo celular;

15 retirar el dispositivo de muestreo celular de la cavidad rectal a través del tubo de acceso rectal, sin que la membrana flexible del dispositivo de muestreo entre en contacto con ninguna otra superficie del cuerpo;

colocar nuevamente el obturador a través del tubo de acceso rectal; y

retirar el tubo de acceso rectal y el obturador del recto a través del canal anal.

20 Puede apreciarse que mientras el tubo de acceso rectal está insertado en la cavidad rectal, es posible introducir en la cavidad rectal un dispositivo de muestreo celular según la invención adicional. Por ejemplo, se puede introducir el primer dispositivo de muestreo celular, que comprende una solución tampón de lisis celular para permitir la extracción y análisis (por ejemplo, cuantificación) de ADN de cualquier célula sometida a muestreo. A continuación, se puede introducir un segundo dispositivo de muestreo celular, que comprende un medio de preservación celular para permitir la realización de análisis citológicos, bioquímicos e inmunohistoquímicos de cualquier célula sometida a muestreo.

25 También se da a conocer un dispositivo de muestreo para tomar una muestra de una superficie mucosa situada en el interior de la cavidad rectal de un sujeto, que comprende:

un elemento sustancialmente cilíndrico que posee una cavidad abierta en el extremo distal y una cavidad que se puede cerrar en el extremo proximal;

30 una membrana flexible acoplada en el interior del elemento sustancialmente cilíndrico, que forma un sello que separa la cavidad distal abierta de la cavidad proximal que se puede cerrar, en donde las dos superficies de la membrana son la superficie proximal y la superficie distal; y

medios para hinchar y deshinchar, en donde

35 el medio de hinchado puede aumentar la presión interna del líquido de la cavidad proximal que se puede cerrar, cuando está cerrada, haciendo que la membrana emerja del extremo distal del elemento sustancialmente cilíndrico, hasta que la superficie distal de la membrana contacte con la superficie mucosa que se somete al muestreo; y

40 el medio de deshinchado puede reducir la presión del líquido de la cavidad proximal cerrada, determinando que la membrana se invierta, de manera que se mantiene en el interior del elemento sustancialmente cilíndrico después de que la superficie distal de la membrana haya contactado con la superficie mucosa que se somete al muestreo.

El medio de deshinchado puede ser una válvula. Esta realización de la invención sería especialmente adecuada para usar con una membrana elástica, en la que la presión interna en la cavidad proximal que se puede cerrar es mayor que fuera de la cavidad.

La válvula de deshinchado puede comprender la jeringa conectada a la válvula.

45 Se ofrece un método de muestreo de células exfoliadas a partir de una superficie mucosa situada en el interior de la cavidad rectal de un sujeto humano, que comprende las etapas de:

aproximar el dispositivo de muestreo según la invención a una superficie mucosa, sin que la membrana de muestreo haga contacto previamente con ninguna otra superficie corporal;

aumentar la presión interna de la cavidad proximal cerrada, de modo que la membrana flexible emerja desde el

extremo distal del dispositivo de muestreo;

hacer contactar la superficie mucosa con la superficie distal de la membrana, de manera que se obtenga una muestra de células exfoliadas de la superficie mucosa;

5 reducir la presión interna de la cavidad proximal cerrada, de manera que la membrana flexible se invierta y, junto con la muestra, se mantengan dentro de la cavidad distal abierta; y

retirar el dispositivo y la muestra desde la zona próxima a la superficie mucosa, sin que la membrana o la muestra hagan contacto con ninguna otra superficie corporal.

El método puede comprender las etapas de:

10 conectar una fuente de aire comprimido a la válvula y elevar la presión interna de la cavidad proximal cerrada mediante la apertura de la válvula; o

acoplar una jeringa a la válvula y elevar la presión interna de la cavidad proximal cerrada presionando el émbolo.

El método puede comprender las etapas de:

15 reducir la presión interior de la cavidad proximal cerrada mediante la apertura de la válvula; o

reducir la presión interior de la cavidad proximal cerrada retirando el émbolo.

El método puede comprender las etapas de:

20 agregar una solución tampón de lisis celular o un medio de preservación de las células a la cavidad distal abierta del dispositivo de muestreo; y

sellar la cavidad distal abierta del dispositivo de muestreo.

Adicionalmente, se ofrece un método de muestreo de células exfoliadas de una superficie mucosa situada en el interior de la cavidad rectal de un sujeto humano, que comprende las etapas de:

insertar un tubo de acceso rectal y un obturador en la cavidad rectal a través del canal anal;

retirar el obturador del tubo de acceso rectal;

25 insertar un dispositivo de muestreo según la invención en la cavidad rectal, a través del tubo de acceso rectal, sin que la membrana flexible del dispositivo de muestreo entre en contacto con ninguna otra superficie del cuerpo;

conectar el dispositivo de muestreo a un medio de hinchado;

30 elevar la presión interna de la cavidad proximal cerrada, de modo que la membrana flexible emerja del extremo distal del dispositivo de muestreo;

hacer contactar la mucosa rectal con un área de superficie determinada de la superficie de muestreo;

obtener una muestra de células exfoliadas de la superficie de la mucosa rectal;

reducir la presión interna de la cavidad proximal cerrada, de forma que la membrana flexible se invierta y tanto ella como la muestra se replieguen en el interior de la cavidad distal abierta;

35 retirar el dispositivo de muestreo de la cavidad rectal a través del tubo de acceso rectal, sin que la membrana flexible del dispositivo de muestreo entre en contacto con ninguna superficie corporal;

colocar nuevamente el obturador a través del tubo de acceso rectal;

retirar el tubo de acceso rectal y el obturador de la cavidad rectal a través del canal anal; y

40 agregar una solución tampón de lisis celular o un medio de preservación de las células a la cavidad distal abierta; y

sellar la cavidad distal abierta del dispositivo de muestreo.

