

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 369 472**

51 Int. Cl.:

A61B 5/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08290179 .4**

96 Fecha de presentación: **26.02.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2095762**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.09.2009**

54 Título: **DISPOSITIVO DE INVESTIGACIÓN MICRO-INVASIVA EN VIVO QUE COMPRENDE UNA GUÍA METÁLICA.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2011

73 Titular/es:
**BIOSTEMS LTD.
C/O MOP 70 ROGERSON'S QUAY
DUBLIN, IE**

72 Inventor/es:
**Pompidou, Alain y
Benhamou, Albert-Claude**

74 Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 472 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).

DESCRIPCION

Dispositivo de investigación micro-invasiva en vivo que comprende una guía metálica

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al funcionamiento de un dispositivo de investigación transparietal y a la utilización de un dispositivo de esta clase para la fabricación de un útil destinado al diagnóstico del cáncer, de una infección, de una inflamación o de un rechazo de injerto en un paciente.

Estado de la técnica

10 Se conocen en la técnica anterior dispositivos de investigación o de tratamiento *in vivo*. Tales dispositivos adoptan la forma de un tubo rígido del tipo de endoscopio o de un catéter constituido por un tubo flexible que se inserta en el organismo, particularmente por las vías naturales o los vasos, y que permite alcanzar un órgano o un tejido concreto. Estos dispositivos permiten particularmente la eliminación de coágulos de la sangre o, cuando están asociados a fibras ópticas, la visualización y el control *in vivo* del estado de un sistema, como el tubo digestivo, o de un órgano, como el colon. El traumatismo para el paciente, resultante de la utilización de tales dispositivos, es entonces reducido al mínimo, pero queda todavía campo para la mejora. Sin embargo, no siempre es posible efectuar un análisis de los órganos o de los tejidos en un paciente con estos dispositivos. Una tal imposibilidad puede resultar de la accesibilidad reducida del citado tejido u órgano con respecto a la circulación sanguínea o de las vías naturales, o incluso de la dificultad de efectuar un diagnóstico fiable sin recurrir a un estudio minucioso de las células del citado órgano o tejido. En este caso, se utiliza de manera corriente en la técnica anterior y en la actualidad, la extracción o extracción de un fragmento del citado tejido u órgano (biopsias) con el fin de controlar *ex vivo* la morfología de estos tejidos u órganos, o más minuciosamente la de las células que los constituyen, particularmente con la ayuda de agujas finas (FNA o «Fine Needle Aspiration»: Engelstein et al. Br. J. Urol., 7 : 210-213, 1994; Rodrigues et al., J. Am. Acad. Dermatol., 42 : 735-740, 2000; Ariga et al., Am. J. Surg., 184 : 410-413, 2002; Pérez-Guillermo et al., Diagn. Citopatol., 32 : 315-320, 2005; Fernández-Esparrach et al. Arch. Broconeumol., 43: 219-224, 2007). Además, es igualmente posible analizar el estado de expresión de un cierto número de marcadores en los que la expresión está correlacionada con un estado patológico concreto (cáncer, inflamación o infección, principalmente).

15 Sin embargo, estos diferentes métodos, por el hecho de la práctica de una biopsia o la aspiración de células *in situ*, hacen sufrir un traumatismo a veces importante al citado tejido u órgano y, como consecuencia, al paciente. El organismo de éste último puede resultar también fuertemente afectado por el hecho de hemorragias o incluso de la cicatrización consecutiva a la extracción, en particular para ciertos órganos (cerebro, páncreas, hígado o pulmones).

20 Existe por tanto todavía en la actualidad una necesidad de la identificación de nuevas metodologías de investigación que permitan efectuar un diagnóstico fiable y preciso, particularmente con respecto a la expresión de marcadores asociados concretamente a diferentes patologías como, principalmente, el cáncer, una inflamación o una infección, al tiempo que se limitan los traumatismos infligidos al paciente.

25 El documento US 2007/287991 describe un detector para medir la tasa de un marcador del dolor. Este detector comprende una zona de detección que se debe situar en la región del disco intervertebral, en contacto con los marcadores del dolor. En el caso en que el marcador del dolor es un marcador proteínico, la zona de detección comprende una fibra óptica. Esta fibra óptica está envuelta por un revestimiento hecho de un material capaz de cambiar de volumen en respuesta a la presencia de un marcador del dolor. Los anticuerpos son conjugados a esta envoltura, y la unión de un antígeno al anticuerpo provoca la disminución del volumen de la envoltura. El revestimiento está a su vez envuelto en un material poroso. Estas tres capas de material que constituyen la zona de detección hacen que el diámetro del detector sea demasiado grande y que por tanto no se adapte a ser dirigido correctamente hasta su lugar objetivo sin alterar simultáneamente las vías de circulación sanguínea.

30 El documento US 2005/153309 describe una sonda biológica de vigilancia para la detección de enfermedades, destinada a ser introducida en la sangre, y que comprende un cuerpo alargado y una superficie unida al cuerpo alargado, que lleva un elemento asociado de unión destinado a sujetar un objetivo complementario. El elemento asociado de unión forma un relieve sobre la superficie de la sonda. Esta sonda está destinada a ser introducida en la sangre o en los fluidos biológicos, con el fin de capturar células circulantes o las proteínas o péptidos que circulan en el fluido sanguíneo o en las cavidades corporales. Esta sonda accede al lugar objetivo a través de un acceso ya formado. Sin embargo, esta sonda no es perforadora, y está adaptada a ser maniobrada correctamente hasta su lugar objetivo.

35 El documento US 7.291.497 describe un dispositivo de análisis que comprende un sistema de investigación constituido por una guía metálica uno de cuyos extremos comprende, en su cara interna, una serie de micro-placas sobre las cuales están fijados reactivos capaces de unirse a los analitos y que permiten la detección de marcadores de una patología. Este sistema permite la detección de analitos presentes en los fluidos biológicos. Sin embargo, su estructura, así como su diámetro, no le permiten penetrar en los vasos sanguíneos, las células o los tejidos.

Los fluidos son aspirados en este dispositivo médico por medio de la aguja, y los analitos son puestos en contacto con las micro-placas de análisis en el interior de los micro-canales.

De ese modo, las micro-placas se sitúan sobre la cara interna de los micro-canales, aguas arriba del medio de extracción constituido por la aguja (« micro-needle »).

5 Este dispositivo no permite poner en contacto directo, sin necesidad de aspiración, los pozos que contienen los reactivos y los analitos, los tejidos, fluidos o células, cualquiera que sea su posición en el organismo.

10 El documento EP 1 358 481 describe un dispositivo de análisis que comprende un micro-sistema de investigación de un sustrato, una varilla flexible en un extremo de la cual está fijado el micro-sistema y un sistema de dilaceración, y cuyo otro extremo está destinado a maniobrar el sistema. Este micro-sistema de investigación comprende, en relieve sobre la superficie de la varilla, al menos una serie de regiones predefinidas, cada una de las cuales contiene diferentes sustancias químicas o biológicas de investigación o de tratamiento. Este dispositivo no permite alcanzar un órgano enfocado para efectuar una micro-extracción necesaria para el diagnóstico *in situ* de una patología.

El documento US 5.938.595 describe una fibra óptica sobre la cual está depositado un revestimiento para el diagnóstico y el tratamiento de los ataques, que permite una navegación endo-vascular únicamente.

15 El documento EP 234 928 describe una fibra óptica, es decir, un sistema de navegación en vidrio, que comprende pozos en los que están dispuestas agrupaciones reactivas. Esta fibra óptica permite únicamente una navegación en los vasos, y no permite alcanzar un órgano enfocado para efectuar una micro-extracción necesaria para el diagnóstico *in situ* de una patología.

20 La patente EP 1 358 481 describe un dispositivo de análisis o de tratamiento *in vivo* que comprende (i) un micro-sistema de investigación de un sustrato nada más que por análisis de una señal fluorescente, (ii) una varilla flexible en un extremo de la cual está fijado el citado micro-sistema y cuyo otro extremo está destinado a la manipulación del citado micro-sistema, (iii) un instrumento médico que posee un ánima o luz interna en la que puede deslizarse la citada varilla, (iv) un sistema deslizante de protección del micro-sistema retirable al nivel del sustrato, y (v) al nivel del citado micro-sistema, un sistema de dilaceración de tejido o de célula, eventualmente asociado a uno o a varios dispositivos elegidos entre un dispositivo de vigilancia a distancia por receptores sensoriales (táctiles, ópticos, físico-químicos y principalmente electrónicos o informáticos digitalizados), de realización de biopsia, de tratamiento, de inyección local de productos biológicos o químicos. Este dispositivo, cuando es dirigido hacia su lugar objetivo, provoca simultáneamente una alteración de las vías de circulación sanguínea.

