

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 664**

51 Int. Cl.:

A61B 10/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2014 PCT/GB2014/052776**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.03.2015 WO15036781**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2014 E 14784509 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 3043718**

54 Título: **Unidad de filtración de fluidos biológicos**

30 Prioridad:

13.09.2013 GB 201316347

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

01.03.2021

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED
(100.0%)**

**Angel Building 407 St. John Street
London EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**GULDBERG, PER y
STEVEN, KENNETH ERIC**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 808 664 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

Unidad de filtración de fluidos biológicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a unidades de filtración de fluidos biológicos y a los métodos para utilizar dichas unidades.

10 **Antecedentes de la invención.**

El cáncer de vejiga es el sexto cáncer más común a nivel mundial. Los síntomas incluyen hematuria microscópica o macroscópica, micción dolorosa y poliuria; sin embargo, ninguno de estos síntomas es específico de la enfermedad. El patrón de oro para diagnosticar el cáncer de vejiga es la cistoscopia y la posterior resección transuretral del tumor de vejiga (TURBT). La sensibilidad de la cistoscopia para el cáncer de vejiga sin invasión del músculo (NMIBC; estadio Ta, T1 y Tis) es alrededor del 80 % con cistoscopia de luz blanca y >95 % con cistoscopia guiada por fluorescencia (hexaminolevulinato).

La mayoría de pacientes de tumores de vejiga (70-80 %) son diagnosticados con NMIBC, que tiene un pronóstico relativamente bueno. Sin embargo, la tasa de reparaciones de estos tumores es muy alta, experimentando el 70 % de los pacientes recidivas, y hasta un 25 % de estas reparaciones progresará a cánceres invasivos del músculo (MIBC; estadio T2-4) con un mal pronóstico. La alta tasa de reparación y el riesgo de progresión requieren una supervisión durante toda la vida con cistoscopias periódicas, haciendo del cáncer de vejiga el cáncer más caro de tratar (Avritscher et al., 2006). Ya que menos del 10 % de todos los pacientes que presentan hematuria microscópica o visible será diagnosticado con cáncer de vejiga, el número de cistoscopias realizadas para descartar cáncer de vejiga es alto y supone una considerable carga para el sistema sanitario. Por otra parte, como la cistoscopia es un método invasivo que produce considerable incomodidad a los pacientes, existe una necesidad no satisfecha de técnicas no invasivas para un diagnóstico y vigilancia fiables y rentables del cáncer de vejiga.

La orina evacuada de pacientes con tumor de vejiga puede contener células tumorales exfoliadas que se pueden identificar mediante citología. La citología urinaria se ha usado durante décadas y sigue siendo la técnica no invasiva más habitual para la detección de los tumores de vejiga. Sin embargo, tiene una baja sensibilidad para la detección de NMIBC (10-20 %). Se han desarrollado algunos ensayos no invasivos alternativos, incluyendo algunos que han sido homologados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA): Ensayo de antígeno tumoral de vejiga, NMP22, ImmunoCyt y Urovysion. Hasta ahora, ninguno de estos ensayos ha conseguido un uso extendido en la práctica clínica debido a la baja especificidad (Liou, L.S. (2006). Urothelial cancer biomarkers for detection and surveillance. *Urology* 67, 25-33; Tetu, B. (2009). Diagnosis of urothelial carcinoma from urine. *Mod. Pathol.* 22 Supl. 2, S53-S59; Wadhwa, N., Jatawa, S.K., y Tiwari, A. (2012). Non-invasive urine based tests for the detection of bladder cancer. *J. Clin. Pathol.* 65, 970-975.).

Las células de tumores de vejiga contienen un gran número de alteraciones del genoma, incluyendo importantes anomalías cromosómicas, amplificaciones, deleciones, sustituciones de nucleótidos individuales y metilación anómala del ADN. Solo sería necesaria una minoría de los cambios encontrados en tumores individuales para iniciar y mantener el crecimiento neoplásico ("impulsores"), siendo el resto eventos "pasajeros" que tienen poco o ningún efecto sobre el fenotipo maligno. Ambos eventos, impulsores y pasajeros, pueden tener un potencial como biomarcadores del cáncer de vejiga, con la condición de que sean específicos del cáncer (es decir, que no se encuentren en tejidos normales o estén presentes con un nivel de expresión diferente) y recurrentes (es decir, se produzcan en tumores que surgen independientemente a frecuencias apreciables). Los genes mutados más frecuentemente en el cáncer de vejiga incluyen los protooncogenes *FGFR3*, *RAS*, y *PIK3CA*, y el gen supresor tumoral *TP53*. Las mutaciones en *FGFR3* son comunes en NMIBC, con frecuencias notificadas de >60 %, mientras que las mutaciones *TP53* se encuentran predominantemente en MIBC. Además, se ha comprobado que cientos de genes se van a metilar diferencialmente entre los tumores de vejiga y el epitelio de vejiga normal.

Los estudios de la última década han mostrado que es posible detectar alteraciones del genoma específicas de tumores de vejiga en el ADN aislado de sedimentos de orina. La sensibilidad y la especificidad de la detección de tumores de vejiga basada en ADN varía considerablemente entre estudios, dependiendo de la población de pacientes, la selección de los biomarcadores de ADN y los métodos empleados para detectar estos biomarcadores. Algunos estudios han notificado sensibilidades diagnósticas cercanas o superiores al 90 % y especificidades cercanas al 100 % (Dulaimi et al (2004). Detection of bladder cancer in urine by a tumor suppressor gene hypermethylation panel. *Clin. Cancer Res.* 10, 1887-1893; Costa et al (2010). Three epigenetic biomarkers, GDF15, TMEFF2, and VIM, accurately predict bladder cancer from DNA-based analyses of urine samples. *Clin. Cancer Res.* 16, 5842-5851; Hoque et al (2006). Quantitation of promoter methylation of multiple genes in urine DNA and bladder cancer detection. *J. Natl. Cancer Inst.* 98, 996-1004; Reinert et al (2011). Comprehensive genome methylation analysis in bladder cancer: identification and validation of novel methylated genes and application of these as urinary tumor markers. *Clin. Cancer Res.* 17, 5582-5592). Un estudio reciente ha sugerido que el análisis de biomarcadores del ADN en orina puede utilizarse también para vigilar las recidivas y reducir el número de cistoscopias en pacientes de bajo riesgo sin tumores

simultáneos (Reinert et al (2012). Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation. PLoS. One. 7, e46297). Con la llegada de métodos mejorados para la detección del ADN específico de tumor poco abundante, incluyendo la PCR de tercera generación (PCR digital) y la secuenciación de última generación, el potencial de detección basado en orina de los tumores de vejiga ha aumentado de forma muy importante.

Uno de los principales desafíos cuando se usan marcadores de ADN urinarios para el diagnóstico y la vigilancia del cáncer de vejiga es obtener un número suficiente de células para el análisis posterior. En algunos estudios, se han excluido hasta un 35 % de las muestras del análisis debido a cantidades insuficientes de ADN (Reinert et al., 2012). El número de células tumorales exfoliadas en la orina muestra una variabilidad alta entre e intraindividuos. En general, el número de células liberadas se correlaciona con el tamaño y el estadio tumoral, de tal manera que los tumores pequeños de estadios tempranos liberarán menos células que MIBC. Esto limita la utilidad de los marcadores de ADN urinarios en la detección no invasiva y el control de la enfermedad y la progresión de la enfermedad.

El documento WO2010/131140 A1 describe un dispositivo de selección de una muestra biológica.

El documento US 4.829.005 describe un aparato para aislar e identificar microorganismos en sangre o similar que comprende un sistema de recogida tubular.

El documento WO2014/081877 A1 describe un aparato médico y un método para preparar uno o más bloques de células.

El documento US 5.849.505 describe un recipiente de recogida de fluidos biológicos que comprende un miembro de copa, un conjunto de tapa montado de forma desmontable en el miembro de copa que comprende una carcasa con una falda cilíndrica que se extiende hacia abajo, una cerradura de tipo luer con un orificio pasante que se extiende desde un lado della carcasa de la tapa.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en la percepción de los inventores de que una unidad conveniente y eficaz para capturar y almacenar material biológico obtenido de fluidos biológicos puede ofrecer ventajas significativas a pacientes y médicos especialistas en el diagnóstico y la vigilancia prolongada de dolencias y trastornos.

En términos generales, la presente invención se refiere a unidades de filtración para la recogida fácil y rentable de material biológico de fluidos biológicos y a los métodos que utilizan estas unidades de filtración. La presente invención se refiere además a unidades para el almacenamiento de material biológico recogido de dichos fluidos, y a métodos para utilizar los mismos.

La provisión de unidades para la recogida fácil y rentable de material biológico procedente de fluidos biológicos que pueda, por ejemplo, proporcionarse a un paciente para su uso en el hogar, ofrece ventajas significativas a los pacientes. El material capturado puede almacenarse inmediatamente, tanto para la provisión posterior a un analista o médico especialista en una cita, o enviarse por correo a un centro médico o instalación de ensayo adecuada para su análisis a través de un transportista.

Las unidades de la presente invención ofrecen también ventajas en la prestación de cuidados médicos en el domicilio del paciente mediante la visita de médicos especialistas y cuidadores. El material capturado puede almacenarse inmediatamente, tanto para enviar por correo a un centro médico o instalación de ensayo adecuada o transportarlo hasta allí por el médico especialista o cuidador. Las unidades de la presente invención ofrecen también ventajas en la prestación de cuidados médicos durante las visitas a la clínica o al hospital y/o en caso de ingreso hospitalario.

Por ejemplo, las unidades y métodos descritos en el presente documento pueden ser de relevancia en la recogida y filtración de la orina para la captura y detección de células asociadas con trastornos genitourinarios. Estos trastornos pueden incluir cánceres genitourinarios tales como, por ejemplo, y no de forma excluyente, cáncer de vejiga, próstata y de riñón. Estos trastornos pueden incluir también cánceres ginecológicos tales como cáncer de endometrio o cánceres que se han metastatizado al sitio genitourinario desde otros sitios. Los usos de las unidades descritas en el presente documento dirigidos a la filtración de orina fueron motivados por la percepción de los inventores de las limitaciones de los procedimientos actuales para el diagnóstico del tumor de vejiga y las desventajas de la cistoscopia, que se usa comúnmente para el diagnóstico y la vigilancia prolongada de pacientes, tanto en términos de incomodidad del paciente como de la carga que este enfoque supone para los sistemas sanitarios.

Sin embargo, las células y otro material biológico asociado con trastornos urológicos diferentes al cáncer también se pueden capturar y almacenar utilizando unidades de la presente invención.

Se apreciará que las unidades de la invención se pueden usar también para la recogida de células (tal como por ejemplo, y no de forma excluyente, células epiteliales normales, cancerosas, bacterianas o de levaduras) y otro material biológico (tal como por ejemplo, y no de forma excluyente, proteínas o ácidos nucleicos) procedentes de otras

muestras biológicas, tales como por ejemplo, y no de forma excluyente, saliva, sueros, sangre y lavados, por ejemplo, lavados de vejiga.

5 La unidad puede comprender un dispositivo de filtración y una unidad de almacenamiento. El método puede comprender una etapa inicial de capturar material biológico forzando el fluido a través de un filtro que se aloja en un soporte, por ejemplo, un cartucho de filtro extraíble. Tras la filtración, el soporte con el contenido del filtro puede extraerse del dispositivo de filtración e introducirse en la unidad de almacenamiento, que puede contener una solución adecuada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material biológico capturado.

10 En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención puede proporcionar una unidad de filtración de fluido biológico que comprende un dispositivo para filtrar una muestra de fluido biológico, y una unidad de almacenamiento, teniendo el dispositivo de filtración una cámara de recogida, un depósito de residuos, y una plataforma de un soporte del filtro, alojando la plataforma de soporte del filtro un cartucho de filtro extraíble que tiene un filtro adecuado para capturar material biológico presente en la muestra de fluido biológico; en donde la cámara de recogida, el depósito de residuos y la plataforma de soporte del filtro se pueden conectar para permitir el paso de un fluido biológico desde la cámara de recogida al interior del depósito de residuos a través del filtro del cartucho de filtro; y teniendo la unidad de almacenamiento un cuerpo configurado para acoplarse al cartucho de filtro extraíble de tal manera que, cuando está acoplado, el filtro del cartucho de filtro queda herméticamente cerrado dentro del cuerpo de la unidad de almacenamiento.

20 El cartucho de filtro se retiene de manera deslizante en la plataforma del soporte del filtro. Es decir, la plataforma del soporte del filtro puede tener un rebaje de un tamaño y forma adecuados para recibir el cartucho de filtro de tal manera que, cuando se inserta el cartucho de filtro, el filtro se sitúa como se describe de tal manera que, en uso, el fluido pasa desde la cámara de recogida al depósito de residuos a través del filtro. Este acoplamiento deslizante puede estar provisto de protuberancias y rebajes complementarios sobre el cartucho de filtro y en el rebaje para mejorar el ajuste y sujeción y/o proporcionar una interacción de tipo ajuste rápido para evitar la retirada accidental del cartucho de filtro en uso.

30 El cuerpo de la unidad de almacenamiento comprende un rebaje para recibir de manera deslizante el cartucho de filtro. Preferentemente, el rebaje del cuerpo de la unidad de almacenamiento se configura para acoplarse al cartucho de filtro de tal manera que el cartucho de filtro no pueda retirarse accidentalmente. Esto puede ser mediante el uso de un acoplamiento suficientemente ajustado, o mediante la provisión de protuberancias y rebajes complementarios sobre el cartucho de filtro y en el rebaje para mejorar el ajuste y sujeción y/o proporcionar una interacción de tipo ajuste rápido para retener el cartucho de filtro en su lugar.

35 El cuerpo de la unidad de almacenamiento puede tener una abertura para permitir el acceso al filtro y/o al contenido del filtro del filtro y/o el líquido que rodea el filtro cuando el cartucho de filtro está en su lugar. Por tanto, la unidad de almacenamiento puede comprender además una tapa extraíble que cubre la abertura. Se apreciará que, dependiendo del uso previsto y de la naturaleza de la tapa, en algunas realizaciones, la tapa puede disponerse para proporcionar acceso solo al contenido del filtro, es decir, el material biológico atrapado en el filtro tras el uso, o al contenido del filtro y/o cualquier líquido que lo rodea tras el uso.

45 Para algunas aplicaciones, puede ser preferible que el material biológico capturado se exponga a una solución antes del análisis. Esto puede facilitar el análisis y/o mejorar el almacenamiento. Una solución adecuada puede ser, por ejemplo, un tampón adecuado para inducir la lisis celular, un fijador/conservante, un medio de cultivo, un tampón isotónico o un tampón adecuado para la elución, cada uno como se describe en el presente documento. Se apreciará que la provisión de una cámara de solución, y la inclusión de una solución, es una característica opcional.

50 En consecuencia, en algunas realizaciones, la unidad de almacenamiento se dispone de tal manera que la tapa tiene una cámara de solución que contiene una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material biológico, en donde el acoplamiento de la tapa con el cuerpo de la unidad de almacenamiento hace que se libere la solución de tal manera que esta entre en contacto con el filtro. Se apreciará que para las unidades que tienen dicha disposición, tras la filtración y la captura de material biológico en el filtro, el cartucho de filtro puede insertarse en la unidad de almacenamiento sin la tapa colocada en su lugar. A continuación, la tapa puede colocarse, liberando de esta forma la solución.