Se proporciona un método de cribado y diagnóstico de cáncer colorrectal que comprende cualquiera de los métodos anteriormente expuestos y que, además, comprende recuperar la muestra recogida del dispositivo de muestreo y llevar a cabo un análisis de la muestra.

En una realización preferida de la invención, el análisis se selecciona de cuantificación de ADN, extracción de ADN seguida de su cuantificación y análisis molecular opcional, estudio citológico/citoquímico y pruebas bioquímicas. Se debe destacar que la exactitud del cribado por cualquiera de estos métodos mejorará mediante la aportación de una muestra con bajos niveles de contaminantes y una alta concentración de células tomadas de la superficie de mucosa colorrectal que se somete a muestreo.

Breve descripción de los dibujos

A continuación, la invención se describirá, sólo a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos, en los cuales:

Figura 1 muestra una vista en sección transversal de un dispositivo de muestreo celular según la invención.

Figura 2 muestra una representación esquemática de un dispositivo de muestreo celular según la invención, en donde el medio de presurización comprende una jeringa.

Figura 3 muestra una representación esquemática de un dispositivo de muestreo celular según la invención, en donde el medio de presurización comprende una fuente de aire comprimido.

Figura 4 muestra los componentes necesarios para muestrear células exfoliadas de una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano.

Figura 5 muestra un ejemplo de un método de muestreo de células exfoliadas de una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, utilizando cualquiera de los dispositivos que se muestran en las Figuras 1 a 4.

Figura 6 muestra un ejemplo de las etapas que puede seguir el método representado en la Figura 5.

Descripción detallada de la invención

Descripción de realizaciones de muestreo celular

El dispositivo de muestreo celular de la Figura 1 está diseñado para ser insertado en una cavidad rectal. El dispositivo comprende un miembro de inserción 1 sustancialmente cilíndrico, con una cavidad interior 3, cerrada en el extremo distal de inserción 2 por una membrana 4 flexible y elástica unida de forma estanca al miembro 1 en el extremo distal 2. En la posición que se muestra en la Figura 1, la membrana se mantiene en el interior de la cavidad 3, y está adaptada para emerger de la cavidad 3 cuando la cavidad 3 se somete a presurización a través del medio 7 (que se muestra con mayor detalle en la Figura 2). La membrana 4 tiene una superficie 5 de muestreo celular que, en la posición de reposo que se muestra en la Figura 1, se encuentra en la superficie interior, pero cuando emerge la membrana, es la superficie exterior, y una superficie opuesta 6 que, en posición de reposo es la superficie exterior, pero cuando emerge la membrana, se convierte en la superficie interior. La membrana está fabricada de nitrilo, látex o una sustancia basada en el caucho. En el extremo proximal 34, la cavidad 3 está cerrada por una válvula autosellable 18, a la cual está adaptado el medio de presurización 7 para su acoplamiento.

La realización según la invención, en la que el medio de presurización de la cavidad interior 7 es una jeringa integrada, se muestra en la Figura 2 que muestra también, de forma esquemática, las etapas necesarias para muestrear células exfoliadas desde una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano (Figuras 2A a 2D).

La Figura 2A muestra una representación del dispositivo de muestreo celular antes de la inserción en una cavidad rectal. La jeringa 7 está unida sustancialmente a un miembro de inserción 1 tal como se describe en la Figura 1. La jeringa tiene un émbolo 23 que se desliza de manera estanca a lo largo de un barril 32 de la jeringa 7 para modificar el volumen dentro de una cámara interna 33 de la jeringa 7. El émbolo 23 de la jeringa 7 se fija de manera que en el interior de la cámara 33 de la jeringa 7 haya 70 mL de aire.

La Figura 2B muestra una representación del dispositivo de muestreo celular después de la inserción en una cavidad rectal. El émbolo 23 de la jeringa se ha presionado hasta el final, lo que determina que la membrana flexible 4 se hinche hasta un volumen de 70 mL. Seguidamente, la membrana flexible 4 hinchada hace contacto con la superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, de manera que las células exfoliadas se transfieren a la superficie exterior de la membrana flexible 4.

La Figura 2C muestra una representación del dispositivo de muestreo celular después de la toma de muestras de células exfoliadas y antes de la retirada de una cavidad rectal. El émbolo 23 de la jeringa 7 se retrae de manera que en el interior de la cámara de la jeringa 7 haya presentes 80 mL de aire. Esto genera, por tanto, una presión reducida en el interior de la cámara que hace que la membrana flexible 4 se repliegue en la cavidad interior del miembro de inserción 1 y se adhiera firmemente a las paredes laterales del miembro de inserción 1. La cantidad de presión reducida se puede cuantificar previamente por la presencia de dos puntos de retención 24 (sólo uno de los cuales se muestra en la Figura 2C). Los puntos de retención 24 son resaltes dispuestos en el émbolo 23 de la jeringa 7, que encajan en perforaciones del barril 32 de la jeringa 7. El objetivo de los puntos de retención 24 es evitar que el émbolo 23 se desacople de la jeringa 7.

La Figura 2D muestra una representación del dispositivo de muestreo celular después de la retirada de una cavidad rectal y antes del análisis celular. El extremo distal de inserción del miembro de inserción 1 está provisto de una rosca que está adaptada para recibir un tapón de rosca 8 de 20 mm de diámetro. El tapón 8 puede tener un envase blíster que contiene una solución tampón, de manera que al enroscar el tapón 8 en el miembro de inserción 1, se libera la solución tampón hacia el receptáculo formado por la membrana flexible 4 deshinchada. Después de haber enroscado el tapón 8 en el miembro de inserción 1, se puede desacoplar la jeringa 7 del miembro de inserción 1 para permitir la conversión del miembro de inserción 1 en un vial de ensayo compacto que, junto con una pluralidad de otros viales más, se puede empaquetar y enviar a un laboratorio para el análisis celular.