30 Para permitir la fractura de vasos sanguíneos y la dilaceración de tejido o de células, el micro-sistema es entonces asociado a otro sistema más rígido que asegura esta función, de preferencia en posición distal.

35 Sin embargo, en el caso de dispositivo de investigación *in vivo*, lo más frecuente es que el dispositivo de investigación sea dirigido hacia el órgano o el tejido objetivo utilizando la guía endovascular o endocavitaria. El acoplamiento del micro-sistema con un sistema de dilaceración aumenta entonces de manera no despreciable el diámetro en el extremo del dispositivo descrito. Este último ha revelado entonces ser de un uso complejo para ser correctamente dirigido hasta su lugar objetivo sin alterar simultáneamente las vías de circulación sanguínea. Simultáneamente, el acoplamiento de múltiples elementos perjudica la flexibilidad del conjunto del dispositivo y por tanto a su guiado correcto, así como a la obtención de la rigidez necesaria para permitir la perforación de un órgano o de un tejido.

Descripción de la invención

40 Como resultado de importantes investigaciones, el inventor ha conseguido ahora desarrollar un dispositivo que comprende una guía metálica en un extremo perforante de la cual están directamente acopladas agrupaciones reactivas, particularmente de anticuerpos o de fragmentos de anticuerpos, específicos de un sustrato a ensayar, y cuyo otro extremo está destinado a la maniobra de la citada guía desde el lugar de inserción hasta el lugar de micro-análisis y/o de micro-extracción del citado sustrato. La citada guía puede ser insertada en un sistema de protección retirable, por ejemplo un catéter flexible, que permita también proteger el extremo funcional de la citada guía hasta el lugar de micro-análisis y/o de micro-extracción del sustrato a ensayar constitutivo del tejido, del órgano o de las células de éste.

50 Se trata, de acuerdo con la presente invención, de estructurar la superficie de la guía, con el fin de definir lugares sobre la guía, pozos, en los que serán depositadas las agrupaciones reactivas y en los que tendrán lugar las interacciones bioquímicas. Los citados « pozos » pueden ser realizados por diferentes procedimientos, como, por ejemplo, mediante litografía por haz de iones enfocados (FIB o por « Focused Ion Beam » : Xie et al., Nuclear Instruments & Methods in Physics research Section B-beam Interactions with Materials and Atoms, 211(3) : 363-368, 2003), mediante litografía por láser seguida por un ataque electroquímico y una ablación láser.

55 Alternativamente, la estructuración de la guía metálica puede ser realizada con el fin de definir lugares sobre la citada guía, por ejemplo al menos un surco en el cual esté solidariamente asociado al menos un bio-chip

miniaturizado lineal, circular o en forma de cinta, en el que serán depositadas las agrupaciones reactivas y en el que tendrán lugar las reacciones bioquímicas.

5 El citado dispositivo puede además ser además insertado en un instrumento médico que posea un ánima o luz interna en la cual pueda deslizar dicha guía metálica, y particularmente en una aguja de punción transparietal, principalmente transcutánea o transmucosa, o un endoscopio, comprendido en el mismo un sistema de navegación endovascular.

10 El citado dispositivo puede además estar asociado a una fibra óptica, y la guía metálica de dicho dispositivo puede ser sustituida por una fibra óptica a un extremo perforante de la cual esté asociado un manguito metálico sobre el cual estén directamente acopladas agrupaciones reactivas, particularmente anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, específicos de un sustrato a ensayar, que permitan también una visualización fina *in situ*, con vistas a la captura *in vivo* de los elementos necesarios para el diagnóstico y eventualmente la evaluación del pronóstico. Las propiedades de la fibra óptica son utilizadas para fines de formación de imagen, de marcado y de puesta en posición del dispositivo a partir de la visualización *in situ*.

15 El dispositivo según la invención presenta, por el hecho de su simplificación, al tiempo que permanece micro-invasivo, una flexibilidad o elasticidad mejorada con respecto a los dispositivos de la técnica anterior. Este último puede ser entonces utilizado ya sea más eficazmente para una investigación por vía endocavitaria, principalmente por vía endovascular, o por vía transparietal, particularmente por vía transcutánea o transmucosa. A mayor abundamiento, el dispositivo según la invención, por el hecho de la utilización de una guía metálica, un extremo de la cual está acoplado a reactivos específicos, presenta una rigidez suficiente en su extremo funcional para perforar eficazmente un tejido o un órgano. Finalmente, el diámetro del dispositivo según la invención es suficientemente pequeño en su extremo funcional para permitir una navegación simplificada en la circulación sanguínea o en las cavidades naturales, y sobre todo minimizar el traumatismo a nivel del tejido o del órgano que este debe perforar.

20 Además, y después de la retirada del dispositivo, es entonces posible identificar *ex vivo*, con ayuda de técnicas tradicionales, como una dosificación inmuno-enzimática o por inmuno-fluorescencia, por ejemplo sobre soporte sólido [técnica ELISA, chip de proteínas (ESPINA et al., J. Immunol. Methods, vol. 290, p : 121-133, 2004)], la presencia y la concentración relativa del citado o de los citados sustratos específicos en el extremo del dispositivo según la invención y por tanto al nivel del lugar de micro-análisis y/o de micro-extracción (órgano o tejido).

25 Finalmente, y debido a la naturaleza metálica de la guía, el dispositivo presenta una señal mejorada en formación de imagen (arteriografía, ecografía, exploración, IRM, etc...). Esta propiedad permite simplificar considerablemente el radio-guiado del dispositivo según la invención durante la intervención hasta el tejido u órgano objetivo. Sucede del mismo modo para el acoplamiento del citado dispositivo con una fibra óptica a los fines de formación de imagen, y que permite la visualización detallada o fina *in situ*.

30 En consecuencia, es un primer objeto de la invención un dispositivo para el análisis de un sustrato, caracterizado porque comprende un sistema de investigación micro-invasivo y/o de micro-extracción del citado sustrato, estando el citado sistema constituido por al menos una guía metálica, un extremo **Ea** de la cual está provisto de al menos una serie de pozos a los que está directamente acoplado al menos una agrupación reactiva del citado sustrato, siendo perforante el citado extremo funcional **Ea**, y cuyo otro extremo **Em** está destinado a la maniobra de dicha guía metálica y eventualmente asociado a un sistema de aspiración.

35 El dispositivo según la invención, debido al pequeño traumatismo que engendra en el paciente, permite realizar varios micro-análisis o micro-extracciones en un paciente a intervalos regulares (por ejemplo, análisis y/o extracciones escalonadas en el marco de la próstata). Los citados análisis y/o extracciones sucesivas permiten así, además del diagnóstico, seguir la evolución del cáncer, de una inflamación, de una infección o la buena obtención de un injerto de órgano de un paciente.

40 Ventajosamente, el extremo funcional **Ea** puede presentar una longitud de aproximadamente 0,5 a 2 cm, al menos una serie de 1 a 25 pozos, de preferencia 2x25 pozos, que tengan un diámetro medio de aproximadamente 30 a 80 μm , de preferencia aproximadamente 40 a 60 μm , y de manera muy preferente de aproximadamente 50 μm , una profundidad de aproximadamente 20 a 30 μm , de preferencia 25 μm , estando los citados pozos separados unos de otros en aproximadamente 60 a 120 μm . De preferencia, los pozos tienen una pared lisa o rugosa, una forma ovalada o redonda, con un fondo plano o cóncavo.

45 Según un modo de realización particular del dispositivo según la invención, el citado dispositivo comprende además un sistema de protección retirable al nivel del extremo funcional **Ea**.

Según todavía un modo de realización particular del dispositivo según la invención, el citado dispositivo comprende además un instrumento médico que posee un alma o luz interior en la cual puede deslizar la citada al menos una guía metálica.

50 Por «guía metálica» se ha de entender por ejemplo una varilla metálica maciza flexible o una varilla metálica hueca rígida, que tenga un diámetro comprendido entre 0,2 y 3,5 mm y una longitud comprendida entre 5×10^{-2} y 2 m y que

pueda ser insertada en un vaso sanguíneo, en una pequeña cavidad o a través de un órgano o un tejido, con el fin de poder ser dirigida desde el lugar de inserción hasta el lugar de micro-análisis y/o micro-extracción *in situ*.

5 En particular, una varilla metálica maciza flexible puede estar constituida por una fibra óptica a un extremo **Ea** de la cual está asociado un manguito metálico provisto de al menos una serie de pozos a los cuales está acoplada directamente al menos una agrupación reactivo específico del citado substrato, siendo perforante el citado extremo funcional **Ea**.