60 La unidad de almacenamiento puede configurarse alternativamente para tener una cámara de solución dispuesta de tal manera que el acoplamiento del cartucho de filtro con la unidad de almacenamiento produce la liberación de la solución para ponerse en contacto con el filtro. En algunas realizaciones preferidas, la unidad de almacenamiento tiene un pistón retenido en el rebaje, definiendo el pistón y el rebaje una cámara de solución distal desde la abertura del rebaje, conteniendo la cámara de solución una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento, el procesamiento y/o el análisis del material biológico, estando el pistón configurado de tal manera que la inserción del cartucho de filtro en el rebaje hace que el pistón se mueva adicionalmente en el rebaje, de tal manera que la solución contenida en la cámara se fuerza a pasar alrededor del pistón en contacto con el filtro, y por tanto, con cualquier contenido de filtro presente. La unidad de almacenamiento puede estar provista de una solución en su lugar en la cámara, o se puede proporcionar por separado para su inclusión en la unidad de almacenamiento por un usuario. En

consecuencia, se puede permitir el acceso a la cámara de la solución mediante la retirada de la tapa.

Aunque se apreciará que las unidades descritas en el presente documento se pueden usar para filtrar fluidos biológicos usando solo la gravedad, es decir, mediante percolación gravitacional, es preferible proporcionar un medio de, o para, facilitar el paso del líquido biológico a través del filtro. Esto puede conseguirse creando un diferencial de presión, por ejemplo, proporcionando medios para aplicar presión al líquido de la cámara de recogida para empujar el fluido biológico a través del filtro, o proporcionando medios para crear un vacío en el depósito de residuos para aspirar el fluido biológico a través del filtro.

Preferentemente, el dispositivo de filtración tiene medios para permitir la aplicación de presión a un fluido contenido en la cámara de recogida cuando el dispositivo está acoplado para forzar el paso del fluido a través del filtro hacia el depósito de residuos. La cámara de recogida puede ser compresible por sí misma de tal manera que cuando el dispositivo de filtración está acoplado y la cámara de recogida contiene una muestra de fluido, la compresión de la cámara de recogida aplica presión al fluido, forzando por tanto al fluido a pasar a través del filtro hacia el depósito de residuos. Por ejemplo, la cámara de recogida puede ser una bolsa cilíndrica con un muelle que rodea la bolsa cilíndrica a lo largo de su eje cilíndrico, permitiendo por tanto la compresión de la bolsa cilíndrica en la dirección de su eje cilíndrico. Sin embargo, se pueden usar disposiciones alternativas. Por ejemplo, la cámara de recogida puede estar provista de un pistón configurado para forzar el paso de un fluido biológico a través del filtro de la cámara de recogida al depósito de residuos cuando el dispositivo de filtración está acoplado tras el suministro de la muestra. Se puede usar también un sistema de bombeo para aplicar presión.

En una disposición alternativa, se pueden proporcionar medios para generar un vacío para impulsar/succionar el fluido a través del filtro. Esto puede ser mediante el uso de una bomba dispuesta para extraer aire del depósito de residuos, creando así un vacío, o el propio depósito de residuos puede estar provisto de una cámara al vacío. Esta cámara puede a continuación abrirse al resto del depósito de residuos, liberando, por ejemplo, una válvula, para aspirar el fluido a través del filtro durante la filtración.

Si se va a usar un diferencial de presión para forzar a pasar/extraer el fluido biológico a través del filtro, puede ser deseable incluir una o varias válvulas configuradas para permitir equilibrar la presión en el dispositivo durante y después de la aplicación de presión/vacío.

Aunque se apreciará que las unidades de la presente invención son aplicables a la filtración de muchas muestras de fluidos biológicos como se describe en el presente documento, en algunas realizaciones preferidas, el fluido biológico es orina o un lavado de vejiga, lo más preferente orina. En algunas realizaciones diferentes, el fluido puede ser sangre o suero. El depósito de residuos puede contener un absorbente y/o un material desodorizante, lo que puede ser especialmente ventajoso para la filtración de las muestras de orina.

Se puede seleccionar el filtro para capturar material biológico según se desee y como se describe en el presente documento. Preferentemente, el filtro se selecciona para capturar material biológico asociado con el diagnóstico y/o el pronóstico de una enfermedad, dolencia o trastorno, por ejemplo, del cáncer. En algunas realizaciones preferidas, el material biológico son células suspendidas en el fluido biológico, más preferentemente, células suspendidas en orina.

El material biológico puede analizarse para determinar la presencia de, por ejemplo, marcadores asociados con el diagnóstico y/o el pronóstico de una enfermedad, dolencia o trastorno. El material biológico pueden ser células adecuadas para ensayar la presencia de un marcador que es indicativo de una enfermedad, dolencia o trastorno o concreto, por ejemplo, marcadores asociados con el diagnóstico y/o el pronóstico de cánceres urológicos.

En un aspecto adicional, la presente invención puede proporcionar un método para capturar un material biológico de una muestra biológica que utiliza una unidad como se describe en el presente documento, comprendiendo el método:

- (i) proporcionar una muestra de fluido biológico en la cámara de recogida;
- (ii) conectar la cámara de recogida a la plataforma de soporte del filtro y al depósito de residuos;
- (iii) hacer que la muestra de fluido biológico fluya desde la cámara de recogida al depósito de residuos a través del filtro para capturar el material biológico presente en el fluido; y
- (iv) retirar el cartucho de filtro de la plataforma de soporte del filtro e insertar el cartucho de filtro en la unidad de almacenamiento.

El método puede comprender además la etapa de aplicar presión a la muestra de fluido biológico en la cámara de recogida para forzar a pasar el flujo de la muestra de fluido biológico desde la cámara de recogida al depósito de residuos a través del filtro, por ejemplo, comprimiendo la cámara de recogida, si la unidad se dispone adecuadamente. Como alternativa, el método puede comprender además la etapa de generar un vacío en el depósito de residuos para succionar la muestra de fluido biológico a través del filtro.

La combinación del cartucho de filtro y la unidad de almacenamiento puede proporcionar una unidad cerrada herméticamente cómoda para el almacenamiento y/o el transporte del material biológico capturado. Por ejemplo, la combinación del cartucho de filtro y la unidad de almacenamiento puede almacenarse a continuación antes del ensayo,

entregarse a un cuidador adecuado, por ejemplo, un médico especialista, o transportarse usando, por ejemplo, un transporte de correo nacional o un sistema de correo interno, en cada caso, de forma cómoda e higiénica.

Una vez recibido por un analista, el material biológico capturado puede recuperarse desde el filtro y/o cualquier líquido circundante y analizarse como se describe en el presente documento. Este ensayo puede ayudar en el diagnóstico y el pronóstico de las dolencias que se describen en el presente documento. En consecuencia, se describe en este punto un método en donde,

habiendo filtrado una muestra biológica usando una unidad y/o un método como se describe en el presente documento, un método que comprende las etapas de

- (i) aislar ácidos nucleicos, proteínas o células del material biológico capturado en el filtro y/o en la solución si está presente; y
- (ii) ensayar el material aislado según marcadores conocidos por estar asociados con una enfermedad, dolencia o trastorno concreto.

Se apreciará que las unidades que se describen en el presente documento se proporcionarán normalmente a un usuario, que pueden ser los propios pacientes o un cuidador adecuado tal como un médico especialista, en forma de kit. En consecuencia, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un kit que comprende una cámara de recogida, una plataforma de soporte del filtro, un depósito de residuos y una unidad de almacenamiento, como una realización cualquiera descrita en el presente documento y, opcionalmente, instrucciones para un método como se describe en el presente documento.

Se apreciará que, en algunas circunstancias, los elementos individuales de la unidad pueden proporcionarse por separado, y que la invención proporciona también un cartucho de filtro como se describe en el presente documento y una unidad de almacenamiento como se describe en el presente documento que se pueden suministrar por separado al resto de la unidad.

La presente invención incluye cualquier combinación de los aspectos y características preferidos descritos, exceptuando cuando tal combinación sea claramente inaceptable o se evite expresamente.

Breve descripción de las figuras

Se describirán a continuación las realizaciones y métodos de la presente invención, a modo de ejemplo, haciendo referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La **Figura 1** muestra un dibujo técnico que muestra una vista en despiece ordenado de una unidad de filtración de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 2** muestra una vista en perspectiva de una cámara de recogida (izquierda) y una unidad de filtración (derecha).

La **Figura 3** muestra una vista lateral de un dispositivo acoplado de la presente invención.

La **Figura 4** muestra una unidad de almacenamiento alternativa de acuerdo con la presente invención, y el montaje de la misma.

La **Figura 5** muestra un análisis de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) del exón 2 de *HRAS*. La línea de células T24 humana es homocigótica para la mutación G12V.

La **Figura 6** muestra el análisis de pirosecuenciación de 6 sitios CpG del promotor *BCL2*. **A)** Muestra filtrada, **B)** muestra sin filtrar.

La **Figura 7** muestra el análisis MethyLight del promotor *BCL2* en muestras de orina del pac. X (diagnosticado con un tumor Ta de grado alto). Se obtuvo una señal positiva solo para la muestra del filtro; A marca el "Filtro", B marca el "Sedimento".

La **Figura 8** muestra el análisis de pirosecuenciación del promotor *BCL2*. **A)** Muestra filtrada del pac. Y, **B)** sedimento del pac. Y.

La **Figura 9** muestra la captura de células tumorales del fluido mediante filtración usando un dispositivo montado con un filtro de membrana de policarbonato de un tamaño de poro de 8 μm . Los datos de las mediciones por triplicado (cada una del 4 % del ADN total) de un experimento se representan como medias \pm SD. Los porcentajes por encima de las barras representan el número de células recuperadas con respecto al número de células de entrada.

La **Figura 10** muestra el enriquecimiento basado en filtración de células de cáncer de vejiga en un fondo de linfocitos normales. **A)** gráficos ddPCR de amplitud de la fluorescencia de la señal de fluorescencia de la sonda FGFR3 R248C-FAM (panel superior) y de la señal de fluorescencia de la sonda FGFR3 WT-HEX (panel inferior). **B)** Diagrama de barras que muestra el número de moléculas FGFR mutantes con respecto al número de células tumorales de entrada.

Se calcularon los recuentos totales de moléculas FGFR sobre la base de tres ensayos de la ddPCR independientes, usando cada uno un 4 % del ADN total como molde, y se representan como medias \pm SD. Los porcentajes por encima de las barras representan el número de células recuperadas con respecto al número de células de entrada.

La **Figura 11** muestra la detección de ADN derivado de tumor en muestras de orina emparejadas preparadas mediante el dispositivo de filtración y sedimentación. Se ensayaron cantidades equimolares de ADN de los filtros y sedimentos para las mutaciones FGFR3 usando la ddPCR.

Descripción detallada

Las siguientes aplicaciones de la presente invención se proporcionan a modo de ejemplo y no de limitación.

5 La unidad

En la **Figura 1** se muestra una vista en despiece ordenado de una unidad de filtración de un fluido biológico montada de acuerdo con la presente invención. En la **Figura 3** se muestra el dispositivo montado y el uso del mismo, mientras que la **Figura 2** muestra la cámara de recogida (izquierda) y una unidad de filtración montada a partir de la plataforma de soporte del filtro y el depósito de residuos (derecha) antes de su acoplamiento para dar como resultado el dispositivo montado.

La cámara de recogida **1** está abierta por la parte superior por comodidad para la obtención de muestras. La cámara de recogida está formada por una bolsa cilíndrica **3** de material impermeable al agua, que tiene aproximadamente 15 100 mm de longitud y 95 mm de diámetro y es adecuada para alojar un volumen de aproximadamente 500 ml por comodidad para la obtención de muestras y un ADN máximo cuando se analizan muestras de orina. Se apreciará que pueden ser adecuados otros tamaños y volúmenes, para la recogida de orina y otras muestras de fluidos biológicos. Por ejemplo, para algunos usos pueden ser adecuados tamaños para acomodar volúmenes de 20 ml a 250 ml. En consecuencia, en algunas realizaciones, la cámara de recogida es adecuada para alojar hasta 400 ml, 300 ml, 250 ml, 20 100 ml, 50 ml, o hasta 20 ml. Aunque volúmenes más grandes pueden ser adecuados para la recogida de orina, volúmenes más pequeños pueden ser preferible para la filtración de, por ejemplo, saliva.

La bolsa cilíndrica está contenida en un muelle **5** que comunica cierta rigidez a la bolsa cilíndrica de la cámara de recogida. En el extremo sellado de la bolsa cilíndrica hay una tapa **7** y en el extremo abierto de la bolsa cilíndrica hay 25 una porción de unión **9** al muelle anular que rodea el extremo abierto de la bolsa cilíndrica sin ocluir sustancialmente la porción abierta. El muelle **5** se conecta a o colinda con la tapa **7** por un extremo y la porción de unión **9** anular en el otro extremo. La tapa **7** y la porción de unión **9** al muelle anular son rígidas y están fabricadas de material plástico, aunque se pueden usar otros materiales rígidos adecuados, por ejemplo, un metal tal como acero inoxidable. La tapa **7** es circular y no perforada, y de un diámetro ligeramente más grande que el diámetro de la bolsa cilíndrica. Está conformada de tal manera que se proyecta dentro del volumen de la bolsa cilíndrica cuando está acoplada, aunque 30 se puede usar también una tapa plana o una tapa perforada. El uso de un muelle retenido por la tapa y una porción de unión del muelle anular permite la compresión de la cámara de recogida en la dirección del eje cilíndrico de la cámara de recogida. Se pueden usar también otros medios adecuados que sirven a la misma función, por ejemplo, una serie de muelles que rodean la bolsa cilíndrica o una serie de varillas telescópicas. En estos casos, se pueden 35 usar bolsas de formas que no sean cilíndricas. La cámara de recogida tiene una unión **11** de anillo de bloqueo a la cual se puede fijar la porción **9** de unión al muelle por medio de una interacción de ajuste rápido. Se pueden usar otros medios de fijación, incluyendo roscas de tornillos complementarios y orejetas giratorias.

La cámara de recogida se puede conectar mediante la unión **11** del anillo de bloqueo a la unidad de filtración **13** para 40 montar el dispositivo completo de filtración. Esta conexión es necesariamente sustancialmente estanca para permitir el uso del dispositivo como se describe en el presente documento sin pérdida de fluido antes de la filtración, con una junta tórica **14** que está retenida en la ranura anular alrededor de la parte superior de la unidad de filtración para mejorar el sello. La unidad de filtración **13** tiene una plataforma **15** de soporte del filtro. Existen pequeñas protuberancias en la plataforma **15** de soporte del filtro para encajar con indentaciones complementarias en la porción 45 de unión **9** anular. Se apreciará que se pueden proporcionar alternativamente otros medios de unión.