La realización de la invención en la que el medio de presurización de la cavidad interior 7 es una fuente de aire comprimido se muestra en la Figura 3. Esta figura muestra de forma esquemática un dispositivo mecánico 9 que es una bomba operada por un motor eléctrico (no se muestra) capaz de suministrar dosis repetidas de una primera presión elevada, seguidas de una segunda presión reducida tras la activación del detonante 14. El dispositivo mecánico 9 es capaz de acoplarse a un miembro de inserción 1 sustancialmente de la forma descrita en las Figuras 1 y 2 por medio de un elemento 16 que se ajusta con un clic, presente en el dispositivo mecánico 9 que coopera con una pestaña 17 en el miembro de inserción 1. En el miembro de inserción 1 hay presente una válvula 18 autosellable para asegurar el mantenimiento de la presión dentro del miembro de inserción 1 tras la desconexión del dispositivo mecánico 9. El miembro de inserción 1 comprende aspás 19 diseñadas para acoplarse con un proctoscopio y posee una rosca 20 en el extremo distal de inserción destinada a recibir un tapón de rosca 8 que tiene un envase blíster 21 que contiene solución tampón. Está previsto que el dispositivo mecánico 9 funcione con baterías y se puede recargar mediante un cargador conectado a la corriente eléctrica con un conector 12. El dispositivo mecánico 9 comprende un filtro de toma de aire 25, un mango de goma 13 y posee también un interruptor de encendido-apagado 15 y diodos emisores de luz 10 y 11, que indican el momento en que el dispositivo está preparado y cuando se han completado los ciclos de aplicación de la primera y segunda presiones.

Durante su utilización, el usuario sujeta el dispositivo mecánico 9 por el mango de goma 13 de tipo pistola y acopla el dispositivo 9 a un miembro de inserción 1. A continuación, el miembro de inserción se inserta en la cavidad rectal, en donde se acopla con un proctoscopio usando las aspás 19, lo cual permite una mejor consistencia de penetración. El usuario aplica una primera presión elevada presionando el detonante 14, lo que determina que entre aire en el dispositivo mecánico 9 a través del filtro de toma de aire 25 que, seguidamente, se comprime y hace que la membrana flexible emerja desde el extremo distal del miembro de inserción 1 para establecer contacto con la superficie de la mucosa colorrectal. A continuación, el usuario aplica una segunda presión reducida presionando el detonante 14 una segunda vez, lo cual determina que la membrana flexible vuelva a la cavidad interior del miembro de inserción 1. Cuando finaliza el muestreo celular, se desacopla el miembro de inserción 1 del proctoscopio y se separa el dispositivo mecánico 9 del miembro de inserción 1, manteniendo la presión en el interior del miembro de inserción 1 por medio de la válvula autosellable 18. Seguidamente, se puede enroscar un tapón de rosca 8 que tiene un envase blíster 21 que contiene una solución tampón a una rosca 20 en el miembro de inserción 1, provocando la liberación de la solución tampón al receptáculo formado por la membrana flexible deshinchada. Entonces, se puede reutilizar el dispositivo mecánico 9 acoplándolo a subsiguientes miembros de inserción 1.

Componentes necesarios para la técnica de muestreo celular "touch-print" (contacto-impresión)

En la Figura 4 se presentan los componentes que se necesitan para tomar muestras de células exfoliadas de una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano.

- i) El acceso a la mucosa rectal se puede efectuar usando un tubo de acceso rectal 29, que puede ser una variación de un instrumento existente para la exploración rectal (por ejemplo, rectoscopio 22). El tubo de acceso rectal 29 consiste en un tubo rígido (con un mango), equipado con un obturador 30, que constituye una superficie ininterrumpida en forma de oliva que facilita la introducción del tubo de acceso rectal 29 a través del canal anal hasta el recto.
- ii) El dispositivo de muestreo celular 1 que se muestra en la Figura 4 es sustancialmente como se ha descrito en la Figura 1 y tiene un diámetro exterior compatible con el diámetro interior del tubo de acceso rectal, es decir, en el intervalo de 15 a 20 mm.
- iii) Una fuente de aire comprimido 7 sirve para proporcionar un medio de presurización de la cavidad interior. El medio de presurización 7 puede comprender una jeringa (tal como se ha descrito en la Figura 2), una bomba de aire (tal como se ha descrito en la Figura 3) o un mini-contenedor de aire comprimido (mini-cilindro). La presión de aire dentro del dispositivo de muestreo celular se puede limitar/controlar ya sea usando un volumen fijo de aire (solución sencilla de la jeringa), o alcanzando un nivel fijo de presión de aire (con este objetivo, sería necesaria una válvula).
- iv) Una botella o tubo con una solución tampón 35 específica (deberían utilizarse tampones diferentes para distintos objetivos tales como extracción de ADN o ARN o aislamiento/separación de células para análisis posteriores).
- v) Una pestaña hermética 8 para el dispositivo de muestreo celular (necesaria para las reacciones de lisis

celular/proteica si se lleva a cabo una extracción inmediata de ADN o ARN, para procedimientos de aislamiento de células y, en especial, para la conservación/transporte del material si no se le utiliza de inmediato, por ejemplo, transporte desde el quirófano/clínica al laboratorio).

5 Los componentes necesarios para el procedimiento se pueden desarrollar para ser usados como un kit desechable, que debería incluir todos los componentes enumerados, excepto la fuente de aire comprimido, la cual se puede usar repetidas veces.