10 Ventajosamente, el citado manguito metálico tiene una anchura de aproximadamente 0,5 a 2 cm, y puede presentar al menos una serie de 1 a 25 pozos, de preferencia 2x25 pozos, que tengan un diámetro medio de aproximadamente 30 a 80 μm , de preferencia aproximadamente 40 a 60 μm , y de manera muy preferida de aproximadamente 50 μm , una profundidad de aproximadamente 20 a 30 μm , de preferencia 25 μm , estando los citados pozos separados en aproximadamente 60 a 120 μm . De preferencia, los pozos tienen una pared lisa o rugosa, una forma ovalada o redonda, con un fondo plano o cóncavo.

15 Por « guía metálica » se ha de entender además una varilla maciza flexible o hueca, rígida o flexible, constituida en su totalidad o en parte por una aleación metálica cuyas características de flexibilidad, de oxidación y de inmunogenicidad sean compatibles con una tal utilización en el ser viviente y en particular en el animal, y particularmente en el hombre. Tales aleaciones biocompatibles pueden ser identificadas simplemente por el hombre del oficio con respecto a sus conocimientos generales y comprenden principalmente los aceros inoxidables, las aleaciones a base de titanio, de níquel, de cobalto o las mezclas de estos.

20 El inventor ha podido demostrar que la guía a base de una aleación de titanio y de níquel (aleación de Nitinol) presentaba propiedades particularmente interesantes en términos de flexibilidad del conjunto y de rigidez en su extremo para ser utilizada eficazmente para las vías endovasculares o endocavitarias e igualmente para perforar eficazmente un tejido o un órgano al tiempo que se reduce al mínimo el traumatismo (el tamaño de la perforación al nivel del citado tejido u órgano es, por ejemplo, del orden de 0,05 a 0,5 mm^2 , y de preferencia del orden de 0,07 mm^2).

25 Ventajosamente, la guía metálica está basada en una aleación de níquel y de titanio, de preferencia a base de Nitinol (guías metálicas comercializadas por la sociedad Euroflex).

30 La citada guía metálica puede estar recubierta, a excepción del extremo funcional **Ea**, de un polímero hidrófilo, de preferencia un hidrogel, o de una capa polímera protectora, porosa, que tenga un espesor comprendido entre aproximadamente 0,1 y 51 μm . Ventajosamente, el polímero protector está constituido por una película de parileno, de TiO_2 o de OptoDex® (Arrayon Biotechnology, Suiza), y más preferentemente de una película de parileno.

El sistema de protección retirable en el cual es insertada la guía metálica puede adoptar múltiples formas, y particularmente la de un catéter flexible, que puede ser determinado simplemente por el experto en la técnica, por ejemplo de formas utilizables por la vía endovascular, endocavitaria, transparietal y principalmente transcutánea.

35 El citado sistema de protección retirable puede ser insertado por vía endovascular principalmente para alcanzar los vasos del corazón, el cerebro, los pulmones, el páncreas, los riñones y el hígado.

40 Dicho sistema de protección retirable puede ser insertado por accesos endocavitarios, particularmente por el sesgo de un endoscopio, por vía oral, anal, urogenital y respiratoria, u ORL por vía transmucosa, o incluso por vía transcutánea por el sesgo de una punción al nivel de la piel, para alcanzar por ejemplo la glándula mamaria, y particularmente hasta el riñón o en una articulación o en transparietal en el hígado, el pulmón o el riñón, pero igualmente por vía transmucosa, en particular por el tubo digestivo.

El inventor ha puesto así mismo en evidencia que el dispositivo según la invención permite entonces alcanzar tejidos u órganos, normalmente de difícil acceso, por las vías endovascular, endocavitaria o transparietal, y particularmente transmucosa, utilizadas tradicionalmente.

45 Más generalmente, el inventor ha puesto en evidencia que el dispositivo según la invención permite, debido a sus características específicas de flexibilidad del conjunto y de rigidez en su extremo, alcanzar y perforar por vía transparietal (transcutánea, transmucosa), endovascular o endocavitaria ciertos órganos y tejidos que pertenecen al sistema digestivo de la orofaringe al recto (comprendidos el hígado y el páncreas), al sistema urogenital (por lo tanto, vejiga, riñón, próstata, testículo, ovario y glándula mamaria), al sistema traqueo-bronquial (por lo tanto el pulmón), al sistema ORL (por lo tanto oreja y rinofaringe), al sistema osteo-articular (por tanto cavidades sinoviales), al sistema tegumentario, haciendo así posible la realización de diagnósticos sobre patologías que necesitaban hasta entonces la realización de biopsias, por ejemplo punciones profundas agresivas, como las biopsias trans-hepáticas, comprendida la extracción de células por aspiración con la ayuda de agujas (técnica llamada de « fine needle aspiration » o FNA).

55 Ventajosamente, el citado sistema de protección retirable en el cual se inserta la guía metálica adopta la forma de un catéter flexible adaptado para la vía endovascular o endocavitaria.

El dispositivo según la invención está entonces particularmente adaptado para efectuar una investigación, por ejemplo al nivel de las arterias y de las venas, de los vasos del corazón, de la próstata, de la glándula mamaria, del páncreas, del riñón, del músculo cardíaco, del sistema nervioso central y sus cavidades o canales, del cerebro o del hígado.

- 5 Según el primer modo de realización particular del dispositivo de la invención, el sistema de protección retirable, en el cual se inserta la guía metálica, se inserta a su vez en un endoscopio. El dispositivo según la invención está entonces particularmente adaptado para una administración por vía endocavitaria.

10 El dispositivo según la invención está entonces particularmente adaptado para efectuar una investigación, por ejemplo al nivel del sistema traqueo-bronquial (por lo tanto del pulmón), del sistema digestivo desde la faringe al recto (comprendido el hígado y el páncreas), del sistema urogenital (por tanto la vejiga, el riñón, la próstata, el testículo, el ovario y la glándula mamaria), del sistema oftálmico (canales lacrimógenos), del sistema ORL (por tanto la oreja y rinofaringe), del sistema osteo-articular, o al nivel del cerebro o de la glándula mamaria por la vía endogalactofórica.

15 De acuerdo con un segundo modo de realización particular del dispositivo según la invención, la guía metálica constituida por una aguja fina de punción transparietal, y particularmente de punción transcutánea o transmucosa, puede ser insertada en un sistema de protección retirable, por ejemplo un catéter flexible. El dispositivo según la invención está entonces particularmente adaptado para una administración específicamente por la vía transcutánea o transmucosa.

20 El dispositivo según la invención está entonces particularmente adaptado para efectuar una investigación, por ejemplo al nivel de los tegumentos (piel, cuero cabelludo, etc...), del seno, del riñón, del pulmón, del hígado, del músculo, del aparato osteo-muscular u osteo-articular, o de las glándulas endocrinas (particularmente tiroide, paratiroide, suprarrenales, testículos, glándulas mamarias u ovarios).

25 En lo que concierne al extremo **Ea** provisto de funcionalidad del dispositivo según la invención, aquel puede estar provisto de al menos una serie de pozos a los cuales están directamente acopladas agrupaciones reactivas específicas de un sustrato que se ha de ensayar.

Por « agrupaciones reactivas específicas » se ha de entender, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico [ADN (amplificador, fragmento de gen, EST, SNP) o ARN] complementaria de una secuencia de ácido nucleico a detectar, un antígeno específico de un anticuerpo a detectar o un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo específico de un antígeno a detectar, de preferencia un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

30 Las citadas agrupaciones reactivas específicas están dispuestas en los micro-pozos del extremo funcional o provisto de funcionalidad del dispositivo de acuerdo con la invención según una gama creciente o decreciente. El experto en la técnica puede determinar simplemente, con la ayuda de sus conocimientos generales y de su experiencias de rutina, la citada gama en función de la afinidad de la agrupación reactiva para su sustrato. A título de ejemplo, la gama de agrupación reactiva es del orden de 5 a 500 µg/ml, de preferencia de 10 a 100 µg/ml, para un reactivo, particularmente un anticuerpo, que tenga una afinidad para su sustrato, particularmente un antígeno, del orden de 10⁻⁹.

Por « anticuerpo » se ha de entender de preferencia una inmunoglobulina de mamífero, particularmente humano, y de manera particularmente preferida, una IgG.

40 Por « fragmentos de anticuerpo » se ha de entender fragmentos de anticuerpo capaces de mantener una fijación específica de su antígeno. A título de ejemplo de tales fragmentos de anticuerpo, se pueden citar los fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ o Fv.