La plataforma **15** de soporte del filtro tiene un cartucho de filtro **17** extraíble con un filtro de membrana **19** y se puede conectar a un depósito de residuos **21**. Se apreciará que se pueden usar también otros materiales de filtro como se describe en el presente documento. El depósito de residuos **21** es un recipiente cilíndrico rígido fabricado de materiales plásticos capaz de acomodar un volumen de al menos 500 ml (es decir, el volumen total del líquido contenido en la cámara de recogida antes de la filtración). Pueden usarse otros materiales rígidos adecuados para recibir fluidos en lugar de materiales plásticos. El depósito de residuos **21** y la plataforma **15** de soporte del filtro se pueden conectar 50 para formar, junto con el cartucho de filtro **17**, la unidad de filtración **13**. Esta conexión es necesariamente sustancialmente estanca para permitir el uso del dispositivo como se describe en el presente documento sin pérdida de fluido durante de la filtración. En esta realización, el depósito de residuos **21** y la plataforma **15** de soporte del filtro se pueden conectar mediante una conexión de ajuste rápido entre un saliente en el exterior del depósito de residuos **21** y una ranura anular en el interior de la plataforma **15** de soporte del filtro. En algunas realizaciones, el depósito de residuos **21** contiene un material absorbente de humedad y/o un desodorante. Los materiales absorbentes de la humedad adecuados pueden incluir material absorbente tal como papel, lana de algodón o esponja, o gel de sílice y/u 60 otros polímeros absorbentes de agua conocidos en la técnica. La inclusión de un material absorbente de humedad mejora la facilidad de eliminación del depósito de residuos tras el uso. Los desodorantes adecuados pueden incluir carbonatos tales como carbonato de potasio.

La vista en despiece ordenado que se muestra en la **Figura 1** muestra las partes componentes de la plataforma **15** de 65 soporte del filtro. En términos generales, la plataforma de soporte del filtro se puede conectar tanto a la cámara de conexión por su extremo abierto como al depósito de residuos, y cuando el dispositivo está completamente montado

separa ambos. La plataforma de soporte del filtro tiene una abertura **23** que permite la comunicación de fluidos entre la cámara de recogida y el depósito y el filtro **19** de la porción de soporte del filtro, en este caso, el cartucho de filtro **17**, ocluye esta abertura de tal manera que el fluido que pasa desde la cámara de recogida al depósito de residuos pasa a través del filtro. La plataforma de soporte del filtro tiene un rebaje ranurado **25** adecuado para recibir un cartucho de filtro **17** de tal manera que el filtro del cartucho de filtro ocluye la abertura como se ha descrito. El cartucho de filtro puede insertarse y retirarse del rebaje ranurado con un movimiento de deslizamiento.

Como se muestra en la **Figura 1**, la plataforma de soporte del filtro se monta a partir de una porción superior **27** y una porción inferior **29**, que se encajan entre sí mediante una conexión de ajuste rápido entre salientes en la porción superior y rebajes complementarios en la porción inferior. Pueden considerarse otros medios de conexión incluyendo otras interacciones de ajuste rápido y roscas de tornillo complementarias. La realización que se muestra en la **Figura 1** tiene dos asas, **31** y **32** para facilitar el uso. Se entenderá que las asas no son necesarias, y que se pueden usar otras disposiciones de asas, por ejemplo, una única asa, un asa anular continua, o una o más asas con forma de D.

Las porciones superior e inferior, **27** y **29**, cuando se acoplan entre sí, definen una ranura **25** adecuada para recibir un cartucho de filtro **17** como se ha descrito. Se proporciona una junta tórica **33** para evitar escapes durante el uso. La plataforma de soporte del filtro comprende además una membrana **35** de flujo de retorno y una válvula **37** de alivio de presión. La válvula de alivio de presión se configura para activarse a una presión determinada y permitir el paso del líquido a la cámara de residuos en caso de que el filtro se sature. La membrana **35** de flujo de retorno se adapta para permitir el paso del aire desde el depósito **21** a la cámara de recogida **1** durante la aplicación intermitente de presión para evitar que el contenido del filtro se alterarse debido a las turbulencias. Existe además un agujero pequeño (no se muestra) en **29** que permite que salga el aire completamente de la unidad. En esta realización, la válvula de alivio es una válvula de tipo paraguas que se abre a una presión de 10-12 kg, pero se pueden usar otras válvulas adecuadas.

El cartucho de filtro **17** tiene un cuerpo de una anchura complementaria a la anchura de la ranura, y es suficientemente largo para hacer que una porción del cuerpo sobresalga del rebaje ranurado durante el uso (como se muestra en la **Figura 2**) para facilitar la retirada del cartucho desde el dispositivo. La carcasa del cartucho de filtro puede tener una o más indentaciones o perforaciones **41** para mejorar el agarre y ayudar a la retirada. El filtro **19** se aloja en un borde dentro de una abertura en la carcasa del cartucho de filtro y se mantiene en su lugar mediante un sobresorte **43** perforado que está conectado a la carcasa por una conexión de ajuste rápido entre salientes del sobresorte perforado y rebajes complementarios en la carcasa. Pueden considerarse otros medios de conexión incluyendo otras interacciones de ajuste rápido y roscas de tornillo complementarias. Las juntas tóricas **45**, **47**, y **48** mejoran el cierre hermético. La junta tórica **47** mejora el cierre hermético del cartucho de filtro **17** acoplado alrededor del filtro **19**, mientras que las juntas tóricas **45** y **48** están presentes en la superficie externa del cartucho de filtro **17** y sirven para mejorar el cierre hermético cuando el cartucho de filtro **17** está alojado dentro de la plataforma del soporte del filtro para la filtración del fluido biológico y para mejorar el cierre hermético cuando el cartucho de filtro **17** está insertado en la unidad de almacenamiento **49** de acuerdo con la presente invención.

La **Figura 1** muestra además dicha unidad de almacenamiento **49** de acuerdo con la presente invención. El cartucho de filtro **17** puede insertarse en la unidad de almacenamiento **49** tras el uso para facilitar el almacenamiento y transporte y puede preservar la muestra durante el almacenamiento. La unidad de almacenamiento **49** proporciona además un medio para facilitar el acceso al contenido del filtro (y cualquier líquido que lo rodea) para su análisis sin la necesidad de retirar el cartucho de la unidad de almacenamiento. En términos generales, como se muestra en la **Figura 1**, la unidad de almacenamiento comprende una base **51** que tiene un rebaje **53** adecuado para recibir el cartucho de filtro. Esta base tiene una abertura **55** localizada para permitir el acceso al contenido del filtro para el análisis y el procesamiento cuando se inserta el cartucho de filtro. La abertura está cubierta por una tapa **57** para preservar la muestra y permitir el almacenamiento y el transporte. En la **Figura 1** la tapa conecta la base mediante roscas de tornillo complementarias, aunque pueden considerarse otros medios de conexión incluyendo una interacción de ajuste rápido adecuada o tapa abatible. La tapa **57** comprende una cámara que contiene un líquido adecuado que se libera durante el acoplamiento de la tapa con la base **51**. Por ejemplo, la tapa puede ser una tapa OG-250 de Oragene®, desarrollado por ADN Genotek® y que contienen un tampón de lisis de ADN. La base **51** tiene salientes afilados que rompen el cierre hermético de la cámara en la tapa cuando la tapa se atornilla sobre la base, liberando de esta forma la solución. La retirada de la tapa para el análisis permite por tanto el acceso no solo al contenido del filtro sino también a la solución contenida en la que se almacena el contenido del filtro. El cartucho de filtro **17** y la unidad de almacenamiento **49** forman un cierre estanco alrededor del filtro, el contenido del filtro y cualquier líquido circundante que pueda estar presente.

La **Figura 4** muestra una unidad de almacenamiento alternativa de acuerdo con la presente invención, y el montaje de la misma. La unidad de almacenamiento **490** comprende una carcasa **510** que tiene un rebaje **530** adecuado para recibir el cartucho de filtro y una primera abertura **550** para permitir el acceso al contenido del filtro cuando se inserta un cartucho de filtro. La tapa **570** encaja con la carcasa mediante una cooperación deslizante entre salientes sobre la carcasa y rebajes complementarios en la tapa, y queda retenida en su lugar mediante un estribo colocado contra una placa de detención y mediante una abrazadera de sujeción. La unidad de almacenamiento tiene una parte inferior **571** que se acopla con la carcasa de una manera análoga a la de la tapa. Un pistón **600** queda retenido dentro del rebaje en un punto más allá de la primera abertura y define una cámara **602** el extremo del rebaje distal desde la abertura del rebaje. La carcasa tiene una segunda abertura **603** en esta cámara. La cámara **602** es adecuada para recibir un

fluido, por ejemplo, y no a modo de limitación, un tampón para la lisis de células y la preservación de los ácidos nucleicos y/o las proteínas, un fijador/conservante para preparar células con la retención de la morfología característica (para el examen citológico), un medio de cultivo para sostener el crecimiento celular o un tampón isotónico adecuado para el almacenamiento del material biológico, o un tampón adecuado para la elución del material biológico procedente del filtro. En consecuencia, en algunas realizaciones, la unidad de almacenamiento está provista de un fluido adecuado de este tipo contenido en la cámara. Se apreciará que el fluido puede seleccionarse de acuerdo con la naturaleza de la muestra que se va a almacenar y el análisis posterior requerido.

El pistón **600** está retenido dentro del rebaje, pero la aplicación de presión, por ejemplo, mediante la inserción de un cartucho de filtro, puede empujar el pistón adicionalmente dentro del rebaje, reduciendo el tamaño de la cámara y forzando el fluido de su interior a pasar al resto del rebaje, y a entrar en contacto con el filtro y el contenido del filtro. El cartucho de filtro **17** y la unidad de almacenamiento **490** forman un cierre estanco alrededor del filtro, el contenido del filtro y cualquier líquido circundante que pueda estar presente. Se apreciará que será evidente para el experto en la técnica variar las dimensiones del cartucho de filtro y la unidad de almacenamiento y la provisión y la localización de juntas tóricas adecuadas para conseguir dicho cierre estanco.

Unidad y uso

Las unidades de la invención pueden proporcionarse directamente como un kit al usuario, quien puede entonces:

- proporcionar una muestra dentro de la cámara de recogida; montar el dispositivo como se describe en el presente documento;
- filtrar la muestra usando el dispositivo como se describe en el presente documento; retirar el cartucho; e
- insertar la porción del filtro en una unidad de almacenamiento como se describe en el presente documento para su transporte a un cuidador adecuado o a un centro médico o instalación de ensayo adecuados.

Es una ventaja que las unidades de acuerdo con la presente invención se puedan usar en el hogar, con las muestras almacenadas, opcionalmente en una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material capturado, y transportarse a un cuidador relevante o a un centro médico o instalación de ensayo adecuados. El uso de una unidad de almacenamiento de acuerdo con la presente invención permite que las muestras capturadas en filtros de acuerdo con los métodos de la presente invención se envíen higiénica y eficazmente usando, por ejemplo, servicios de correo nacionales regulares. Los pacientes considerados en riesgo de desarrollo de, por ejemplo, cánceres de vejiga, o aquellos pacientes en remisión del cáncer de vejiga actualmente han de someterse a menudo a investigaciones de cistoscopia regulares, que necesitan frecuentes visitas al hospital que pueden ser incómodas. Las investigaciones de cistoscopia son a menudo molestas y pueden conllevar un riesgo de complicaciones. También son caras para el proveedor de cuidados sanitarios. La provisión de un dispositivo o kit adecuado para obtener y procesar muestras en el hogar que puedan analizarse sin requerir la participación del paciente representan una mejora significativa para el bienestar del paciente.

En consecuencia, en algunas realizaciones de la presente invención, se proporciona un kit que comprende una cámara de recogida como se describe en el presente documento y una unidad de filtración como se describe en el presente documento, y, opcionalmente, instrucciones para usar la unidad en un método como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la unidad de filtración se proporciona completamente montada. A continuación se proporciona una muestra, por ejemplo, mediante micción normal, en la cámara de recogida. A continuación, la unidad de filtración se fija a la cámara de recogida. El usuario a continuación voltea el dispositivo montado de tal manera que la cámara de recogida queda ahora boca abajo en la parte superior del dispositivo, como se muestra en la **Figura 3**, y a continuación proporciona una presión manual para forzar el paso del líquido a través del filtro hacia el depósito de residuos. La provisión de una o más válvulas y/o de membranas de flujo de retorno permite igualar la presión en el dispositivo. Durante el flujo de fluido a través del filtro, el material biológico, por ejemplo las células, queda capturado sobre el filtro. La cantidad y el tipo del material capturado puede variarse mediante el uso de filtros de diferentes tipos (tales como, y no de forma excluyente, filtros de membrana o perlas) o con diferentes propiedades (tales como, y no de forma excluyente, variando el tamaño del poro o los revestimientos). Tras la filtración, el cartucho de filtro con el contenido del filtro se retira y se puede descartar el resto del dispositivo. En realizaciones en las que se retiene el cartucho de filtro en una ranura o rebaje, el usuario simplemente empuja el cartucho de filtro fuera del resto del dispositivo. Los kits de la invención pueden comprender además una unidad de almacenamiento como se describe en el presente documento. El usuario inserta a continuación el cartucho de filtro en la unidad de almacenamiento como se muestra en, por ejemplo, la **Figura 4** para un almacenamiento y transporte cómodos. En algunas realizaciones, la unidad de almacenamiento se proporciona como una tapa y una base (denotada **57** y **51**, respectivamente, en la **Figura 1**). En estas realizaciones, el cartucho de filtro se inserta en primer lugar en la base **51**. A continuación se añade la tapa **57**, produciendo el acoplamiento de la tapa con la base que se rompe el cierre hermético de la cámara que contiene la solución dentro de la tapa, liberando de esta forma la solución en contacto con el contenido del filtro.

En algunas realizaciones, se proporciona la unidad de almacenamiento como una unidad individual (denotada **490** en la **Figura 4**). Esta unidad de almacenamiento comprende un pistón retenido dentro del rebaje en un punto más allá de la primera abertura y define una cámara en el extremo del rebaje distal desde la abertura del rebaje. La base de la unidad de almacenamiento tiene una segunda abertura en esta cámara. La cámara contiene una solución, por ejemplo,

y no a modo de limitación, un tampón para la lisis de las células y la preservación de los ácidos nucleicos, un fijador/conservante para preparar células con la retención de la morfología característica (para el examen citológico), o un medio de cultivo para sustentar el crecimiento celular. La inserción del cartucho de filtro en el rebaje de la unidad de almacenamiento empuja el pistón adicionalmente dentro del rebaje, reduciendo el tamaño de la cámara y forzando el líquido de su interior alrededor del pistón y en contacto con el contenido del filtro donde puede retenerse durante el almacenamiento y el transporte.

El cartucho de filtro y la unidad de almacenamiento combinados pueden transportarse a continuación de forma cómoda e higiénica a una instalación de ensayo/análisis o un centro médico adecuado. El acceso al contenido del filtro está facilitado por la retirada de la tapa (denotada 57 o 570 en la Figura 1 o la Figura 4, respectivamente) para desvelar la abertura relevante en la carcasa de la unidad de almacenamiento. El contenido del filtro, por ejemplo, ADN, se puede analizar usando métodos conocidos en la técnica y métodos descritos en el presente documento, con la presencia o ausencia de determinados marcadores conocidos usados para proporcionar un diagnóstico.

Como alternativa, la unidad se puede proporcionar como un kit que comprende un depósito de residuos y una base de soporte del filtro que aún no se han unido. En estas realizaciones, el usuario debe en primer lugar montar la unidad de filtración. Se apreciará que los cartuchos del filtro y las unidades de almacenamiento, que comprenden opcionalmente una solución alojada en una cámara como se describe en el presente documento, se puede proporcionar por separado al resto de la unidad ya que esta se puede seleccionar específicamente con respecto a la aplicación prevista.

Filtros adecuados

La presente invención se basa en la percepción de los inventores de que los dispositivos que comprenden determinados filtros adecuados pueden utilizarse para capturar material procedente de fluidos biológicos para un análisis eficaz, para su uso en el diagnóstico y la vigilancia de las dolencias y enfermedades relevantes.