Descripción de la técnica de muestreo celular “*touch-print*” (manipulaciones rectales)

10 La Figura 5 muestra un ejemplo de la técnica de muestreo celular “*touch-print*” para tomar muestras de células exfoliadas de una superficie de la mucosa colorrectal en un sujeto humano, usando cualquiera de los dispositivos que se muestran en las Figuras 1 a 4. Este procedimiento es sencillo y no requiere una formación especial en proctología o endoscopia para llevarlo a cabo. Cualquier profesional sanitario (médico general, enfermera, etc.) puede aplicarlo en un ambulatorio local o en el domicilio del paciente, o incluso lo puede efectuar el propio paciente.

15 La Figura 5A ilustra esquemáticamente una sección transversal de la anatomía de recto 28, canal anal 26 y capa mucocelular colorrectal 7 humanos. Se debe señalar que cualquier contacto del dispositivo de muestreo celular con el epitelio escamoso del canal anal puede dar como resultado pérdida de material y contaminación de la muestra por epitelio escamoso del canal anal.

20 El procedimiento se inicia con la introducción de un tubo de acceso rectal 29 semejante a un rectoscopio, con el correspondiente obturador 30, en el recto 28 (Figura 5B). Se puede utilizar un lubricante apropiado para facilitar el procedimiento de introducción y reducir las posibles molestias del paciente producidas por esta fase inicial del procedimiento.

Cuando se ha introducido el tubo de acceso rectal 29 (Figura 5C) y se ha retirado el obturador 30, se obtiene un acceso directo a la mucosa rectal y se abre la capa mucocelular 27.

El miembro de inserción 1 se introduce en el tubo de acceso rectal 29, de manera que el borde superior del miembro de inserción esté situado inmediatamente por encima del borde del tubo de acceso rectal (Figura 5D).

25 Se aplica una primera presión elevada que hincha la membrana flexible de recolección, con el objetivo de hacer contactar la membrana con la capa mucocelular del recto 27, lo que proporciona un muestreo celular “*touch-print*” (Figura 5E). El dispositivo se mantiene en esa posición aproximadamente durante 10 a 15 segundos para lograr una mejor adhesión de las células exfoliadas y de materiales derivados de las células de la capa mucocelular a la membrana de recolección.

30 El miembro de inserción 1 se retira del tubo de acceso rectal 29 y se lleva al laboratorio para manipulaciones y análisis posteriores. Se coloca nuevamente el obturador 30 (se puede utilizar uno nuevo, con lubricación adicional) en el tubo de acceso rectal 29 y se extrae el tubo 29 de recto 28 (véase la Figura 5G). El procedimiento completo (manipulaciones rectales) no debe durar más de un par de minutos.

Procesamiento de las células recolectadas

35 La Figura 6 muestra un ejemplo de las etapas que puede seguir el método representado anteriormente (Figuras 5A a 5G), que se deben llevar a cabo inmediatamente después de la recogida de las células para evitar la desecación de la membrana recolectora de células. La etapa (a) muestra el dispositivo de muestreo celular 1 con células exfoliadas 31 en la membrana flexible de recolección de células después de la recogida de células. El compartimiento superior del dispositivo de muestreo celular 1 está lleno con un volumen fijo de una solución tampón específica 35 para la lisis o suspensión de las células exfoliadas (etapa (b)). Para los procedimientos de extracción de ADN o ARN se pueden usar diferentes tampones de lisis celular o medios de preservación de las células y en las aplicaciones que requieren aislamiento celular se deberán usar tampones/medios especiales. El dispositivo de muestreo celular está preparado para el transporte o la conservación de las muestras porque está herméticamente cerrado con un tapón de rosca 8 seguro (etapa (c)), pero puede apreciarse que cuando el tapón de rosca tiene un envase blíster que contiene una solución tampón, se puede omitir la etapa (b). A continuación, el dispositivo se puede almacenar o transportar para posteriores procedimientos de análisis/diagnóstico y/o fines de investigación (etapa (d)).

Análisis de las muestras

50 Es necesario destacar que la técnica ofrece un grado de estandarización mucho más alto en comparación con otros abordajes existentes. El empleo de un dispositivo estándar con presión/volumen de aire estándares, área estándar de la membrana de recolección hinchada (el área de contacto con la capa mucocelular del recto puede variar, pero esta variación es despreciable comparada con otras formas de obtención de células exfoliadas, por ejemplo, técnicas basadas en las heces) y la cantidad estándar de solución tampón que se agrega después del procedimiento de muestreo celular, ofrece condiciones muy favorables para los análisis comparativos del número de células o de cantidades de sustancias derivadas de las células (por ejemplo, ADN).

(a) Análisis de las muestras dirigidos al cribado de cáncer colorrectal

El cribado del cáncer colorrectal implica una extensa evaluación, basada en la población (definida por edades), de individuos que no sufren ninguna molestia, para revelar casos asintomáticos de la enfermedad (precoces en la mayor parte dellos), cuyo tratamiento a tiempo puede reducir la mortalidad causada por la patología. Un requisito obligatorio del método es su posibilidad de aplicación simultánea en miles/millones de personas.