45 Son bien conocidos por el experto en la técnica métodos de acoplamiento de reactivos, particularmente de proteínas sobre un soporte metálico. Tales métodos, debido a la débil reactividad química de los ácidos aminados, necesitan en general la activación de la superficie metálica ya sea por mecanismos de oxidación, ya sea recubriendo esta última por al menos una capa de moléculas de uniones, lo más frecuente de polímeros (estos pueden presentar, por ejemplo, agrupaciones tioles, ácidos carboxílicos y/o de aminas). A modo de ejemplo de tales métodos, se puede citar la adsorción sobre soportes metálicos de moléculas funcionales que se organizan en mono-capas auto-ensambladas (self-assembled monolayer SAMs) y particularmente los alcanotioles (véanse principalmente WITTSTOCK y SCHUHMANN, Anal. Chem., vol. 69, p :5059-5066, 1997; y la solicitud internacional WO 03/006948) o el pirrol (por polimerización electroquímica de pirrol biotinilado; DUPONT-FILLIARD et al., Anal. Chim. Acta., vol. 449, p : 45-50, 2001).

50 Por acoplamiento del anticuerpo o de fragmento de anticuerpo a esta capa de moléculas funcionales, se ha de entender un enlace covalente (como de puentes disulfuros entre las agrupaciones tioles libres de los alcanotioles) o no covalente (como un enlace estreptavidina-biotina entre la biotina de una capa de polímeros de un complejo pirole/biotina y la estreptavidina de un complejo estreptavidina/anticuerpo o fragmento de anticuerpo/estreptavidina).

55

- 5 Según un primer modo de realización preferido, el dispositivo según la invención comprende al menos una guía metálica, un extremo de la cual **Ea** está acoplado con al menos una agrupación reactiva, de preferencia un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, específico de un marcador (antígeno) de un cáncer, particularmente del cáncer de seno, de ovario, de próstata, del colon, intra-abdominal, del riñón, del cerebro, del hígado, del pulmón, del páncreas o de una glándula endocrina (principalmente tiroide, testículos u ovarios).
- 10 A modo de ejemplo de marcador del cáncer de seno, se puede citar el marcador CA 15-3 (Carcinoma-Associated Antigen 15-3; Duffy MJ, Shering S, Sherry F, MacDermott E, O'Higgins N, *Int J Biol Markers*, Oct-Dec 2000; 15(4) : 330-3), CA 27-29 (Carcinoma-Associated Antigen 27-29; Kaohsiung J, *J Med Sci*, Sep. 1999; 15(9) : 520-8), CEA (Carcinoembryonic antigen; Soletormos G, Nielsen D, Schioler V, Mouridsen H, Dombrowsky P, *Eur J Cancer*, Mar 2004; 40(4) : 481-6) ; TPA (Tissue Polypeptide Antigen) ; TPS (Tissue Polypeptide Specific Antigen; Given M, Scott M, Mc Grath JP, Given HF, *Breast*, Oct 2000; 9(5) : 277-80), HER2 (Fehm. T, Jager W, Kramer S, Sohn C, Solomayer E, Wallwiener D, Gebauer G. *Anticancer Research*, May-Jun 2004; 24 (3b): 1987-92, ER (Estrogene Receptor; Platet N, Cathiard AM, Gleizes M, García M., *Crit Rev Oncol Hematol*, Jul 2004; 51 (1) : 55-67), PR (Progesterone Receptor; Duffy MJ, *Clin Chem*, Mar 2005; 51(3) : 494-503. Epub Ene 2005 6.), Ki-67 (cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67; Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J, *J Cell Biol*, 1993 Nov; 123(3) : 513-22) y UPA (Urokinase Plasmogen Activator; Duffy MJ, *Crit Rev Clin Lab Sci*, Jun 2001, 38(3) : 225-62).
- 15 A título de ejemplo de marcador del cáncer de ovario, se puede citar el marcador CA125 (Carcinoma Antigen 125; Moss EL, Hollingworth J, Reynolds TM, *J Clin Pathol*, Mar 2005; 58(3) : 308-12), CA 15-3 y CEA (Valenzuela P, Mateos S, Tello E, López-Bueno MJ, Garrido N, Gaspar MJ, *Eur J Gyn Oncol*, 2003; 24(1) : 60-2).
- 20 A título de ejemplo de marcador del cáncer de la próstata, se puede citar el marcador PSA (Prostate-Specific Antigen; Gray MA, *Clin Lab.*, 2005 ; 51(3-4) : 127-33); PMSA (Prostate-Specific Membrane Antigen) y AR (Androgen Receptor; Birtle AJ, Freeman A, Masters JR, Payne HA, Harland SJ, *BJU Int*, Ago 2005; 96(3): 303-7).
- 25 A título de ejemplo de marcador del cáncer del colon, se puede citar el marcador CEA (Duffy MJ, *Clin Chem*, Abr 2001; 47(4) : 624-30), CA 19-9 (Carcinoma Antigen 19-9), CA242 (Carcinoma Antigen 242), CA 72-4 (Carcinoma Antigen 72-4) TPA, TPS (Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Klapdor R, Lamerz R, Nilsson O, Sturgeon C, Topolcan O, *Eur J Cancer*, Abr 2003; 39(6) : 718-27).
- 30 A título de ejemplo de marcador del cáncer intra-abdominal se puede citar el marcador CEA ó CA 19-9 (Coban E, Samur M, Bozcuk H, Ozdogan M, *Int J Biol Markers*, Jul-Sep 2003; 18(3): 177-81).
- 35 A título de ejemplo de marcador del cáncer del páncreas, se puede citar el marcador TA90-IC (a 90-kDa immugenic Tumor-associated Antigen), CA-19-9 (Chung MH, Gupta RK, Bilchik AJ, Ye W, Yee R, Morton DL, *Curr Surg*, Marzo-Abril 2002; 59(2) : 194-198), TPS, HCG beta (hCGbeta, Human Chorionic Gonadotropin beta), CA 72-4, CEA, CA 19-9, CA 242 (Louhimo J, Alfthan H, Stenman UH, Haglund C, *Oncology*, 2004; 66(2) : 126-31).
- 40 A título de ejemplo de marcador del cáncer de hígado, se puede citar el marcador alfa-fetoproteína.
- 45 A título de ejemplo de marcador del cáncer del pulmón, se puede citar el marcador Cyfra A41 (Cytokeratin fragment 41), SCC (Squamous Cell Carcinoma antigen), ACE (Angiotensin Converting Enzyme), CA 19-9, CA 125, NSE (Neuron Specific Enolase), cromogranina A, CYFRA 21-1 (Cytokeratin fragment 21-1) CA 15-3.
- De acuerdo con un segundo modo de realización preferido, el dispositivo según la invención comprende al menos una guía metálica en la que un extremo **Ea** está acoplado con al menos un reactivo, de preferencia un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, específico de un marcador específico de una inflamación, particularmente de la artrite rumatoide.
- 45 A título de ejemplo de marcador de la artrite rumatoide, se puede citar principalmente el IL-1 β , el IL-1R α , el IL-2, el IL-2R, el IL-4, el IL-5, el IL-6, el IL7, el IL8, el IL10, el IL12p40P70, el IL-13, el IL-15, el IL-17, el TNF α , el IFN α , el IFN γ , el GM-CSF, el MIP-1, el IP-10, el MIG, la Eotaxina, el RANTES y el MCP-1 (COCKRUM et al., *Lab Automation*, BTi, Octubre 2005, p:19-21).
- 50 Según un tercer modo de realización preferido, el dispositivo según la invención comprende al menos una guía metálica en la que un extremo **Ea** está acoplado con al menos un reactivo, de preferencia un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, específico de un marcador específico de una infección, principalmente de una infección viral, bacteriana o parasitaria.
- Son conocidos por el experto en la técnica numerosos marcadores infecciosos y aquél podrá identificar sin dificultad el o los marcadores específicos asociados a una infección dada.
- Según un cuarto modo de realización preferido, el dispositivo de acuerdo con la invención comprende al menos una guía metálica, un extremo **Ea** de la cual está acoplado con al menos un reactivo, de preferencia un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, específico de un marcador específico de rechazo de injerto.

Son conocidos por el experto en la técnica numerosos marcadores de rechazo de injerto. A título de ejemplo, se puede citar MIP-1 β y la VE-cadherina para el injerto del corazón (ROUSSOULIÈRES et al., Circulation, vol. 111(20), p:2636-2644, 2005).

5 Con respecto a los marcadores específicos que se han descrito anteriormente, el experto en la técnica respecto a sus conocimientos generales podrá identificar fácilmente y sin experimentación excesiva los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos que puedan ser utilizados en el dispositivo según la invención. A modo de ejemplo, entre los citados anticuerpos se pueden citar los anticuerpos disponibles de TEBU ó AXXORA. El experto en la técnica podrá igualmente obtener tales anticuerpos por métodos de inmunización bien conocidos.