En algunas realizaciones, las unidades y métodos de la presente invención se pueden usar para capturar células procedentes de fluidos biológicos. Los estudios previos han mostrado que es posible capturar y separar células procedentes de fluidos usando filtración mecánica (Wilding et al., 1998; Mohamed et al., 2004; Zheng et al., 2007; Lin et al., 2010). Sin embargo, ninguno de estos métodos proporciona la comodidad y eficacia asociadas con las unidades y métodos de la presente invención, es decir, la provisión de una unidad para la recogida barata y fácil y el procesamiento de una muestra que pueda usar el paciente u otro cuidador para proporcionar una muestra de células capturadas adecuada para almacenar y enviar por correo a una instalación de ensayo o un centro médico adecuados.

Cualquier material del filtro que tenga el carácter necesario para capturar material de interés puede utilizarse en las unidades y métodos de la presente invención. Se apreciará que las unidades y métodos de la presente invención se pueden usar para la captura de los diferentes tipos de material biológico de diversos fluidos biológicos, para la detección, diagnóstico y vigilancia de varias enfermedades y dolencias. En consecuencia, se apreciará que se puede seleccionar el filtro entre los medios de filtro conocidos en la técnica por tener determinadas características deseables, y en algunos casos, puede ser deseable proporcionar múltiples filtros en serie. Cuando se usan múltiples filtros, cada filtro puede ser idéntico, o tener características diferentes de cualquier otro filtro de la unidad.

Por ejemplo, se puede conseguir la captura de células de diferentes tamaños y diferentes tipos mediante el uso de un filtro, o el uso de múltiples filtros, configurado para excluir determinados tamaños o formas de células, más probablemente mediante la selección del tamaño de poro del filtro y/o la disposición de los poros. En algunas realizaciones, puede ser deseable proporcionar dos o más filtros en serie, en donde un primer filtro captura células grandes (por ejemplo, humanas) y un segundo filtro con poros más pequeños captura células más pequeñas (por ejemplo, células bacterianas). Se puede conseguir la exclusión por tamaño mediante el uso de un poro concreto u otro tamaño de apertura, o mediante el uso de una forma de poro concreta.

Se pueden usar también filtros que se fabrican de materiales, o que tienen revestimientos, diseñados específicamente para capturar determinados materiales, por ejemplo, macromoléculas tales como proteínas, ADN, ARN y metabolitos.

Los siguientes ejemplos de las características del filtro que pueden ser adecuadas para el uso en algunas realizaciones de la presente invención se proporcionan a modo de ilustración y no se pretende que limiten la invención a cualquier tipo de filtro concreto. Estos y otros filtros adecuados son conocidos en la técnica, y puede estar comercialmente disponible.

Para capturar células bacterianas, puede preferirse un tamaño de poro de aproximadamente 0,5 μm a 4 μm . Para capturar partículas víricas, virus o bacteriófagos, se puede usar un tamaño de poro de aproximadamente 20 nm a 300 nm, más preferentemente de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 50 nm. Para capturar componentes de la sangre sin plaquetas, puede preferirse un tamaño de poro de aproximadamente 4 μm a 10 μm . Para capturar componentes de la sangre sin glóbulos rojos, puede preferirse un tamaño de poro de aproximadamente 7 μm a 12 μm . Para capturar células tumorales, puede preferirse un tamaño de poro de aproximadamente 8 μm a 20 μm , siendo

especialmente preferido con aproximadamente 8 μm a 12 μm , lo más preferido aproximadamente 8 μm . Para la captura de macromoléculas, se pueden usar filtros de membrana de ultrafiltración con un límite de corte molecular específico (por ejemplo, pero no de forma excluyente, 50 kDa) seleccionado para capturar las macromoléculas de interés. Alternativamente un agente de captura, tal como un anticuerpo específico de una proteína de interés o un ácido nucleico con una secuencia que sea complementaria a la de interés, puede adherirse al medio del filtro (por ejemplo, pero no de forma excluyente, filtros de membrana, tales como los fabricados de nailon, difluoruro de polivinilideno o nitrocelulosa, o medio cromatográfico tal como sefarosa o perlas magnéticas) que permiten capturar la macromolécula de interés durante la filtración. El filtro puede fabricarse de un material polimérico adecuado tal como policarbonato, nailon, o parileno, o un material no polimérico adecuado tal como silicona, según sea adecuado.

Para algunas aplicaciones, se pueden preferir filtros de membrana, por ejemplo, en la captura de células de, por ejemplo, orina. El filtro de membrana puede ser una membrana de policarbonato, preferentemente una membrana hidrófila de policarbonato, por ejemplo, una membrana hidrófila de policarbonato de huella grabada. El filtro puede tener un tamaño de poro de aproximadamente 5-10 μm , preferentemente aproximadamente 8 μm . Los filtros de membrana preferidos pueden incluir filtros de micromembrana tales como filtros de policarbonato comercialmente disponibles, por ejemplo, filtros hidrófilos de policarbonato de huella grabada Whatman Nuclepore, (diámetro 25 mm, tamaño de poro 8 μm).

Soluciones adecuadas

En algunas realizaciones, la unidad de almacenamiento contiene una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material biológico. La solución puede ser, por ejemplo, un tampón adecuado para inducir la lisis celular para permitir el análisis de los ácidos nucleicos o las proteínas liberados por la célula, un fijador/conservante para preparar células con la retención de la morfología característica, un medio de cultivo para sostener el crecimiento celular, un tampón isotónico adecuado para almacenamiento de material biológico, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato, o un tampón adecuado para la elución del material biológico del filtro. Se apreciará que la solución se seleccione preferentemente para que corresponda con el material biológico a capturar y el del análisis a realizar.

En algunas realizaciones, las unidades de la invención se podrían usar para la recogida de células exfoliadas de tumores procedentes de la orina con el fin de analizar las alteraciones de su ADN. Por ejemplo, esto puede ser mediante el uso de un filtro de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μm para capturar las células tumorales, y después insertar el cartucho de filtro en la unidad de almacenamiento y, opcionalmente, liberar una solución de lisis celular y conservación de ácido nucleico, tales como las comercialmente disponibles de Qiagen o DNA Genotek [por ejemplo, como se describe en el documento WO2003104251 A9] sobre el contenido del filtro.

Si el objetivo es analizar el nivel de una proteína en particular dentro de las células tumorales, la solución liberada sobre el contenido del filtro puede, por ejemplo, ser una solución de lisis celular y conservación de proteínas tal como un tampón RIPA (comercialmente disponible de Millipore) o un tampón de extracción de células (comercialmente disponible de Invitrogen).

Si el objetivo es analizar las células mediante citología, la solución liberada sobre el contenido del filtro puede, por ejemplo, ser un tampón conservante, por ejemplo, uno comercialmente disponible de Hologic (PreservCyt Solution, que contiene metanol) o un medio de cultivo celular, por ejemplo, DMEM suplementado con FBS al 10 %, L-glutamina al 1%, 100 U/ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomina.

En algunas realizaciones y métodos, las unidades de la invención se pueden usar para la recogida de una proteína concreta exenta de células de la orina, por ejemplo, usando un filtro compuesto de perlas de sefarosa revestidas de Proteína A/G a las que se ha unido un anticuerpo que se une a la proteína de interés, introduciéndose posteriormente el cartucho de filtro en la unidad de almacenamiento y, opcionalmente, un tampón isotónico tal como solución salina tamponada con fosfato que se libera sobre el contenido del filtro.

Usos de la presente invención en la detección, diagnóstico y vigilancia médicos

Las unidades y los métodos para la recogida de materiales biológicos a partir de fluidos biológicos, y el posterior almacenamiento y procesamiento opcional de dicho material biológico, como se describe en el presente documento, son de especial relevancia para la detección, diagnóstico y vigilancia de enfermedades y dolencias.

Aunque las realizaciones preferidas están dirigidas a la recogida de células de muestras de orina para la detección de cánceres genitourinarios, en particular, cáncer de vejiga, se apreciará que, mediante la selección del filtro adecuado, tamaño del dispositivo y, si está presente, fluido contenido dentro de una cámara de la unidad de almacenamiento, las unidades y los métodos que se describen en el presente documento pueden ser útiles en la detección, diagnóstico y vigilancia de varias enfermedades y dolencias. Por ejemplo, la detección de la hipermetilación de genes tales como *GSTP1*, *VHL*, *APC RASSF1A*, *Timp-3* en células tumorales procedentes de sedimentos de orina que se encuentran en cánceres renales y de la próstata (Cairns et al Nature Reviews Cancer 2007; 7:531-543). También la detección de cambios en el ADN mitocondrial puede ser de utilidad en la detección temprana de cánceres, vigilancia de la progresión

- de la enfermedad y respuesta a la terapia, y las células tumorales exfoliadas presentes en el fluido corporal sería una fuente de ADN mitocondrial (Gabriel Dakubo Chapter 11 Mitochondrial DNA measurement in Exfoliated Cells for Cancer Detection and Monitoring: The copy Number Advantage in Mitochondrial Genetics and Cancer 2010 pp 259-274 ISBN: 978-3-642-11415-1 (Impresión) 978-3-642-11416-8 (En línea)). La detección de niveles elevados de MCM5 en sedimentos de orina se puede usar para predecir el cáncer de vejiga (Stober et al J Natl Cancer Inst 2002; 94:1071-9). Además, los aislados de ARN procedentes de sedimentos de orina se han analizado para diagnosticar el rechazo agudo en trasplantes de riñón, lo que supone un potencial para la sustitución de las biopsias renales (Suthanthiran et al N. Engl. J. Med. 2013; 369:20-31).
- Las unidades y los métodos de la invención se pueden usar para capturar macromoléculas libres (por ejemplo, proteínas, ADN, ARN o metabolitos) en la orina u otros fluidos. Por ejemplo, se ha comprobado que las pacientes con cáncer de ovario tienen niveles alterados de la neurotoxina derivada de eosinófilos glicosilados, fragmentos de osteopontina con extremo COOH y el fragmento del núcleo de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana, SMRP y Bcl-2 en su orina (Das and Bast Biomark Med. 2008; 2(3): 291-303). La detección de las proteínas S100A6 y S100A9 en la orina puede ser de utilidad en la detección de cánceres en el tracto GI superior (Husi et al Proteomics Clin Appl. 2011; 5(5-6):289-99), mientras que la detección de las proteínas SAA4 y ProEGF en la orina puede ser de utilidad en la detección del cáncer de vejiga (Chen et al Journal of Proteomics 2013, 85: 28-43).
- Las unidades y métodos descritos en el presente documento pueden también utilizarse para la recogida y filtración de otros fluidos biológicos, tales como saliva, esputo y sangre, y de fluidos corporales obtenidos usando métodos más invasivos tales como, por ejemplo, derrames pleurales, fluido de lavado (por ejemplo, ductal, broncoalveolar) y suero para el análisis del material capturado incluido mediante la detección de alteraciones genómicas asociadas con algunas enfermedades y trastornos incluyendo cánceres tales como cáncer de pulmón y de mama (Belinsky et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 11891-11896, 1998; Ahrendt et al J. Natl. Cancer Inst., 91: 332-339, 1999; Evron et al Lancet, 357:1335-1336, 2001).
- La filtración y la concentración de la sangre también se pueden usar en el aislamiento y análisis de células tumorales en circulación (CTC). El aislamiento y la caracterización de las CTC es un desafío técnico ya que estas constituyen solamente una pequeña fracción de las células totales presentes en la sangre. Sin embargo, puesto que las CTC reflejan los rasgos moleculares de las células contenidas en la masa tumoral, ofrecen una forma potencial de diagnosticar o vigilar la progresión/respuesta de un paciente de una forma relativamente no invasiva. Las CTC se han identificado en cánceres tales como pacientes con cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario y colon, para los que se ha comprobado que proporcionar información predictiva y de pronóstico. Las CTC se han identificado también en pacientes pancreáticos, aunque no se ha iniciado ningún estudio fundamental usando las CTC que guíen el tratamiento clínico (Cen et al Biochimica et Biophysica Acta 2012; 1826:350-356). Se ha comprobado que la captura de células tumorales en circulación a partir de la sangre de pacientes con cáncer de próstata, colorrectal y de mama es posible mediante el uso de un método de filtración para aprovechar el mayor tamaño de las células tumorales en comparación con las células normales. Mediante la selección adecuada del filtro, las unidades y los métodos descritos en el presente documento pueden también aplicarse a la captura y el análisis del ADN exento de células en circulación DNA (cf-ADN).
- En consecuencia, los métodos descritos en el presente documento pueden implicar la etapa de analizar marcadores conocidos por estar asociados con una enfermedad o dolencia en particular. Dichos marcadores pueden ser marcadores genéticos, alteraciones genómicas, la presencia de o niveles elevados/disminuidos de proteínas (por ejemplo, anticuerpos), la presencia de o niveles elevados/disminuidos de bacterias o levaduras, tanto como se describe en el presente documento y se documenta en la técnica.
- En algunos métodos descritos en el presente documento, el marcador puede ser un marcador conocido por estar asociado con el cáncer. El cáncer puede ser un cáncer urinario o ginecológico, por ejemplo, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de uretra, cáncer ureteral, cáncer urotelial, cáncer uracal, cáncer endometrial o cáncer de ovario. El cáncer puede ser un cáncer asociado con otros órganos, por ejemplo, cáncer de hígado, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas o un cáncer del tracto GI superior. El cáncer puede ser un cáncer metastásico. Los marcadores asociados con estos y otros cánceres son conocidos en la técnica. En algunas realizaciones preferidas, el marcador está asociado con un cáncer genitourinario, preferentemente, cáncer de vejiga, próstata o renal. En algunas realizaciones preferidas, el marcador está asociado con el cáncer de vejiga, más preferentemente un cáncer de vejiga sin invasión del músculo.
- En algunas realizaciones, el marcador está asociado con una dolencia distinta al cáncer. Por ejemplo, el marcador puede estar asociado con el rechazo agudo en trasplantes de riñón, lo que tiene la ventaja de eliminar potencialmente la necesidad de biopsias renales invasivas, o marcadores asociados con infecciones bacterianas y/o de levaduras, por ejemplo, infecciones del tracto urinario tales como cistitis y pielonefritis.
- También se apreciará que, en determinados métodos de la invención, el marcador puede no estar en sí mismo asociado con una enfermedad o dolencia, sino que en su lugar, puede ser un marcador genético asociado con un individuo o parentesco en particular, por ejemplo, para su uso en análisis forense y de paternidad.

Análisis de muestras

Se apreciará que el método utilizado para analizar el contenido del filtro y, si está presente, la solución en la que se ha almacenado el contenido del filtro, dependerá de la naturaleza del material biológico y del fin del análisis. Los métodos para procesar el material y/o la solución y para detectar marcadores de interés se describen en el presente documento y se conocen en la técnica.