i) Dado que se dispone de sólidas pruebas de que el número de colonocitos y ADN derivado de los colonocitos en la capa mucocelular del recto de pacientes con cáncer colorrectal es considerablemente mayor en comparación con los individuos libres del tumor, es muy probable que la técnica de muestreo directo de colonocitos exfoliados y materiales derivados de los colonocitos pueda proporcionar un ensayo de cribado simple del cáncer colorrectal, basado en la cuantificación directa de la cantidad de ADN extraído de las células. Para este método de abordaje, la solución tampón inicial que se usa inmediatamente después del muestreo celular debe ser un tampón de lisis celular utilizado para el procedimiento seleccionado de extracción de ADN. La adición del tampón debería ofrecer una eficaz lisis celular y la preservación del material que contiene ADN durante el transporte a un laboratorio especializado y (probablemente) un determinado tiempo de almacenamiento. El método de extracción de ADN se debe seleccionar sobre la base de su aplicabilidad para análisis de alto rendimiento, es decir, debe ser compatible con sistemas multicanal robotizados de manipulación de líquidos. Los valores exactos de cantidades de ADN que definan resultados "positivos", "negativos" y "dudosos" del ensayo se deben determinar en ensayos clínicos.

ii) Se pueden aplicar etapas iniciales similares de extracción de ADN para el análisis de marcadores moleculares de cáncer colorrectal. Las células sometidas a muestreo por el procedimiento "*touch-print*" deben proporcionar un ADN de mucho mayor calidad comparado con las técnicas de extracción de ADN empleadas actualmente a partir de muestras fecales. La amplificación por PCR de este ADN se puede llevar a cabo sin una cuantificación precisa de su cantidad. En el cribado del cáncer colorrectal, se considera la opción del análisis molecular multi-diana, si bien puede tomar más tiempo y ser más caro comparado con el análisis cuantitativo directo. Al mismo tiempo, el ADN extraído para la cuantificación directa se puede emplear obviamente para amplificación por PCR en análisis diagnósticos ulteriores de casos cuantitativamente "positivos" o "dudosos".

iii) En el caso de que se requiera un aislamiento específico de colonocitos de las células de otros tipos, se pueden aplicar métodos de separación (por ejemplo, separación inmunomagnética o por gradiente de densidad) para obtener una pureza más alta de la población de células colónicas para el análisis. Con este fin, se pueden aplicar algunos medios de preservación celular que contienen antibióticos (es imposible evitar una determinada presencia de bacterias en el material recolectado) y agentes mucolíticos. Los colonocitos aislados se pueden usar entonces para diferentes tipos de análisis tales como extracción y cuantificación de ADN, extracción de ADN seguida de amplificación por PCR, análisis de marcadores moleculares y bioquímicos del cáncer, evaluación citológica/citoquímica y recuento directo de células (dudoso en lo que respecta al cribado debido a su lentitud y elevado coste).

(b) Diagnóstico de cáncer colorrectal

El uso diagnóstico de pruebas se centra en individuos que presentan algunas molestias específicas o que ya han sido identificados como afectados por alguna enfermedad. Los grupos diana de pacientes son mucho más reducidos que los previstos con fines de cribado.

i) La cuantificación directa de ADN se puede aplicar en individuos que sufren molestias que indican posibles trastornos colorrectales.

ii) La extracción de ADN, seguida de amplificación por PCR, y el análisis molecular pueden ser de utilidad tanto para confirmar el diagnóstico inicial como para procedimientos de diagnóstico avanzado (valoración de la agresividad del cáncer, sensibilidad a la quimioterapia de tumores metastásicos, pronóstico, etc.).

iii) El aislamiento celular se puede utilizar tanto para análisis moleculares/bioquímicos adicionales como en la investigación citológica (en pacientes con CRC se pueden encontrar fácilmente células tumorales entre los colonocitos exfoliados).

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo de muestreo de células colorrectales que comprende:

un miembro de inserción colorrectal (1) que posee un extremo distal de inserción (2), un extremo proximal (34) y una cavidad interior (3) que se puede cerrar; una membrana flexible (4) que tiene una superficie exterior para la toma de muestras celulares (5) y una superficie interior, en donde dicha membrana está acoplada de manera estanca al extremo distal de inserción de dicho miembro de inserción, y que cuando se encuentra dentro de la cavidad interior, forma un receptáculo que tiene la superficie de muestreo celular en su interior, en donde el receptáculo está abierto hacia el extremo distal del miembro de inserción;

de manera que, durante su uso, la presurización de la cavidad interior hasta al menos una primera presión elevada, hace que la membrana emerja desde el extremo distal de dicho miembro de inserción para entrar en contacto con la superficie de la mucosa colorrectal, y la presurización de la cavidad interior a una segunda presión reducida, determina la inversión de la membrana, que vuelve a la cavidad interior de dicho miembro de inserción;

caracterizado por que el dispositivo comprende, adicionalmente, un medio (8) para sellar el extremo de inserción, para formar una cavidad cerrada, situada dentro de la cavidad interior del miembro de inserción y que está definida por la superficie de muestreo celular de la membrana flexible y el medio de sellado.
2. Un dispositivo según se define en la reivindicación 1, en donde la membrana flexible es elástica y está fabricada de un nitrilo, látex o una sustancia basada en el caucho.
3. Un dispositivo según se define en las reivindicaciones 1 o 2, en donde la cavidad interior que se puede cerrar del miembro de inserción está cerrada.
4. Un dispositivo según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además medios para la presurización de la cavidad interior, en donde dichos medios están acoplados al extremo proximal del miembro de inserción.
5. Un dispositivo según se define en la reivindicación 4, en donde dichos medios de presurización de la cavidad interior están acoplados a una válvula (18) tal como una válvula autosellable, que está presente en el extremo proximal del miembro de inserción.
6. Un dispositivo según se define en las reivindicaciones 4 o 5, en donde dichos medios de presurización de la cavidad interior comprenden una fuente de aire comprimido o una jeringa.
7. Un dispositivo según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el miembro de inserción está adaptado para ensamblarse con un tubo de acceso rectal.
8. Un dispositivo según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde se puede introducir un líquido en la cavidad cerrada formada por la membrana flexible y el medio de sellado.
9. Un dispositivo según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cavidad interior del miembro de inserción está provista de medios de adhesión.
10. Un dispositivo según se define en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el medio de sellado es un tapón de rosca.
11. Un dispositivo según se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10, en donde dichos medios de presurización de la cavidad se pueden desacoplar del miembro de inserción.
12. Un kit para recolectar una muestra de una superficie de la mucosa colorrectal de un sujeto humano, que comprende un dispositivo de muestreo de células colorrectales según la definición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, y un tubo de acceso rectal (29) y, opcionalmente, un obturador.
13. Un kit según se define en la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un lubricante tal como un gel lubricante.
14. Un kit según se define en cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, que comprende adicionalmente uno o múltiples reactivos tales como una solución tampón de lisis celular o un medio para la preservación de las células.
15. Un kit según se define en la reivindicación 14, en donde dichos uno o múltiples reactivos están presentes en el tapón de rosca en forma de un envase blíster (21).