10 De igual modo, el experto en la técnica podrá identificar sin dificultad los ácidos nucleicos específicos adaptados que pueden ser utilizados en el dispositivo según la invención.

15 Ventajosamente, el dispositivo según la invención, al menos en su parte terminal provista de funcionalidad en contacto con el sustrato a analizar, presenta un grado de seguridad de esterilidad (SAL, por Sterility Assurance Level) del orden de 10⁻⁶. Se pueden considerar diferentes alternativas con el fin de conseguir este grado de esterilidad. Una posibilidad consiste en esterilizar el dispositivo en ausencia de las agrupaciones reactivas específicas del sustrato a detectar y después añadir estas últimas en condiciones estériles. Otra posibilidad consiste en esterilizar el dispositivo después de la adición de las agrupaciones reactivas, lo que precisa utilizar técnicas de esterilización que no reduzcan significativamente la actividad de las citadas agrupaciones reactivas (por ejemplo esterilización por óxido de etileno o radiación).

20 Un procedimiento de detección *ex-vivo* de un sustrato presente en un tejido u órgano comprende las etapas siguientes:

- a) la incubación del extremo **Ea** provisto de funcionalidad de un dispositivo según la invención, con una solución que comprende al menos un agente de detección específico del citado sustrato, después de que el citado extremo haya sido puesto en contacto con el citado tejido u órgano que deba ser examinado.
- 25 b) la detección del citado sustrato.

La etapa de incubación es efectuada durante un tiempo suficiente para que el agente de detección en solución, particularmente un anticuerpo, pueda fijarse específicamente al sustrato (marcador, antígeno, anticuerpo, etc...), particularmente un antígeno, eventualmente presente en el extremo del dispositivo. El experto en la técnica puede determinar, simplemente con la ayuda de sus conocimientos generales y de experiencia de rutina, este tiempo de incubación en función de la afinidad del agente de detección en solución, particularmente un antígeno. Este tiempo de incubación es igualmente función de la temperatura de la solución durante esta incubación. A título de ejemplo, el tiempo de incubación es del orden de 1 minuto a 2 horas, de preferencia entre 5 minutos y 1 hora, y de manera particularmente preferida, de 10 a 30 minutos, para una temperatura comprendida entre 20°C (temperatura ambiente) y 37°C.

35 Ventajosamente, el agente de detección en solución es diferente del reactivo específico acoplado al extremo provisto de funcionalidad del dispositivo según la invención.

De preferencia, el agente de detección es un anticuerpo.

Ventajosamente, el anticuerpo en solución y el anticuerpo acoplado al extremo funcional del dispositivo según la invención son cada uno de ellos un anticuerpo policlonal, siendo de preferencia idénticos los citados anticuerpos.

40 Ventajosamente, el anticuerpo en solución y el anticuerpo acoplado al extremo funcional del dispositivo según la invención son cada uno de ellos un anticuerpo monoclonal, siendo de preferencia diferentes los citados anticuerpos.

Ventajosamente, el anticuerpo en solución está marcado, y particularmente está acoplado a una enzima, por ejemplo a la peroxidasa o a la fosfatasa alcalina.

45 Según un primer modo de realización particular del procedimiento, este comprende además una etapa a') de incubación del citado extremo en una solución que comprende al menos un agente de detección específico del agente de detección de la etapa a), intercalada entre las etapas a) y b).

El experto en la técnica podrá identificar simplemente con la ayuda de sus conocimientos generales, los anticuerpos adaptados al procedimiento según la invención. A título de ejemplo, es posible utilizar en esta segunda etapa un anticuerpo que reconozca específicamente inmunoglobulinas de ratón, si tales inmunoglobulinas de ratón dirigidas específicamente contra el sustrato (marcador, antígeno, anticuerpo, etc...) a identificar son utilizadas en la etapa a).

50 De acuerdo con un segundo modo de realización particular del procedimiento, este comprende una etapa de lavado a continuación de la etapa de incubación a), y eventualmente de la etapa a'), cuya etapa de lavado permite eliminar los anticuerpos que no estén fijados específicamente al marcador (el antígeno).

El protocolo de una tal etapa de lavado forma todavía parte de los conocimientos generales o puede ser determinada simplemente por experiencias de rutina. A título de ejemplo, una tal etapa es efectuada con una solución que comprende una concentración más o menos elevadas de detergente (de 0,05 a 1%), como el TRITON X100®, y ello en función de la afinidad del anticuerpo en solución para su antígeno específico.

- 5 La etapa de detección es efectuada poniendo en evidencia una actividad, particularmente enzimática, acoplada al anticuerpo utilizado en la etapa a) o, eventualmente, en la etapa a').

El protocolo utilizado para esta etapa de detección es función del marcador utilizado, y particularmente de la enzima utilizada, por ejemplo la peroxidasa y la fosfatasa alcalina, y forma parte de los conocimientos generales del experto en la técnica.

- 10 Esta etapa de detección permite deducir la cantidad de sustrato específico (por ejemplo antígeno) fijada al extremo funcional del dispositivo y finalmente la cantidad de sustrato específico presente al nivel del órgano o del tejido donde ha sido efectuado el micro-análisis y/o la micro-extracción.

- 15 Finalmente, las diferentes agrupaciones reactivas utilizables para realizar el procedimiento son bien conocidas por los expertos en la técnica e incluyen, principalmente, los reactivos utilizados por la tecnología de dosificación inmunoenzimática o por inmunofluorescencia, por ejemplo sobre soporte sólido [técnica ELISA, chip de proteínas (ESPINA et al., antes citada, 2004)].

Un segundo objeto de la invención consiste en la utilización de un dispositivo según la invención, para la fabricación de un útil destinado al diagnóstico de un cáncer, de una inflamación, de una infección o de un rechazo de injerto en un paciente.

- 20 Según un modo de realización particular de la invención, el citado útil de diagnóstico puede comprender al menos una guía metálica insertada en un catéter flexible insertado en un endoscopio.

- 25 Según otro modo de realización particular de la invención, el citado útil de diagnóstico comprende al menos una guía metálica que consiste en una aguja de punción transparietal, y particularmente de punción transcutánea o transmucosa, que puede ser insertada en un sistema de protección retirable, por ejemplo un catéter flexible. Además, el sistema de protección retirable y la guía metálica cooperan de manera que permiten la puesta en contacto del extremo **Ea** provisto de funcionalidad de la citada guía con el lugar de micro-análisis y/o de micro-extracción.

En estos dos modos de realización particulares de la invención, la citada al menos una guía metálica puede estar asociada, en al menos una parte de su longitud, a una fibra óptica con vistas a señalización y de posicionamiento.

- 30 Ventajosamente, el citado útil de diagnóstico es administrado por vía endocavitaria.

El mencionado útil permite así efectuar un micro-análisis y/o una micro-extracción al nivel del sistema digestivo de la faringe al recto (comprendiendo el hígado y el páncreas), del sistema urogenital (y por tanto la vejiga, la uretra, el riñón, la próstata), del sistema traqueo-bronquial (por tanto el pulmón), del sistema ORL (por tanto oído y rinofaringe), del sistema óseo-articular (y por tanto cavidades sinoviales).

- 35 De manera preferida, el citado útil de diagnóstico es administrado por vía transparietal, particularmente por vía transmucosa o transcutánea.

- 40 Un útil de diagnóstico de esta clase permite así analizar tejidos u órganos difíciles de alcanzar por la vía endocavitaria o endovascular utilizada habitualmente. Un tal útil de diagnóstico permite de ese modo efectuar un micro-análisis y/o una micro-extracción por vía transparietal al nivel de la piel, de los testículos, de la próstata, del ovario o de las glándulas mamarias, pero igualmente del riñón y del hígado, del sistema nervioso (principalmente del cerebro), así como del sistema endocrino (por ejemplo la tiroides).

Los ejemplos que siguen permiten utilizar la invención y se dan con carácter no limitativo.

Breve descripción de las Figuras

La figura 1 representa diferentes posibilidades para la estructuración de las guías metálicas.

- 45 La figura 2 representa fotografías de microscopio electrónico de barrido de diferentes orificios realizados por FIB (se puede observar la gran rugosidad de superficie debida a las inhomogeneidades de grabado).

La figura 3 representa una explicación y una observación del efecto de sombreado de la técnica de fresado por la fluorina.

La figura 4 representa la sucesión de las operaciones de micro-formación.

La figura 5 representa (a) orificios hemisféricos observados por microscopio óptico (b) series de orificios observados sobre una guía a base de Nitinol por microscopio electrónico de exploración (c) detalle de una cavidad (d) compararon de la rugosidad de superficie en la cavidad con la rugosidad de la superficie de la guía.