Las unidades y los métodos descritos en el presente documento se pueden usar junto con los kits UCyt+® y Urovysion®. Un problema de estos sistemas es el transporte de la orina, así como el bajo número de células y la baja fracción de células tumorales contenidas en dichas muestras. La correcta conservación, el aislamiento celular y el aumento en la fracción de células tumorales que proporcionan las unidades y métodos descritos en el presente documento pueden mejorar el uso. En un estudio reciente que compara el análisis FISH (UroVysion) con la citología y la cistoscopia como método de seguimiento, Galvan et al (Cancer Cytopathol 2011; 119:395-403) se observó que aproximadamente un 10 % de las muestras no se podían analizar debido a un contenido demasiado bajo de células uroteliales en la muestra o por otras razones técnicas. La filtración en filtros comerciales de huella grabada se ha utilizado anteriormente junto con el análisis FISH y se mejoró la sensibilidad de la detección en el estudio en comparación con otros estudios realizados con métodos de preparación convencionales (Meiers et al, Arch Pathol Lab Med 2007; 131:1574-1577). Meiers et al usaron un filtro con un tamaño de poro de 8 µm y descubrieron que tenía un excelente rendimiento para la recogida de células epiteliales. Los autores sugieren que el aumento de sensibilidad se debe en parte a la preparación de células en monocapa creada por la filtración. Sin embargo, los presentes inventores creen que esto se puede atribuir, al menos en parte, al efecto de la mayor fracción de células tumorales en la muestra. Meiers et al observaron una tasa de adecuación del 95 % con el método de filtración en comparación con un 85 % por métodos convencionales, mostrando que la solidez del análisis FISH también se ve mejorada por la filtración y, por tanto, se puede mejorar por el uso de las unidades y los métodos proporcionados en el presente documento.

Ventajas concretas de la presente invención

Una aplicación clave de la invención es el diagnóstico y la vigilancia del cáncer de vejiga. La presente invención se desarrolló para proporcionar un medio sencillo para capturar células de tumores de vejiga a partir de la orina y almacenar/conservar el ADN de dichas células para su análisis posterior. Las ventajas importantes incluyen:

- 1) El coste de la unidad es bajo;
- 2) La unidad es fácil de usar, convirtiéndola en adecuada para el uso doméstico;
- 3) Procesamiento inmediata del material biológico tras la filtración mediante el uso de una unidad de almacenamiento que contiene una solución adecuada para conservar y/o tratar la muestra antes de su análisis;
- 4) La fracción de células tumorales se puede aumentar mediante la filtración basada en tamaños, que aumenta la sensibilidad de detección;
- 5) El contenido del filtro (por ejemplo, las células capturadas) se puede enviar por correo normal a un centro médico o instalación de ensayo adecuada, reduciendo la necesidad de contacto con el sistema sanitario;
- 6) La toma de muestras frecuente y repetida no tiene problemas; y
- 7) En comparación con la cistoscopia, el uso del dispositivo para el diagnóstico y la vigilancia del cáncer de vejiga mejorará la calidad de vida de los pacientes y disminuirá de forma muy importante el gasto sanitario.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se definen de forma que proporcionan a los expertos en la materia una divulgación y descripción completa de cómo llevar a la práctica la invención, y no se pretende que limiten el alcance de la invención.

Captura de células sobre filtros de micromembrana

Lo siguiente demuestra la utilidad de los filtros de membrana para capturar células procedentes de la orina para su análisis.

Recogida de muestras

Muestras de orina miccionada por la mañana se recogieron de pacientes con cáncer de vejiga ingresados para una cistoscopia y reseco transuretral (TURBT) en el Herlev Hospital, Dinamarca, así como de voluntarios sanos sin neoplasias malignas urológicas conocidas. Las muestras se enviaron al Danish Cancer Research Center donde se procesaron en las 4-6 horas posteriores a la recogida.

Procesamiento de muestras de orina

Para todos los pacientes y controles, 50 ml de cada muestra de orina se sedimentaron por centrifugación, 2.000 x g durante 10 min, el aglomerado se lavó con PBS seguido por otros 10 min de centrifugación. El sobrenadante se descartó, y el aglomerado se volvió a suspender en aproximadamente 200 µl de PBS. En paralelo, orina de la misma muestra se aspiró al interior de una jeringa desechable y se hizo pasar mediante fuerza positiva a través de un filtro

de membrana montado en un portafiltras. Se usaron filtros hidrófilos de policarbonato de huella grabada Whatman Nuclepore, (diámetro 25 mm, tamaño de poro 8 µm) y los correspondientes portafiltras. La muestra se hizo pasar por el filtro hasta saturación, con un máximo de 125 ml. El filtro se enjuagó con PBS antes de su retirada del portafiltras. Tanto el sedimento de orina como el filtro se almacenaron a -80 °C hasta procesamiento posterior.

5 Para analizar la funcionalidad de la unidad de almacenamiento, el cartucho de filtro se transfirió al casete de almacenamiento, que a continuación se montó con la tapa de un kit de autorrecogida Oragene DNA (formiato de disco OG-250, DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canadá).

10 *Aislamiento del ADN y conversión con bisulfito*

El ADN se aisló del sedimento de la orina y se filtró con el QiaAmp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania). Las muestras del filtro y los sedimentos de la orina se incubaron con tampón ATL y proteinasa K a 56 °C durante al menos 1 hora (filtro) o durante la noche (sedimentos). El procesamiento posterior se realizó según las instrucciones del fabricante. El ADN de los filtros y sedimentos se eluyó en 50 µl y 100 µl de tampón AE, respectivamente, y se almacenó a -80 °C. La concentración de ADN se midió usando un espectrómetro NanoDrop 1000. Las muestras de 16 pacientes y 9 controles sanos no contenían suficiente ADN para el análisis y se descartaron.

20 Se realizó la conversión con bisulfito usando el EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El ADN tratado con bisulfito se eluyó en 20 µl de tampón de elución M y se almacenó a -80 °C. Para muestras emparejadas (muestra de filtro y sedimento), se usó la misma cantidad de ADN, con un máximo de 500 ng. Cuando la concentración de ADN era demasiado baja para determinarse con precisión mediante el espectrómetro NanoDrop, el volumen máximo de la muestra (20 µl) se usó para el tratamiento con bisulfito. El análisis semicuantitativo de las islas del promotor CpG de *BCL2*, *CCNA1*, *EOMES*, *HOXA9*, *POU4F2*, *SALL3* y *VIM2* se realizó 25 usando ensayos PCR en tiempo real tipo TaqMan (MethyLight), usando cebadores, sondas y condiciones anteriormente descritos [12]. Las reacciones se realizaron en la plataforma LightCycler 480 usando el LightCycler 480 Probes Master Kit (Roche, Mannheim, Alemania) y 1 µl de ADN tratado con bisulfito por reacción. ADN metilado *in vitro* (IVM; CpGenome™ Universal Methylated DNA, Chemicon/Millipore, Billerica, MA) y ADN amplificado de genoma completo sirvieron como controles negativos y positivos de la metilación, respectivamente. Los niveles de metilación 30 se calcularon como porcentaje de la referencia metilada (PMR; Ref. [Weisenberger DJ, Campan M, Long TI, Kim M, Woods C et al. (2005). *Nucleic Acids Res* 33: 6823-6836]) normalizando los valores de reacción específica de marcadores a los valores de *ALUC4* relativos a los mismos valores para el control totalmente metilado (IVM). Se excluyeron las muestras con una concentración menor al equivalente de 0,25 ng/µl de ADN no tratado con bisulfito. Los valores PMR de corte para *HOXA9*, *POU4F2*, *SALL3* y *VIM2* fueron 3, 2, 0,5 y 2, respectivamente. *BCL2*, *CCNA1* 35 y *EOMES* no mostraron metilación de fondo en el ADN aislado del filtro de orina y las muestras de sedimento de los controles sanos.

Reacción en cadena de la polimerasa específica de metilación cuantitativa en tiempo real (MethyLight)

40 El análisis de metilación se realizó utilizando MethyLight, un ensayo cuantitativo de la PCR en tiempo real basado en fluorescencia (Eads et al., 2000, *Nucleic Acids Res.* 28, E32). Los cebadores y las sondas se diseñaron para 7 genes de las islas CpG del promotor y para *ALUC4*, que se usó como control de la cantidad de ADN de entrada (Weisenberger et al., 2005, *Nucleic Acids Res.* 33, 6823-6836). El ADN metilado *in vitro* convertido con bisulfito (IVM; CpGenome™ Universal Methylated DNA, Chemicon) se analizó para normalizar los posibles sesgos de amplificación entre un gen 45 diana y *ALUC4*. Las reacciones se realizaron en el sistema PCR en tiempo real Roche LightCycler® 480 usando el Lightcycler® 480 Probes Master Kit (Roche).

Cultivo celular y modelo del sistema

50 La línea celular de carcinoma de células transicionales de uréter humano 639V se adquirió de DSMZ (Braunschweig, Alemania). Las células se mantuvieron en medio DMEM suplementado con suero de feto de bovino al 10 % a 37 °C en una incubadora humidificada con CO₂ al 5 %. Los linfocitos de un donante sano se prepararon a partir de sangre periférica de acuerdo con un protocolo anteriormente descrito [Thurner B, Roder C, Dieckmann D, Heuer M, Kruse M et al. (1999) *J Immunol Methods* 223: 1-15] y se almacenaron a -80 °C hasta su uso. Las células en suspensión se 55 contaron, y su diámetro se midió usando un equipo Countess Automated Cell Counter (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Los linfocitos y las células 639V se mezclaron en diferentes relaciones en 100 ml de PBS y se procesaron usando el dispositivo de filtración.

Análisis de mutaciones

60 La detección y cuantificación de las mutaciones de *FGFR3* (R248C, S249C, G370C y Y373C) y las correspondientes secuencias naturales se realizó mediante PCR de gotícula digital PCR (ddPCR), usando el sistema QX200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y análisis basado en hidrólisis de la sonda (PrimePCR ddPCR Mutation Detection Assays; Bio-Rad). La mezcla de la PCR contenía 11 µl de supermezcla de gotículas ddPCR para sondas (sin dUTP), 1,1 µl de 65 mezcla de cebador/sonda de mutación (FAM), 1,1 µl de mezcla de cebador/sonda natural (HEX) y 2 µl de ADN en un volumen final de 22 µl. Veinte microlitros de esta mezcla y 70 µl del aceite generador de gotículas se transfirieron a

diferentes pocillos de un cartucho de generación de gotículas. Tras la formación de gotículas usando el generador de gotículas, las muestras se transfirieron a una placa de 96 pocillos para PCR y se sometieron a amplificación durante 40 ciclos a 94 °C durante 30 s y a 55 °C durante 60 s. Las gotículas (en promedio ~16.000 por reacción) se analizaron en el lector de gotículas, y se usó el programa informático Quantasoft (versión 1.4.0.99) para analizar las concentraciones de ADN. Las configuraciones de corte se determinaron usando muestras de ADN de control positivo y negativo para las mutaciones.

Los inventores utilizaron en primer lugar células cultivadas para analizar 1) si era posible capturar las células en un filtro de micromembrana comercial, y 2) si se podrían enriquecer las células tumorales de vejiga poco abundantes. Linfocitos humanos cultivados purificados diluidos en PBS se enriquecieron con células de cáncer de vejiga al 0,5 % (línea de células T24 humanas). La mitad del volumen de la mezcla de células se sedimentó por centrifugación, y la mitad restante se hizo pasar por un filtro. El flujo pistón del filtro también se recogió y se sedimentó por centrifugación. Se aisló el ADN de las muestras no filtradas, filtradas y del flujo pistón y se analizaron para determinar la mutación G12V de *HRAS* que anteriormente se había establecido que estaba presente en la línea de células T24. Se usó la PCR junto con la electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) para resolver el *HRAS* mutante y natural. Como se muestra en la **Figura 5**, la muestra filtrada era evidentemente positiva para la mutación G12V de *HRAS*, mientras que las muestras no filtradas y de flujo pistón fueron negativas (DGGE tiene un nivel de detección en aproximadamente 2-3 % alelos mutados en un fondo natural). Estos resultados muestran que las células tumorales quedan retenidas en el filtro pero también indican que la fracción de las células tumorales aumenta en el filtro en comparación con la muestra no filtrada.

Las mismas muestras de ADN también se analizaron para determinar los niveles de metilación del ADN en la región promotora de *BCL2*, que está totalmente metilada en las células T24 y no metilada en los linfocitos normales. Como se muestra en la **Figura 6**, las muestras no filtradas y de flujo pistón mostraron un nivel de metilación promedio de 3-4 %, similar al nivel en linfocitos normales. En contraste, la muestra de filtro muestra un nivel de metilación promedio de 13 %. Este análisis confirmó que la fracción de células tumorales está aumentada en el filtro.

A continuación, las muestras de orina procedentes de 204 pacientes de tumor de vejiga y 29 controles sanos se examinaron en un diseño de división de muestra: Para todos los pacientes y controles, las muestras de orina se sometieron en paralelo a sedimentación (50 ml) y filtración (hasta saturación del filtro o máx. 125 ml). El ADN se aisló, se trató con bisulfito de sodio, y se analizó según 7 marcadores de metilación (*CCNA1*, *BCL2*, *EOMES*, *POU4F2*, *SALL3*, *HOXA9* y *VIM2*) usando ensayos MethyLight en tiempo real. Todos estos marcadores se han notificado en la bibliografía por estar hipermetilados de forma anómala en cáncer de vejiga. Se estableció un valor de corte para la metilación de fondo mediante el análisis de las muestras de 10 de los controles sanos. La **Figura 7** proporciona un ejemplo de un análisis en paralelo de componentes filtrados y sedimentados de la misma muestra de orina de un paciente de tumor de vejiga.

En su conjunto, la sensibilidad fue de un 81 % cuando los sedimentos de orina de los 204 pacientes de tumor de vejiga se analizaron según los siete marcadores de la metilación del ADN, mientras que fue del 87 % para las correspondientes muestras del filtro (Tabla 1). Cabe observar que, para los tumores Ta de bajo grado que son difíciles de detectar sobre la base del análisis de orina, la sensibilidad aumentó desde un 75 % en sedimentos al 84 % en muestras del filtro.

Tabla 1. Sensibilidad de siete marcadores de la metilación del ADN en muestras de orina filtradas y sedimentadas procedentes de pacientes con tumor de vejiga (N=204).

Patología	Sedimentación	Filtro
Ta/displasia de bajo grado	74/98 (75 %)	82/98 (84 %)
Ta de alto grado	24/31 (77 %)	25/31 (81 %)
T1	27/30 (90 %)	28/30 (93 %)
>T2	17/19 (89 %)	18/19 (95 %)
CIS	24/26 (92 %)	25/26 (96 %)
Total	166/204 (81 %)	178/204 (87 %)

En la mayoría de las muestras analizadas, la fracción de ADN tumoral fue mayor en el filtro que en el sedimento correspondiente. Algunos de estos resultado se confirmaron mediante pirosecuenciación (**Figura 8**).

La mayoría de los 26 tumores que fueron negativos para los siete marcadores fueron NMIBC, incluido un carcinoma in situ (CIS), 22 tumores Ta y dos tumores T1. Entre los 19 controles, tres fueron positivos (dos tanto en el filtro como en el sedimento; uno solo en el filtro). Uno de estos se había clasificado erróneamente y tenía tumor de vejiga. El segundo tenía problemas anteriores en la vejiga, y la cistoscopia posterior confirmó la presencia de una lesión hiperplásica. El tercero dio un resultado negativo en la cistoscopia.