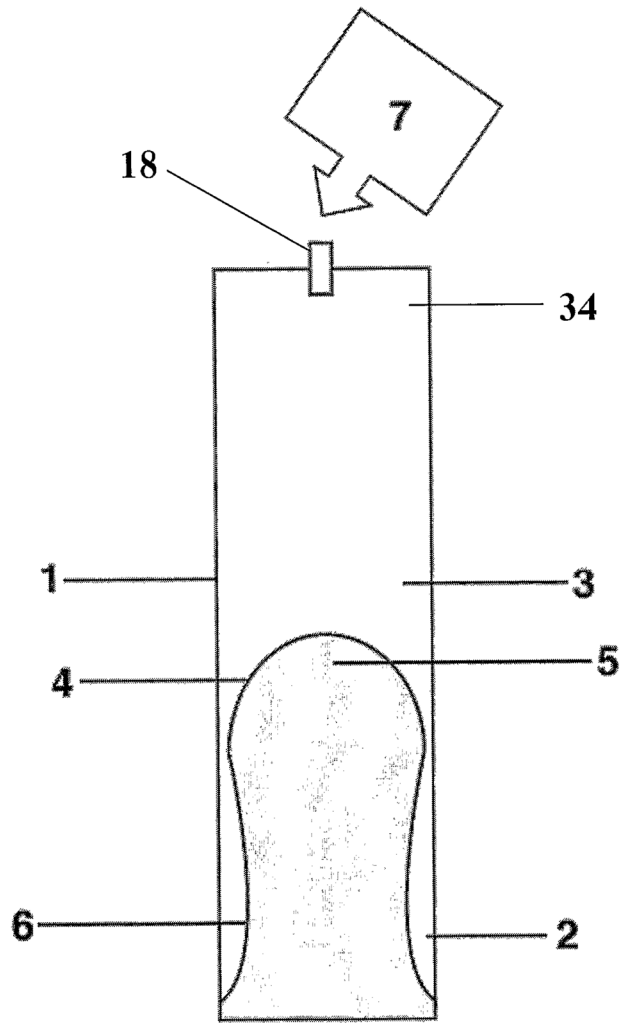


FIGURA 1

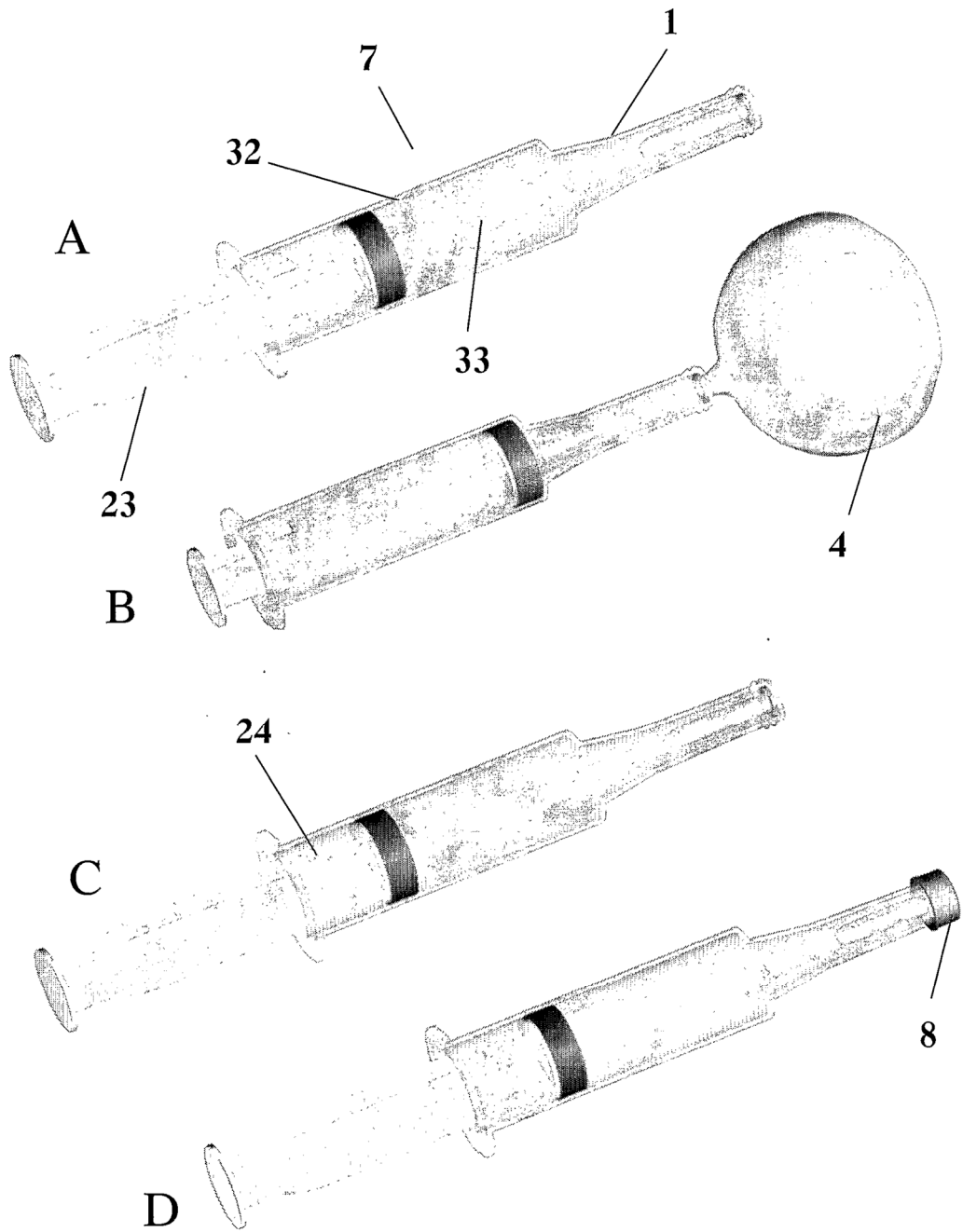


FIGURA 2