5 La figura 6 representa fotos de microscopio electrónico de exploración que muestran el mismo orificio hemisférico que en la figura 5 después del tratamiento de bruñido electroquímico.

La figura 7 representa un esquema del dispositivo de la invención para la inmunocaptura con un primer anticuerpo monoclonal (AcM 1) y la revelación del antígeno ACE con un segundo anticuerpo monoclonal (AcM 2).

La figura 8 representa los resultados de ELISA con el anticuerpo de captura 5910 y la revelación con el anticuerpo 5909 (absorbencia obtenida con un suero positivo en antígeno ACE).

10 La figura 9 representa los resultados de ELISA con el anticuerpo de captura 5910 y la revelación con el anticuerpo 5909 (absorbencia obtenida con un suero negativo en antígeno ACE).

La figura 10 representa los resultados de ELISA con el anticuerpo de captura 5905 y la revelación con el anticuerpo 5909 (absorbencia obtenida con un suero positivo en antígeno ACE).

15 La figura 11 representa los resultados de ELISA con el anticuerpo de captura 5905 y la revelación con el anticuerpo 5909 (absorbencia obtenida con un suero negativo en antígeno ACE).

La figura 12 representa los resultados de ELISA de las varillas plásticas rígidas con el anticuerpo de captura 5910 y la revelación con el anticuerpo 5909 (absorbencia obtenida con un suero positivo en antígeno ACE).

Estas figuras son ilustraciones de la sensibilidad y de la especificidad del método utilizado.

EJEMPLO 1: PREPARACION DE UNA GUIA METALICA BASADA EN NITINOL Y SU ACTIVACION

20 La superficie de una guía metálica a base de Nitinol (Euroflex) es estructurada con el fin de definir lugares, por ejemplo pozos, en los que serán depositadas las agrupaciones reactivas y en los que tendrán lugar las interacciones bioquímicas (figura 1).

25 Los citados « pozos » pueden ser realizados por diferentes procedimientos, como, por ejemplo, por litografía por haz de iones enfocados (FIB o para « Focused Ion Beam » : Xie et al., Nuclear Instruments & Methods in Physics research Section B-beam Interactions with Materials and Atoms, 211(3): 363-368, 2003), mediante litografía por láser seguida por una grabación electroquímica y una ablación por láser.

30 Con la técnica FIB, la máquina crea un haz de iones que se enfoca sobre la superficie que ha de ser estructurada. Bajo la acción mecánica del haz de iones, los átomos del material de superficie son eliminados de la superficie. Se pueden formar con la técnica FIB orificios de un diámetro de 20 μm en un periodo razonable con un factor de socavadura de $8 \mu\text{m}^3\text{s}^{-1}$ bajo una corriente de haz de 20 nA. La figura 2 muestra orificios con diámetros de 5, 20 y 40 μm con una profundidad de 10 y 20 μm . La superficie del fondo del orificio es rugosa debido a la nueva deposición de material pulverizado en el curso del ataque. El factor de socavadura ha sido medido a 200 nm min^{-1} sobre un área circular de 40 μm de diámetro y con una corriente de haz de 20 nA. Ello da un factor de socavadura de $0,2 \mu\text{m}^3\text{nC}^{-1}$ (aproximadamente $5 \mu\text{m}^3\text{s}^{-1}$), que corresponde a un tiempo de procedimiento de 20 min para efectuar un orificio de 35 $20 \mu\text{m}$ de diámetro y de $20 \mu\text{m}$ de profundidad. Con el fin de mejorar la rugosidad de la superficie, se ha utilizado una técnica de fresado asistido por fluorina (XeF_2); entonces se obtiene una muy pequeña rugosidad de superficie, pero como la fuente de XeF_2 no estaba exactamente en el eje del haz de grabación, se observó un efecto de sombreado (figura 3).

40 La técnica de litografía por láser y de grabación electroquímica consiste en una primera etapa de recubrir la superficie con una capa de polímero. En una segunda etapa, la capa de polímero es conformada utilizando la ablación por láser. En una tercera etapa, la superficie es grabada utilizando una grabación electroquímica isotrópica a través de la abertura practicada en la capa de polímero (figura 4). La figura 5 presenta los resultados de diferentes ensayos de estructuración sobre guías metálicas a base de Nitinol.

45 Por otra parte, las guías metálicas basadas en Nitinol que son utilizadas *in vivo* son habitualmente tratadas por bruñido electroquímico, que sustituye la capa de óxido nativo NiTi con una capa TiO_2 biocompatible. Las guías formadas con orificios son sometidas a este procedimiento con el fin de evaluar la influencia del procedimiento sobre la estructura de los orificios (figura 6).

50 Otra manera de preparar las cavidades sobre las superficies de las guías basadas en Nitinol recurre a la ablación por láser. La utilización de cortos impulsos de láser permite la evaporación local del metal sin afectar al metal circundante debido al calor generado. Las más pequeñas dimensiones de las que se ha informado son del orden de $20 \mu\text{m}$.

Si bien los tres procedimientos descritos anteriormente permiten la realización de pozos, es el procedimiento de grabación electroquímica el que proporciona los mejores resultados.

EJEMPLO 2: TRAUMATISMO CONSECUTIVO A LA INSERCIÓN *IN VIVO* DE UNA GUÍA METÁLICA EN UN ÓRGANO PARTICULAR

Para estos experimentos se han utilizado micro-guías metálicas (MTI 0,012" Silver Speedy), cuyas guías metálicas estaban insertadas en micro-catéteres.

5 El dispositivo ha sido introducido en cerdos, bajo anestesia general, al nivel de una punción y después al nivel de la escarpa hasta el riñón por la vía endovascular (a través de la arteria femoral). Este guiado ha sido asegurado por el seguimiento del citado dispositivo en la arteria femoral por arteriografía.

10 Una vez posicionado a la entrada del riñón, el dispositivo ha sido introducido en el riñón por efracción endoarterial. Esta penetración en el tejido se hace a una profundidad de algunos milímetros y dicho dispositivo ha sido mantenido durante una decena de minutos.

Finalmente, el dispositivo ha sido entonces retirado.

Los animales han sido entonces sometidos a eutanasias y los riñones de estos últimos han sido extraídos para evaluar el estado de los mismos después de la penetración del dispositivo según la invención.

15 Los resultados han mostrado que no ha estado asociada a la efracción o fractura ninguna hemorragia importante del riñón. La lesión más importante constatada presentaba una dimensión de 3 x 1 mm al nivel del lugar de la efracción.

El dispositivo según la invención permite por tanto acceder a un órgano al tiempo que se mantiene débilmente invasivo o agresivo.

EJEMPLO 3: MICRO-TRAUMATISMO CONSECUTIVO A LA INSERCIÓN DEL DISPOSITIVO AL NIVEL DEL HÍGADO

20 Se han utilizado micro-guías metálicas (MTI 0,012" Silver speedy), cuyas micro-guías metálicas eran situadas en un fibroscopio a diferencia del ejemplo 1.

El dispositivo ha sido introducido en cerdos, bajo anestesia general, al nivel de una punción a la altura de la escarpa y después hasta el hígado por navegación endoarterial (a través de la arteria femoral). Este guiado ha sido asegurado por el seguimiento del citado dispositivo en la arteria femoral por arteriografía.

25 Una vez situado en la proximidad del hígado, el dispositivo ha sido introducido en el mismo. Esta penetración en el tejido ha sido hecha a una profundidad de algunos milímetros y el citado dispositivo ha sido mantenido allí durante una decena de minutos.

Finalmente, el dispositivo ha sido entonces retirado.

30 Como anteriormente, la extracción del hígado después de la operación ha permitido juzgar la agresividad de la intervención en el órgano.

35 No ha sido observada en la superficie del hígado ninguna lesión macroscópicamente visible en la superficie del hígado. En el corte, se ha observado la presencia de dos focos hemorrágicos intra-parenquimatosos de asiento sub-capsular de 1,5x0,4 cm y de 1,8x0,5 cm. Histológicamente, la arquitectura hepática es en todo momento conservada con una congestión de las sinusoides, de las pequeñas venas puertadas y de las venas centro-lobulares, sin ninguna otra anomalía notable.

Conclusión

Los resultados han mostrado que son mínimas las lesiones hemorrágicas: se han podido observar dos lesiones macroscópicas menores sin destrucción alguna de las células parenquimatosas y con una simple congestión de los capilares y de las venas centro-lobulares.

40 La utilización de una guía metálica permite pues obtener un traumatismo menor y, en cualquier caso, ampliamente inferior al resultante de una biopsia.