En conclusión, los presentes inventores han comprobado que mediante el uso de los filtros de micromembrana (por ejemplo, filtros de membrana de policarbonato), es posible capturar células de las muestras de orina y aislar el ADN para un análisis de metilación posterior. En consecuencia, en algunas realizaciones, la presente invención se refiere

a un método para hacer pasar una muestra de fluido biológico, tal como una muestra orina, a través de un filtro de micromembrana. En general, la fracción de ADN tumoral fue mayor en el filtro que en el sedimento correspondiente. Para el 87 % de los pacientes de tumor de vejiga, la muestra del filtro fue positiva para los marcadores de la metilación del ADN específicos del tumor. Los correspondientes sedimentos de orina fueron positivos en el 81 % de los casos.

5

Captura de células usando un dispositivo de acuerdo con la presente invención y posterior análisis

Como se ha descrito anteriormente, los inventores han comprobado que las células de las muestras de orina se pueden capturar sobre filtros de micromembrana usando una jeringa y un portafiltros comercial. El siguiente ejemplo no limitativo detalla el uso de un dispositivo de recogida y filtración que comprende dicha membrana de acuerdo con la presente invención. En la **Figura 1** se muestra un dibujo técnico del dispositivo de recogida y filtración (anteriormente descrito).

10

Muestras de orina de la mañana se recogieron de 30 pacientes ingresados para cistoscopia de vejiga en el Herlev Hospital. Las muestras se procesaron en un plazo de 3-6 horas en el Danish Cancer Research Center. El volumen de muestra estuvo comprendido entre 150 y 400 ml, de promedio 240 ml (**Tabla 2**). Los dispositivos de filtración se montaron en un filtro de policarbonato con un tamaño de poro de 8 µm de huella grabada (Whatman). Tras la filtración, los filtros se extrajeron del dispositivo de filtración y se almacenaron a -80 °C hasta procesamiento posterior.

15

El ADN se aisló de los filtros como se ha descrito anteriormente. El ADN se eluyó en 50 µl de tampón AE y se almacenó a -80 °C. La conversión del ADN con bisulfito se realizó como se ha descrito anteriormente. La concentración del ADN se determinó mediante análisis cuantitativo por PCR de *GAPDH*. El estado de metilación de siete marcadores de metilación (*CCNA1*, *BCL2*, *EOMES*, *POU4F2*, *SALL3*, *HOXA9* y *VIM2*) se determinó usando ensayos MethyLight, como se ha descrito anteriormente. El rendimiento de DNA promedio para las 30 muestras de orina fue 242 ng (intervalo de 6 a 1.000 ng; **Tabla 2**).

25

Tabla 2. Rendimiento de ADN procedente de 30 muestras de orina, procesadas usando el dispositivo de filtración de orina. La concentración del ADN se determinó mediante qPCR (*cifra estimada, medida fuera de rango).

ID Paciente	Patología	Volumen procesado (ml)	Rendimiento de ADN (ng)
1	T2, alto grado	250	661
2	Ta, bajo grado	150	16*
3	Inflamación	300	1060
4	Ta, bajo grado	250	321
5	Vejiga normal	450	121
6	Vejiga normal	300	10,1*
7	Metaplasia glandular/normal	300	331
8	Ta, bajo grado	250	388
9	Ta, bajo grado	200	202
10	Ta, bajo grado	150	160
11	Ta, bajo grado	350	23
12	Ta, alto grado	250	6,3*
13	Vejiga normal	150	397
14	Vejiga normal	450	26,4
15	Inflamación	300	700
16	Ta, alto grado	350	72
17	Ta, alto grado	300	520
18	Ta, bajo grado	150	517
19	Ta, bajo grado	150	8,7*
20	Ta, alto grado	150	59
21	Tis	150	45,2
22	Ta, bajo grado	450	145
23	N.A.	150	181
24	Ta, alto grado	150	303
25	T1 y Tis	200	12,9*
26	T2, alto grado	150	40,4
27	Ta, bajo grado	250	79
28	Ta, bajo grado	150	19,5*
29	Vejiga normal	150	283
30	Inflamación	300	549
Promedio		240	242

De los 30 casos incluidos en este análisis, 20 fueron diagnosticados con un tumor de vejiga después de la cistoscopia (Tabla 2). Para dos de estos casos tumorales, el rendimiento de ADN fue demasiado bajo para el análisis de metilación. Las 18 muestras restantes se analizaron según los siete marcadores de la metilación asociados con cáncer de vejiga (Tabla 3). Dieciséis de estas muestras fueron positivas para uno o más marcadores, lo que corresponde a una sensibilidad de diagnóstico del 89 %.

Esta cifra es muy reconfortante ya que la mayoría de los pacientes de esta cohorte presentaban pequeños tumores no invasivos, que eran evidentemente difíciles de detectar en orina.

ID Paciente	BCL2	CCNA1	EOMES	HOXA9	POU4F2	SALL3	VIM2	Marcadores positivos	Puntuación
1	+	+	+	+	-	+	+	6/7	Positivo
2	-	-	-	+	-	-	+	2/7	Positivo
4	-	-	-	-	-	-	-	0/7	Negativo
8	+	+	-	-	+	+	+	5/7	Positivo
9	-	+	+	+	-	-	-	3/7	Positivo
10	+	-	+	+	+	+	+	6/7	Positivo
11	-	-	-	-	-	-	+	1/7	Positivo
12	+	+	+	+	+	+	+	7/7	Positivo
16	-	+	-	-	-	-	-	1/7	Positivo
17	-	+	-	+	-	-	+	3/7	Positivo
18	-	-	-	-	-	-	-	0/7	Negativo
20	+	+	-	+	-	+	+	5/7	Positivo
21	+	+	-	+	+	+	+	6/7	Positivo
22	-	+	-	+	-	-	-	2/7	Positivo
24	+	+	+	-	-	+	+	5/7	Positivo
25	+	+	-	+	+	+	+	6/7	Positivo
26	+	+	-	+	+	+	+	6/7	Positivo
27	+	-	-	+	-	-	+	3/7	Positivo
Total positivo									16/18 (89 %)

Tabla 3. El análisis MethylLight de siete marcadores de la metilación del ADN en ADN de orina de 18 pacientes de tumor de vejiga. La patología de estos casos se indica en la Tabla 2.

Evaluación del rendimiento del dispositivo

Como sistema modelo para evaluar la capacidad del dispositivo para capturar y enumerar células tumorales de las muestras de fluido, los inventores usaron célula de cáncer de vejiga 639V, que tienen una mutación puntual (p.R248C; c.742C>T) en el gen que codifica el receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR3) con pérdida del correspondiente alelo natural. En el primer conjunto de experimentos, 100 ml de PBS que contenía entre 10^3 y 5×10^6 de células 639V se añadieron a la cámara de recogida del dispositivo y se forzaron a través del filtro de membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 8 μ m. Para cuantificar el número de células 639V capturado sobre el filtro, el ADN total se extrajo y se determinó el número de moléculas de FGFR3 mutantes usando un ensayo PCR de gotícula digital. En esta configuración, un evento positivo es equivalente a una célula. Las señales se obtuvieron de forma reproducible para todas las muestras cuando 2 μ l (4 %) del ADN extraído se usó como molde para la ddPCR (Figura 9A). De forma notable, para la concentración de células más baja (10^3 en 100 ml), el número promedio de señales obtenidas por reacción de muestra de 2 μ l fue 28, equivalente a una recuperación global de ~70 % de las células de entrada (Figura 9B).

La pérdida del 30 % del material de entrada puede deberse al menos en parte a una pérdida esperada de ADN durante la extracción. A concentraciones más elevadas de las células, se produjo una disminución en la tasa de recuperación, hasta un -5 % a 5×10^6 células/100 ml. Esta menor recuperación se esperaba porque la saturación del filtro produciría la liberación de la válvula de presión y un flujo directo del fluido remanente y su contenido celular hacia el depósito de residuos. Este ensayo inicial sugería que el dispositivo de filtración podía usarse para capturar con eficacia célula de cáncer de vejiga de un fluido, y que la tasa de recuperación es especialmente alta a bajas concentraciones de las células cuando la capacidad del filtro no se ha alcanzado aún.

Para analizar la capacidad del dispositivo de filtración para enriquecer en células cancerosas presentes con baja abundancia contra un fondo de células normales, los inventores enriquecieron entre 10^3 y 5×10^5 células de cáncer de vejiga 639V en 100 ml de PBS que contenía 10^7 linfocitos humanos normales cultivados purificados (diámetro 7-8 μm) y procesar la suspensión usando el dispositivo de filtración. El análisis del ADN extraído de los filtros mediante ddPCR mostró señales de *FGFR3* tanto mutante (R248C) como natural (**Figura 10A**). Las líneas verticales representan configuraciones de corte establecidas manualmente. El ADN se extrajo de los filtros y se analizó para determinar la presencia de moléculas de *FGFR3* mutantes (R248C) usando ddPCR. El ADN de los linfocitos de sangre periférica (PBL) normal se usó como control del *FGFR3* natural. Los resultados mostrados proceden de uno de dos experimentos independientes. Lo que es más importante, la tasa de recuperación del ADN mutante fue similar a la obtenida con soluciones puras de célula de cáncer de vejiga 639V (**Figura 10B**). Aunque el procesamiento de las muestras por filtración eliminó la mayoría de los linfocitos de la sangre (>99 %), se produjo un fondo consistente de alelos *FGFR3* naturales (**Figura 10A,B**). Estas células del fondo pueden representar monocitos residuales, que son más grandes que el diámetro de poro del filtro, y trombocitos, que son más pequeños pero tienen a formar agregados y, por tanto, también pueden quedar capturados sobre el filtro.

Esto demuestra que el dispositivo puede aislar células tumorales poco abundantes y, por tanto, puede ser de utilidad para diagnosticar más pronto tumores más pequeños y menos agresivos. El tamaño y el estado del tumor normalmente se ve reflejado por el número de células esperadas en una muestra de orina. Los tumores más pequeños y menos agresivos no diseminan tantas células hacia la orina como los tumores más establecidos y, por tanto, potencialmente se podría obtener un resultado erróneo con técnicas convencionales de diagnóstico. Esto también demuestra que el ADN se puede aislar a partir de células tumorales enriquecidas en PBS que contiene linfocitos de sangre periférica normales, mostrando que el dispositivo puede aislar células tumorales a partir de células sanguíneas normales.

25 Detección de cáncer de vejiga en especímenes de orina

Tras demostrar que células de cáncer de vejiga cultivadas enriquecidas en linfocitos purificados se pueden capturar y enriquecer usando el dispositivo de filtración, a continuación los inventores sometieron a ensayo el mismo enfoque con muestras de orina de pacientes con tumores de vejiga. Para estudiar si la filtración podría aumentar la sensibilidad respecto del análisis convencional aumentando la proporción entre células normales y tumorales, analizaron en primer lugar 13 muestras de orina en una configuración de muestra dividida, donde una parte de cada muestra se procesa por filtración y el resto se sedimenta por centrifugación. El ADN aislado de todos los filtros y las muestras de sedimentos se cribaron según cuatro mutaciones de *FGFR3* comunes (R248C, S249C, G370C y Y373C) usando ddPCR. Ocho de las muestras (58 %) fueron positivas para una de estas mutaciones (Tabla 4). El análisis cuantitativo mostró la relación entre ADN natural y mutante era mayor en las muestras filtradas que en los correspondientes sedimentos (Tabla 4). Lo que es más importante, los mayores enriquecimientos (6,5 y 8,0 veces, respectivamente) se consiguieron con las dos muestras que representaban las relaciones entre mutante y natural más bajas (**Figura 11**).

40 **Tabla 4.** Fracciones de *FGFR3* mutante (Mut) y natural (WT) en células urinarias recogidas mediante filtración con dispositivo o sedimentación.

ID Paciente	Mutación de <i>FGFR3</i>	Mut/WT \pm SE				
		Dispositivo		Sedimentación		Dispositivo/Sedimento
106	S249C	0,848	\pm 0,047	0,812	\pm 0,014	
107	S249C	0,729	\pm 0,015	0,396	\pm 0,004	1,84
110	Y373C	0,182	\pm 0,001	0,096	\pm 0,003	1,89
119	Y373C	0,008	\pm 0,002	0,001	\pm 0,000	7,92
120	S249C	0,041	\pm 0,002	0,034	\pm 0,002	1,19
121	S249C	0,006	\pm 0,001	0,001	\pm 0,000	6,47
126	S249C	0,022	\pm 0,005	0,020	\pm 0,004	1,09
127	Y373C	0,011	\pm 0,001	0,004	\pm 0,000	2,82

Sumario

45 Las células diseminadas hacia la orina proporcionan una fuente cómoda para la detección no invasiva del cáncer de vejiga. La recogida de las células y el análisis posterior mediante citología o análisis de marcadores específicos de tumor puede ofrecer una alternativa o auxiliar a la cistoscopia en el diagnóstico y vigilancia del cáncer de vejiga. Sin embargo, el uso práctico de los ensayos basados en orina frecuentemente está limitado por la incomodidad de la recogida de muestra, dificultades para analizar grandes volúmenes de muestra, la necesidad de un procesamiento rápido de la muestra para evitar la degradación del contenido celular, y una sensibilidad analítica insuficiente debido a la baja proporción entre células tumorales y normales. Se describe en el presente documento un dispositivo de filtración, diseñado para su uso en el hogar o en el punto de atención sanitaria, que permite la recogida, enriquecimiento y conservación inmediata o el tratamiento de las células tumorales de la orina. En los experimentos

- de enriquecimiento, el uso de este dispositivo junto la PCR de gotícula digital para la cuantificación de biomarcadores de ADN proporcionó una recuperación eficaz de células de cáncer de vejiga con una eliminación de >99 % del exceso de linfocitos. El comportamiento del dispositivo se ha evaluado adicionalmente mediante análisis basado en ADN de las células recogidas de la orina de pacientes con cáncer de vejiga, incluidos algunos con tumores Ta de grado bajo.
- 5 La proporción entre ADN tumoral y normal fue mayor en las muestras filtradas en comparación con las mismas muestras procesadas mediante sedimentación y mostraron alta sensibilidad. La capacidad para recoger, procesar y enviar con facilidad células de diagnóstico a partir de la orina se puede ampliar mediante el uso de ensayos no invasivos para la detección y seguimiento del cáncer de vejiga.