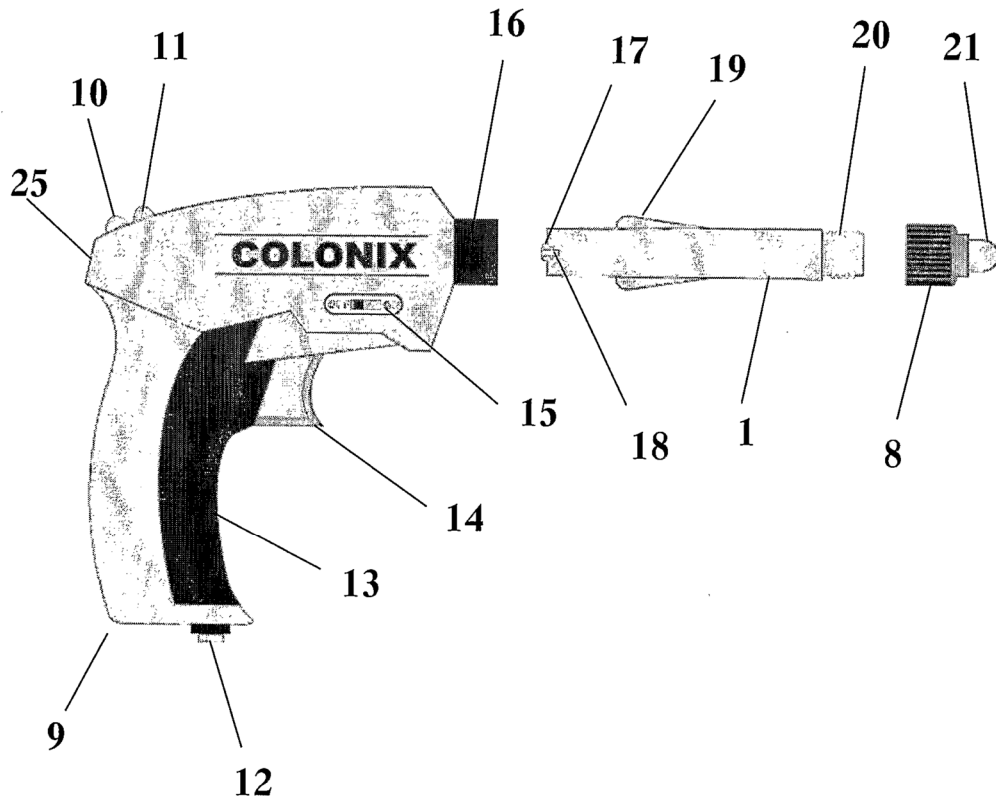


FIGURA 3

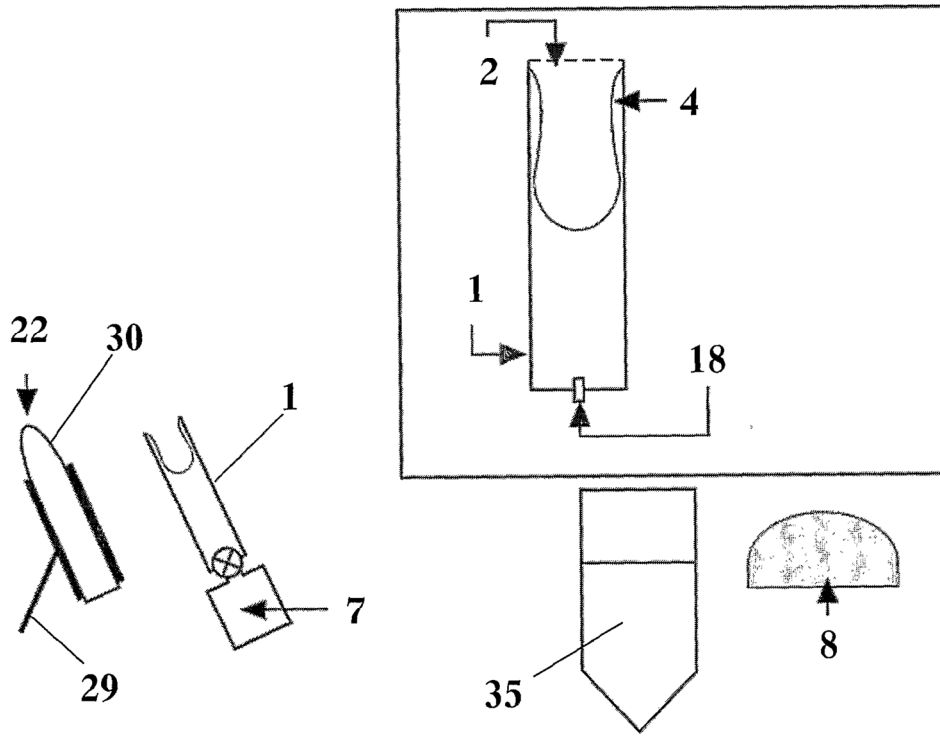


FIGURA 4