EJEMPLO 4: ESTUDIO DE LOS PARAMETROS PARA LA CONCEPCIÓN Y LA REALIZACIÓN DE UN DISPOSITIVO QUE PERMITA LA INMUNOCAPTURA Y LA DETECCIÓN DEL ANTIGENO ACE *IN VITRO* SOBRE SOPORTES SÓLIDOS

45 El dispositivo utiliza el principio de la técnica ELISA que permite poner en evidencia el antígeno ACE. Se han utilizado dos anticuerpos monoclonales que reconocen sobre este antígeno epitopes diferentes, para la captura (AcM1) y la revelación del antígeno ACE (AcM2). Estos anticuerpos monoclonales, al tener el mismo isotipo (IgG1), la revelación del antígeno ACE a sido realizada con la ayuda de un anticuerpo monoclonal acoplado a la biotina y de un complejo estreptavidina-peroxidasa (figura 7).

50 Se han utilizado dos tipos de soporte, o bien placas para ELISA, o bien varillas plásticas rígidas.

Placas para ELISA (Greiger)

- 5 Se depositaron en pozos 100 µl de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno ACE (clon 5910 o clon 5905, producidos en el ratón y comercializados por Medix Biochemical) diluidos (1/5000 a 1/128000) en tampón carbonato/bicarbonato, y la placa ha sido colocada durante 1 hora a 37°C. Se realizó un testigo negativo sustituyendo el anticuerpo por tampón carbonato/bicarbonato.
- Después de tres lavados con 250 µl por pozo de PBS, los sitios libres de la placa fueron saturados por 200 µl de PBS-BSA (suero albúmina bovino) 3% durante 2 horas a 37°C.
- 10 Los pozos fueron a continuación lavados tres veces por 250 µl de PBS-Tween a 0,5% antes de añadir 100 µl por pozo de un suero positivo en antígeno ACE diluido al 1/10, 1/100, 1/1000 en PBS-Tween, y la placa ha sido incubada durante 1 hora a 37°C.
- Se efectuaron tres lavados de 250 µl por pozo en PBS-Tween antes de la adición de 100 µl por pozo de un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno ACE (clon 5909 producido en el ratón y comercializado por Medix Biochemical, que difiere de los anticuerpos precedentes de captura utilizados por su constante afinidad y por los epitopos reconocidos) biotinilado a 1/500 en PBS-Tween, y la placa fue de nuevo incubada durante 1 hora a 37°C.
- 15 Después de tres lavados al PBS-Tween, se añadieron en cada pozo 100 µl de conjugado estreptavidina acoplado a la peroxidasa diluida al 1/2000 e incubados durante 1 hora a 37°C.
- Después de tres lavados al PBS-Tween, se efectuó la revelación por adición de 200 µl por pozo de la mezcla sustrato (H₂O₂) y cromógena (OPD, Sigma) en tampón citrato-fosfato (pH 5).
- 20 En paralelo, se realizó la misma operación utilizando como antígeno un suero de paciente «normal» (testigo negativo con una dosificación de ACE <5 UI/ml).
- La reacción fue detenida a continuación por la adición de 50 µl de ácido sulfúrico a 1M por pozo. La absorbencia fue leída a 492 nm sobre un lector de placas (ref: ELX. 800 UV).
- 25 Los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo monoclonal 5910 por la inmunocaptura (diluido al 1/500 después de mitad en mitad hasta el 1/128000) y la revelación por el anticuerpo monoclonal 5909 biotinilado están presentados en la figura 8 para el suero positivo en antígeno ACE, y en la figura 9 para el suero negativo en ACE.
- Los resultados obtenidos utilizando el anticuerpo monoclonal 5905 por la inmunocaptura (diluido al 1/100, 1/200, 1/500, después de mitad en mitad hasta el 1/32000) y la revelación por el anticuerpo monoclonal 5909 biotinilado están presentes en la figura 10 para el suero positivo en antígeno ACE, y en la figura 11 para el suero negativo en ACE.
- 30 Leyendas de las figuras 8 a 11:
- Ordenada: absorbencia (DO) a 492 nm
- Abscisa: diluciones del anticuerpo de captura (5910 ó 5905)
- ◆ = dilución suero positivo en ACE al 1/10
- = dilución suero positivo en ACE al 1/100
- 35 Δ = dilución suero positivo en ACE al 1/1000
- × = sin suero
- Los resultados muestran que el suero positivo en antígeno ACE al 1/10 da una absorbencia (DO) superior a 0,5 cuando el anticuerpo monoclonal de captura es utilizado al 1/500 (figura 8). En las mismas condiciones, el suero negativo en antígeno ACE da una DO inferior a 0,15 (figura 9).
- 40 Sin embargo, se ha de observar que los mejores resultados han sido obtenidos con el par anticuerpo monoclonal 5905 de captura y el anticuerpo monoclonal 5909 de detección (figuras 10 y 11) que con el par anticuerpo monoclonal 5910 de captura y anticuerpo monoclonal 5909 de detección (figuras 8 y 9). En efecto, ha sido observada una DO de 1 con el suero positivo en antígeno ACE diluido al 1/10 (figura 10) cuando el suero negativo en antígeno ACE da en las mismas condiciones una DO de 0,1 (figura 11). Estos resultados han sido confirmados
- 45 utilizando el anticuerpo monoclonal 5910 de captura a diferentes diluciones (datos no representados).

Soportes plásticos rígidos

En una primera etapa, fueron activados soportes plásticos rígidos bajo la forma de varillas de 2 a 3 cm de longitud y de 0,5 a 1 mm de diámetro.

- En una segunda etapa, los soportes así activados fueron situados en micro-tubos de hemólisis de 1 ml (Fisher) y han sido provistos de funcionalidad con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno ACE (clon 5910 producido en el ratón y comercializado por Medix Biochemical) y diluido al 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 en tampón carbonato/bicarbonato (250 µl/tubo) durante 1 hora a 37°C. Se realizó un testigo negativo sustituyendo el anticuerpo monoclonal por tampón carbonato/bicarbonato. Después de fijación y lavados, fue efectuada la saturación con 500 µl de PBS-BSA 3% durante una noche a +4°C.
- Los soportes fueron a continuación incubados con 250 µl de suero positivo en antígeno ACE diluido al 1/10, 1/100 en PBS o con un suero de un sujeto « sano » (testigo negativo en antígeno ACE) a la misma dilución durante 1 hora a 37°C.
- Un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno ACE (clon 5909 producido en el ratón y comercializado por Medix Biochemical, que difiere del clon 5910 por su constante de afinidad y por los epitopes reconocidos) purificado, de 1 mg/ml, ha sido dializado una noche a 4°C contra el tampón borato 0,1 M pH 8,8. Una solución de biotina de 10 mg/ml en DMSO ha sido a continuación añadida a razón de 50 µg/mg de anticuerpo. Después de incubación de 4 horas a temperatura ambiente y bajo agitación, se añadió cloruro de amonio 1M, a razón de 20µl/250µg de biotina, y la solución obtenida ha sido de nuevo incubada durante 1 minuto a temperatura ambiente. Después de la parada de la reacción, el anticuerpo marcado fue dializado 24 horas a +4°C contra PBS y este anticuerpo marcado fue conservado bajo la forma de alícuotas a -20°C.
- Después de 3 lavados en PBS-Tween, los soportes fueron incubados con 250 µl del anticuerpo 5909 biotinilado y diluido al 1/500 en PBS-Tween durante 1 hora a 37°C.
- La detección de la biotina (éster de ácido 6-biotinamidocaproilamido-caprónico y de N-hidroxi-succinimida, Sigma) fue puesta en evidencia con la ayuda de un complejo estreptavidina-peroxidasa (Amersham Biosciences) diluido al 1/2000 en PBS durante 1 hora a 37°C.
- La revelación de la actividad enzimática ha sido realizada por la adición de 750 µl por tubo de mezcla substrato (H₂O₂) y cromógeno (OPD, Sigma) en tampón citrato-fosfato (pH 5).
- La reacción fue detenida a continuación por la adición de ácido sulfúrico a 1M. La absorbencia ha sido leída a 492 nm.
- Los resultados de ELISA sobre varillas plásticas se presentan en la figura 12.
- Leyendas de la figura 12:
- Ordenada : absorbencia (DO) a 492 nm
- Abscisa: diluciones del anticuerpo 5910 de captura
- ◆ = dilución antígeno ACE al 1/10
 - = dilución antígeno CAE al 1/100
 - Δ = dilución testigo negativo al 1/10
 - × = dilución testigo negativo al 1/100
- En general, los resultados muestran que las DO son de 7 a 10 veces más elevadas con el suero positivo en antígeno ACE que las obtenidas con el suero negativo en antígeno ACE.
- Los mejores resultados han sido obtenidos con los soportes plásticos rígidos sobre los cuales ha sido fijado el anticuerpo monoclonal 5910 de captura diluido al 1/50 o al 1/100.
- La concentración de antígeno ACE, habiendo sido la mejor detectada, corresponde a un suero del paciente diluido al 1/100 ya sea a 6 UI/ml (próximo a la tasa considerada como « normal »: < 5UI/ml) y cuando la dilución del anticuerpo monoclonal 5909 de detección está al 1/500.
- La utilización de los soportes plásticos permite validar la especificidad y la sensibilidad de los procesos de inmunocaptura sobre varilla metálica provista de funcionalidad según el protocolo descrito anteriormente.
- Conclusión
- Los buenos resultados obtenidos por la detección del antígeno ACE con las técnicas de inmunocaptura y de revelación *in Vitro*, validan la evaluación de los dispositivos « varillas provistas de funcionalidad » que permiten la captura *in vivo* del antígeno ACE seguida de una revelación *ex vivo*.