REIVINDICACIONES

1. Una unidad de filtración de fluido biológico que comprende un dispositivo de filtración para filtrar una muestra de fluido biológico, y una unidad de almacenamiento (49), teniendo el dispositivo de filtración:
- 5 una cámara de recogida (1),
un depósito de residuos (21), y
una plataforma de soporte del filtro (15), alojando la plataforma de soporte del filtro un cartucho de filtro extraíble (17) que tiene un filtro adecuado para capturar material biológico presente en la muestra de fluido biológico; en donde la cámara de recogida, el depósito de residuos y la plataforma de soporte del filtro se pueden conectar para permitir el paso de un fluido biológico desde la cámara de recogida al interior del depósito de residuos a través del filtro del cartucho de filtro; **caracterizado por que** el cartucho de filtro se retiene de manera deslizable en la plataforma del soporte del filtro (15) y
- 10 el cuerpo de la unidad de almacenamiento (49) comprende un rebaje (53) para recibir de manera deslizable el cartucho de filtro, en donde el cuerpo está configurado de manera que, cuando está acoplado, el filtro del cartucho de filtro queda herméticamente cerrado dentro del cuerpo de la unidad de almacenamiento.
2. La unidad de la reivindicación 1, en donde el cuerpo de la unidad de almacenamiento tiene una abertura (55) para permitir el acceso al filtro y/o al contenido del filtro del filtro y/o al líquido que rodea el filtro cuando el cartucho de filtro está en su lugar, y en donde la unidad de almacenamiento comprende además una tapa extraíble que cubre la abertura (57).
- 20 3. La unidad de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la unidad de almacenamiento comprende una cámara de solución que contiene una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material biológico, y en donde el acoplamiento del cartucho de filtro con la unidad de almacenamiento produce la liberación de la solución para ponerse en contacto con el filtro.
- 25 4. La unidad de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la unidad de almacenamiento (490) tiene un pistón (600) retenido dentro del rebaje (530), definiendo el pistón y el rebaje una cámara de solución distal a partir de la abertura del rebaje, conteniendo la cámara de solución (602) una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento, el procesamiento y/o el análisis del material biológico, estando el pistón configurado de tal manera que la inserción del cartucho de filtro en el rebaje hace que el pistón se mueva adicionalmente en el rebaje, de tal manera que la solución contenida en la cámara se fuerza a pasar alrededor del pistón en contacto con el filtro.
- 30 5. La unidad de la reivindicación 2, en donde la tapa (57) tiene una cámara de solución que contiene una solución seleccionada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material biológico, y en donde el acoplamiento de la tapa con el cuerpo de la unidad de almacenamiento produce la liberación de la solución para ponerse en contacto con el filtro.
- 35 6. La unidad de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en donde la solución seleccionada para facilitar el almacenamiento y/o el análisis del material biológico es:
- 40 (i) un tampón adecuado para inducir la lisis celular para permitir el análisis de ácidos nucleicos, proteínas, u otras macromoléculas liberadas de la célula;
(ii) un fijador/conservante para preservar células con retención de la morfología característica; y/o
(iii) un medio de cultivo para sustentar el crecimiento celular; y/o
(iv) un tampón isotónico adecuado para el almacenamiento del material biológico.
- 45 7. La unidad de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el dispositivo de filtración tiene medios para aplicar presión a un fluido contenido en la cámara de recogida cuando el dispositivo está acoplado para forzar el fluido a pasar a través del filtro hacia el depósito de residuos.
- 50 8. La unidad de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la cámara de recogida es compresible de tal manera que cuando está acoplado el dispositivo de filtración y la cámara de recogida contiene una muestra de fluido, la compresión de la cámara de recogida aplica presión al fluido, forzando por tanto al fluido a pasar a través del filtro hacia el
- 55 depósito de residuos; opcionalmente en donde la cámara de recogida es una bolsa cilíndrica (3), y en donde un muelle (5) rodea la bolsa cilíndrica a lo largo de su eje cilíndrico, permitiendo la compresión de la bolsa cilíndrica en la dirección de su eje cilíndrico; y/u opcionalmente en donde la plataforma del soporte del filtro comprende una válvula (37) para permitir que se equilibre la presión en el dispositivo durante y después de la aplicación de la presión.
- 60 9. La unidad de la reivindicación 7, en donde el dispositivo de filtración tiene un sistema de bombeo para aplicar presión; opcionalmente en donde la plataforma de soporte del filtro comprende una válvula (37) para permitir equilibrar la presión en el dispositivo durante y después de la aplicación de la presión.
- 65 10. La unidad de cualquier reivindicación anterior, en donde el filtro es una membrana; opcionalmente en donde el

filtro es una membrana de policarbonato.

- 5 11. Un método para capturar material biológico procedente de una muestra biológica utilizando una unidad de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, comprendiendo el método:
- (i) proporcionar una muestra de fluido biológico en la cámara de recogida;
 - (ii) conectar la cámara de recogida a la plataforma de soporte del filtro y al depósito de residuos;
 - (iii) hacer que la muestra de fluido biológico fluya desde la cámara de recogida al depósito de residuos a través del filtro para capturar el material biológico presente en el fluido; y
 - 10 (iv) retirar el cartucho de filtro de la plataforma de soporte del filtro e insertar el cartucho de filtro en la unidad de almacenamiento.
- 15 12. El método de la reivindicación 11, comprendiendo el método aplicar presión a la muestra de fluido biológico en la cámara de recogida para forzar a que el flujo de la muestra de fluido biológico pase desde la cámara de recogida al depósito de residuos a través del filtro;
- opcionalmente en donde el método comprende comprimir la cámara de recogida para aplicar presión a la muestra de fluido biológico en la cámara de recogida.
- 20 13. Un método en donde, habiendo llevado a cabo las etapas de un método de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, el método comprende las etapas de
- (i) aislar ácidos nucleicos, proteínas o células del material biológico capturado en el filtro y/o en la solución si está presente; y
 - 25 (ii) ensayar el material aislado según marcadores conocidos por estar asociados a una enfermedad, una dolencia o un trastorno concretos.
- 30 14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el fluido biológico es orina o un lavado de vejiga o sangre o suero.
- 35 15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde la enfermedad es cáncer; opcionalmente en donde el cáncer es cáncer urinario o ginecológico, opcionalmente en donde el cáncer es cáncer urinario; opcionalmente en donde el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer renal, cáncer de uretra, cáncer ureteral, cáncer urotelial, cáncer uracal, cáncer de endometrio, cáncer de ovario, cáncer de hígado, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de páncreas, un cáncer del tracto GI superior, o cáncer metastásico;
- opcionalmente en donde el cáncer es cáncer de vejiga, cáncer de próstata o cáncer de riñón;
- opcionalmente en donde el cáncer es cáncer de vejiga;
- opcionalmente en donde el cáncer es cáncer de vejiga no invasivo del músculo.
- 40 16. El método o la unidad de cualquier reivindicación anterior, en donde el material biológico son células suspendidas en el fluido biológico.
17. un kit que comprende la unidad de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 e instrucciones para un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16.