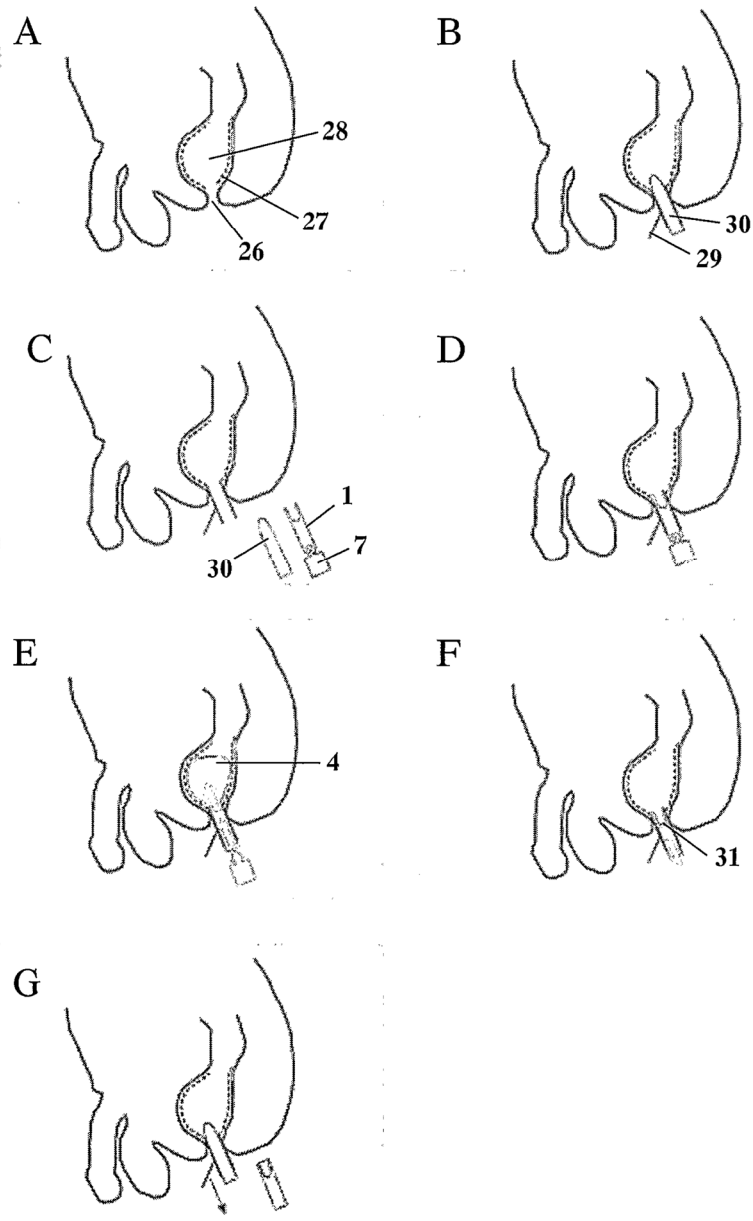


FIGURA 5

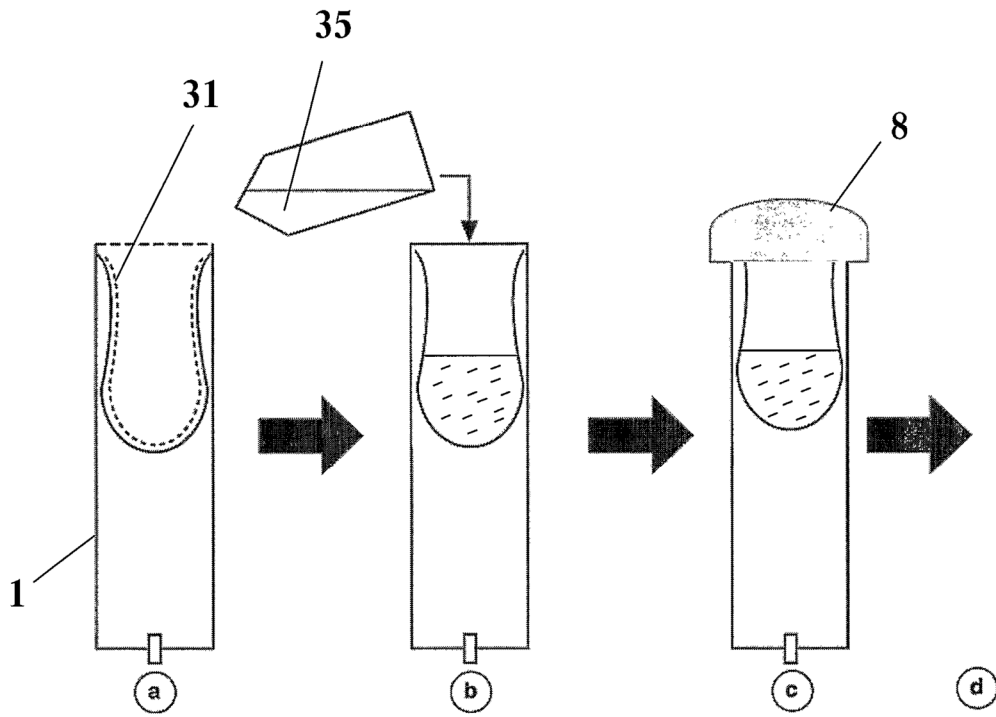


FIGURA 6