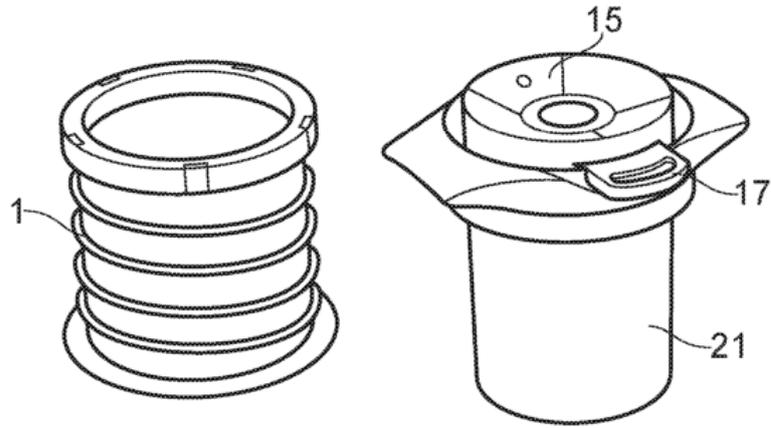


FIG. 2

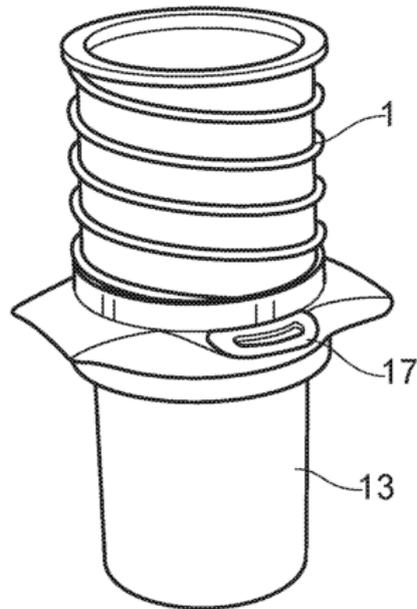


FIG. 3

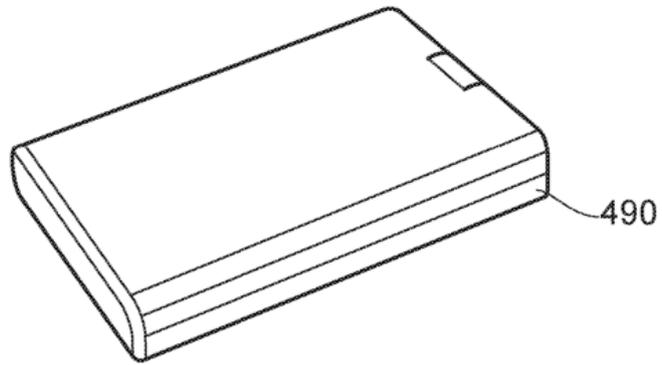


FIG. 4A

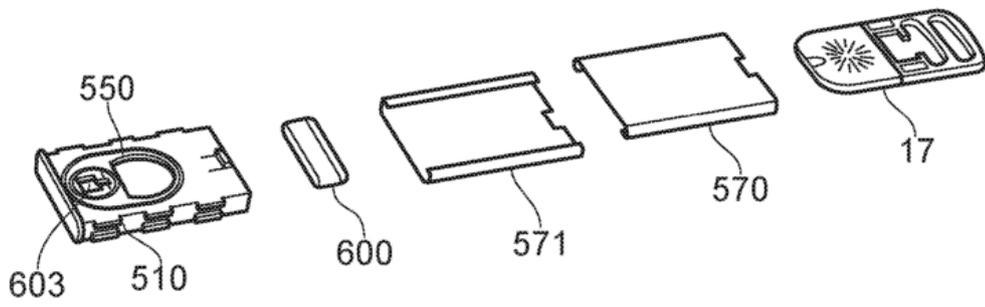


FIG. 4B

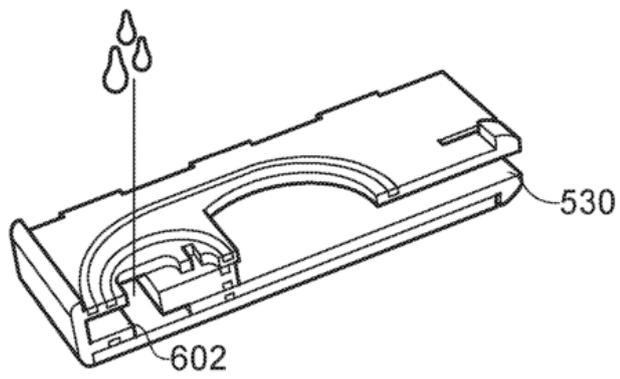


FIG. 4C

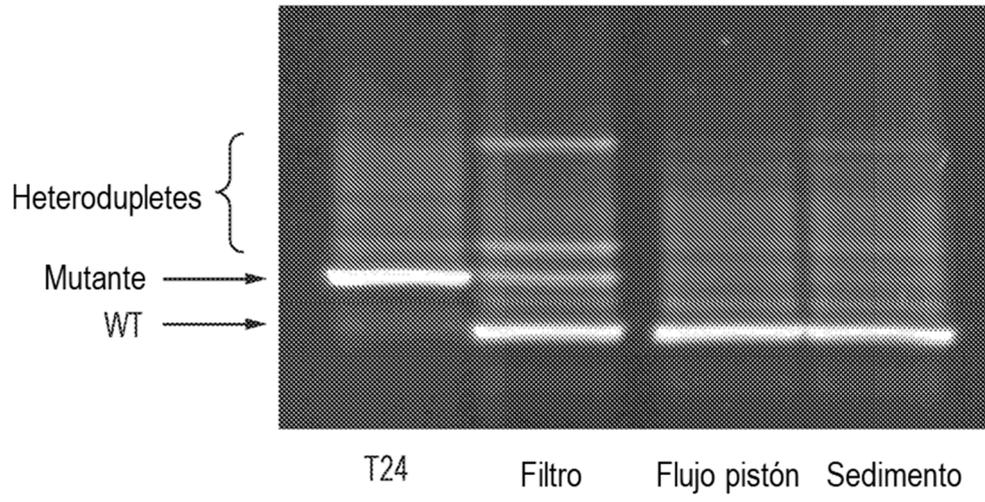


FIG. 5

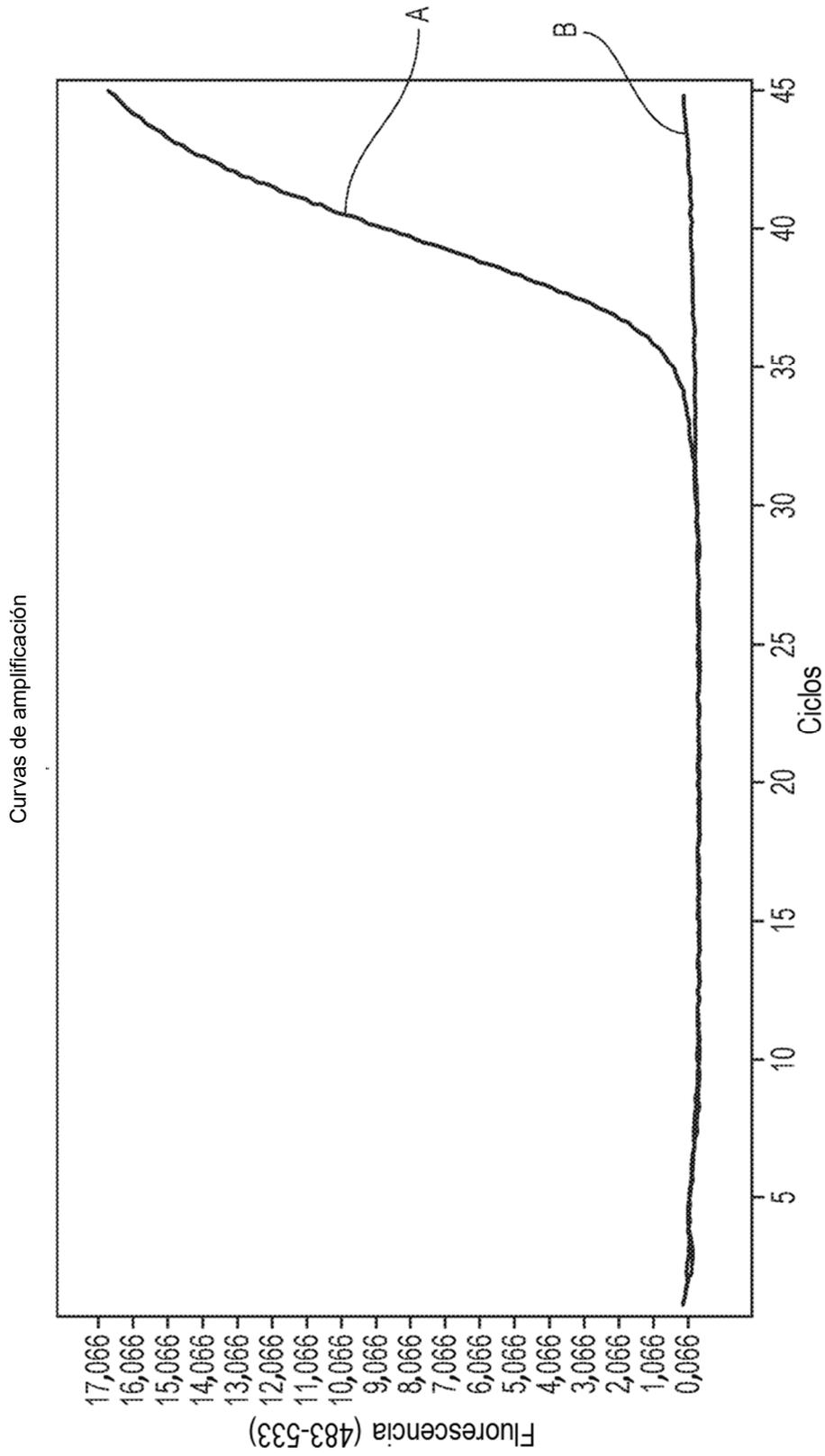


FIG. 7

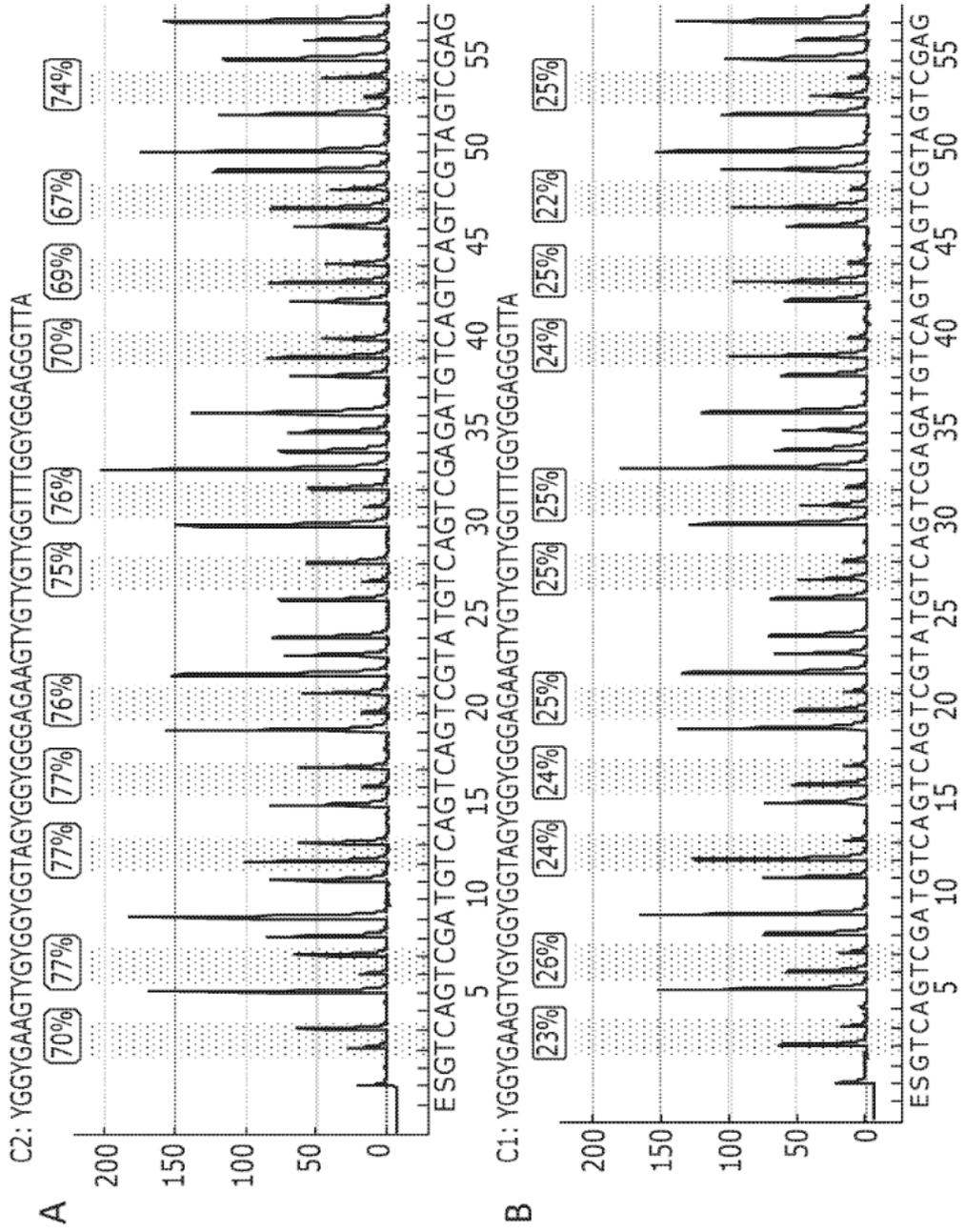


FIG. 8

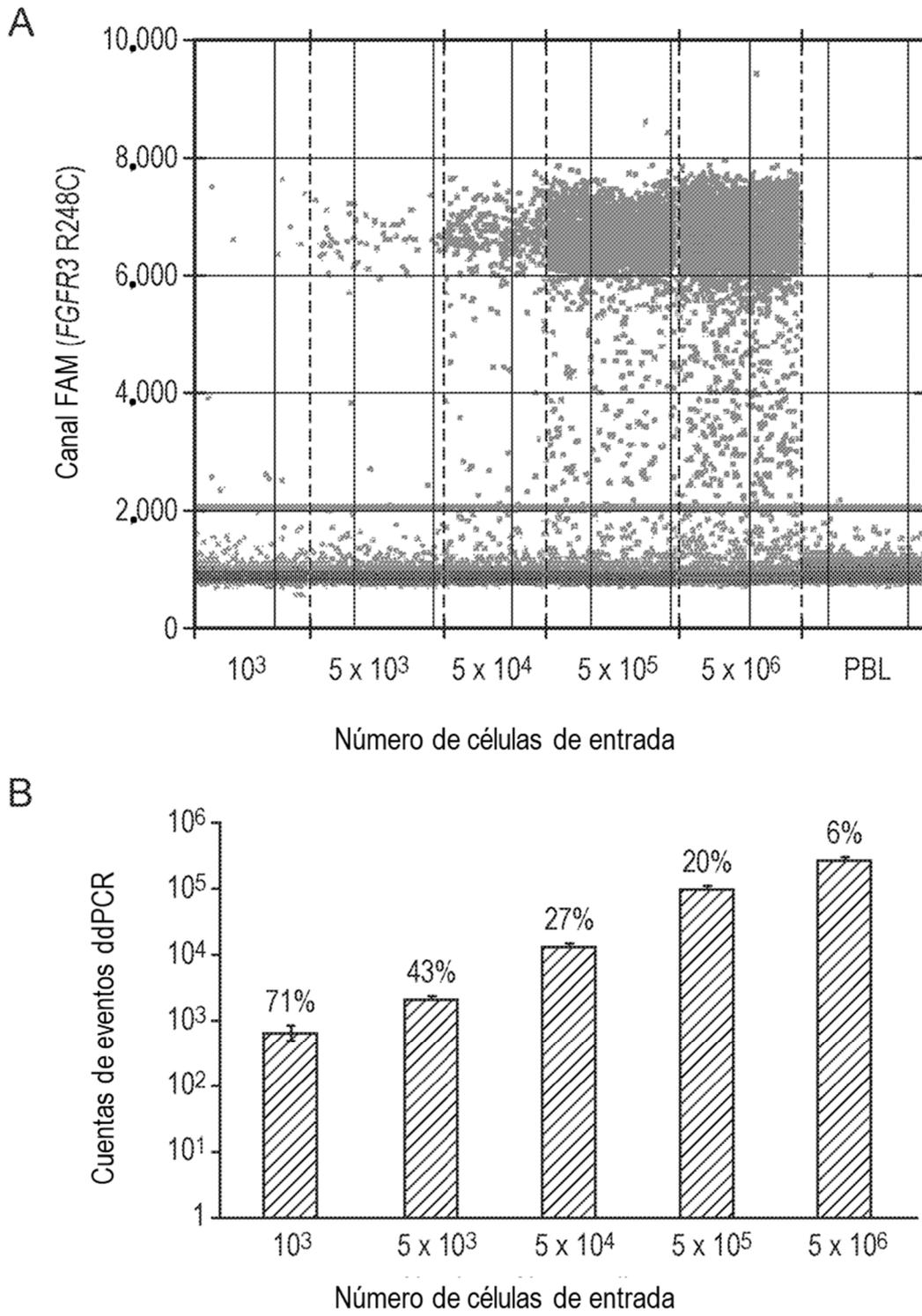


FIG. 9

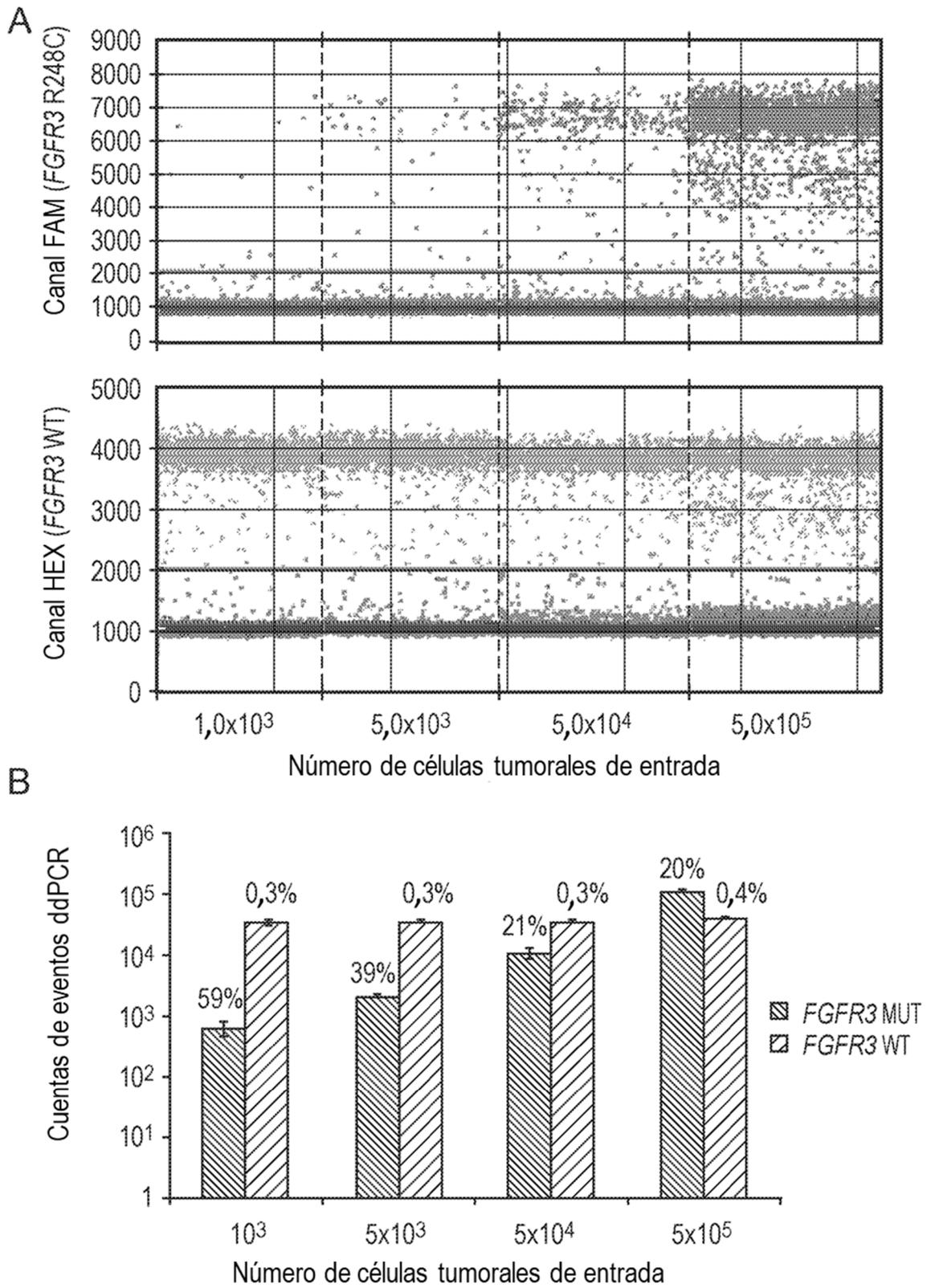


FIG. 10

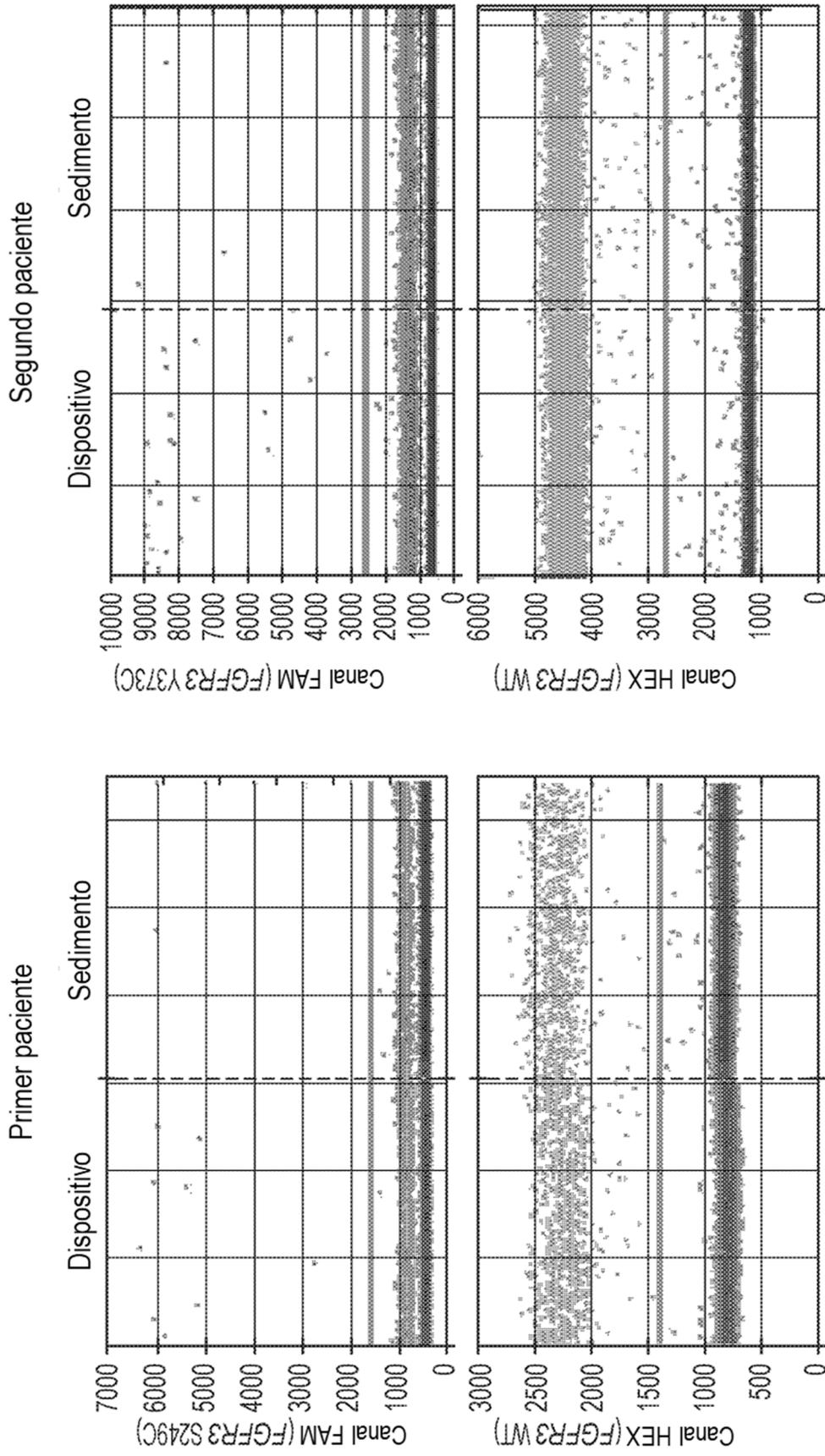


FIG. 11