EJEMPLO 5: IDENTIFICACION DE LA EXPRESION DEL MARCADOR ACE EN UN TUMOR DEL SENO POR EJEMPLO BAJO CONTROL DE TECNICAS DE FORMACION DE IMAGEN, PARTICULARMENTE RADIOLOGICAS

5 Según el protocolo descrito en la solicitud PCT WO 03/006948, en una primera etapa, es absorbida una capa de alcanotiol sobre uno de los extremos de guías metálicas basadas en Nitinol (Euroflex) en una primera etapa. En una segunda etapa, las funciones tiol libres de esta capa permiten la formación de puentes disulfuros con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno ACE.

La guía metálica obtenida es entonces introducida en una aguja de biopsia adaptada con vistas a su utilización en el animal o en el ser humano.

10 Un examen anatomopatológico extemporáneo es realizado con la ayuda de ese dispositivo sobre una pieza operatoria (tumor mamario), a continuación de su retirada de un paciente que sufre un cáncer de seno. Alternativamente, cuando se reúnen las condiciones éticas médicas, se realiza una micro-incisión al nivel del seno bajo anestesia local o general en una paciente que sufre un cáncer de seno. La aguja en la que se inserta la guía metálica, acoplada al anticuerpo dirigido contra el antígeno ACE, es introducida en el tumor siguiendo su progresión por formación de imágenes, y principalmente por ecografía.

15 El citado sistema de guiado micro-invasivo permite entonces sacar el extremo de la guía metálica acoplado al anticuerpo dirigido contra el antígeno ACE. El extremo de la guía metálica se introduce a continuación en el tumor (por perforación) a una profundidad del orden de algunos milímetros. Después de un corto tiempo de espera, del orden de una decena de minutos, que permite la inmunocaptura del antígeno ACE eventualmente expresado por el tumor, se retira el dispositivo.

20 La micro-extracción se limita a una inmunocaptura del analito *in vivo* y no precisa de biopsia.

Finalmente, se retira el dispositivo y se realiza a continuación una dosificación ELISA del marcador ACE sobre el extremo del dispositivo con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el antígeno ACE que se diferencia del anticuerpo de captura por su constante de afinidad frente al antígeno ACE y por los epitopes reconocidos, y que está acoplado a la biotina.

25 La revelación de la actividad enzimática con la ayuda de un complejo estreptavidina-peroxidasa permite concluir en la expresión del marcador ACE por el tumor y modular en consecuencia la terapia a utilizar para tratar del mejor modo la paciente.

EJEMPLO 6: CANCER CUTANEO

30 Según el protocolo descrito en la solicitud PCT WO 03/006948, una capa de alcanotiol ha sido absorbida sobre el extremo de una guía metálica a base de Nitinol (Euroflex) en una primera etapa. En una segunda etapa, las funciones tioles libres de esta capa han permitido la formación de puentes disulfuros con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el marcador FAP (Fibroblast-activation protein; RETTIG et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 85, p: 3110, 1988).

35 La guía metálica obtenida es entonces introducida al nivel de un tumor cutáneo en un animal o en el hombre cuando se reúnen las condiciones éticas médicas, o incluso al nivel de un tumor cutáneo en un paciente que sufre un cáncer de piel después de su ablación para un examen anatomopatológico clásico o extemporáneo.

La micro-extracción se limita a una inmunocaptura *in vivo* y no necesita todavía la biopsia específica.

40 Finalmente, el dispositivo es retirado y es realizada una dosificación ELISA del marcador FAP sobre el extremo del dispositivo con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el marcador FAP acoplado a la peroxidasa.

La revelación de la actividad peroxidasa permite concluir a la expresión del marcador FAP por el tumor y modular en consecuencia la terapia a utilizar para tratar del mejor modo al paciente.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo de análisis, que comprende un sistema de investigación micro-invasivo y/o de micro-extracción de un sustrato, estando el citado sistema constituido por al menos una guía metálica que comprende:
 - 5 - un extremo **Ea** de la citada guía metálica cuya superficie está estructurada de manera que define, en la citada superficie, al menos una serie de pozos a los cuales esta directamente acoplada al menos una agrupación reactiva específica del citado sustrato, siendo perforante el citado extremo **Ea**, y
 - otro extremo **Em** de la citada guía metálica, destinado a la maniobra de la citada guía metálica; estando el dispositivo **caracterizado porque** dicha agrupación está dispuesta en los citados pozos.
- 10 2. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además un sistema de protección retirable al nivel del extremo **Ea**.
3. Dispositivo según la reivindicación 2, en el cual el citado sistema de protección retirable es un catéter flexible.
- 15 4. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además un instrumento médico que posee un ánima o luz interna en la cual puede deslizar la citada al menos una guía metálica.
5. Dispositivo según la reivindicación 4, en el cual dicho instrumento médico está elegido del grupo que comprende una aguja de punción transparietal, y/o un endoscopio, comprendiendo un sistema de navegación endovascular.
- 20 6. Dispositivo según la reivindicación 5, en el cual la citada aguja de punción transparietal es una guja de punción transcutánea o transmucosa.
7. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el cual la citada al menos una guía metálica está elegida del grupo que comprende una o varias varillas metálicas macizas flexibles y/o una o varias varillas metálicas huecas rígidas, que tienen un diámetro comprendido entre 0,3 y 3,5 mm y una longitud comprendida entre 5×10^{-2} y 2 m.
- 25 8. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la citada al menos una guía metálica está asociada, en al menos una parte de su longitud, a un sistema de visualización.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, en el que el sistema de visualización es una fibra óptica.
- 30 10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual la citada al menos una guía metálica está constituida, en su totalidad o en parte, por una aleación metálica elegida del grupo que comprende aceros inoxidables, aleaciones a base de titanio, de níquel, de cobalto o de una mezcla de estos.
11. Dispositivo según la reivindicación 10, en el cual la citada guía metálica está constituida, en su totalidad o en parte, por una aleación de titanio y de níquel.
- 35 12. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el cual la citada al menos una guía metálica está recubierta, a excepción del extremo **Ea**, de una capa polímera protectora que tiene un espesor comprendido entre 2×10^{-3} y $1 \mu\text{m}$.
13. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el cual la citada al menos una agrupación reactiva es específica de un sustrato o antígeno específico del cáncer, de una inflamación, de una infección o de un rechazo de injerto.
- 40 14. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el cual dicha al menos una agrupación reactiva específica de un sustrato es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo elegido del grupo constituido por fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv.
15. Utilización de un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, para la fabricación de un útil destinado al diagnóstico del cáncer, de una inflamación, de una infección o de un rechazo de injerto.
- 45 16. Utilización según la reivindicación 15, en la cual el citado útil comprende al menos una guía metálica insertada en un catéter flexible insertado en un endoscopio, y esta destinado al diagnóstico del cáncer, de una inflamación, de una infección o de un rechazo de injerto.

17. Utilización según la reivindicación 15, en la cual el citado útil comprende al menos una guía metálica constituida por una guja de punción transparietal e insertada en un catéter flexible y está destinada al diagnóstico del cáncer, de una inflamación, de una infección o de un rechazo de injerto.
- 5 18. Utilización según la reivindicación 17, en la cual la citada al menos una guía metálica y el catéter flexible cooperan conjuntamente de manera que ponen en contacto el extremo **Ea** provisto de funcionalidad con el lugar de micro-análisis y/o micro-extracción.
19. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18, en la cual la vía transparietal es elegida del grupo constituido por vías transmucosa y transcutánea.
- 10 20. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19, en la cual la citada al menos una guía metálica está asociada, en al menos una parte de su longitud, a una fibra óptica.

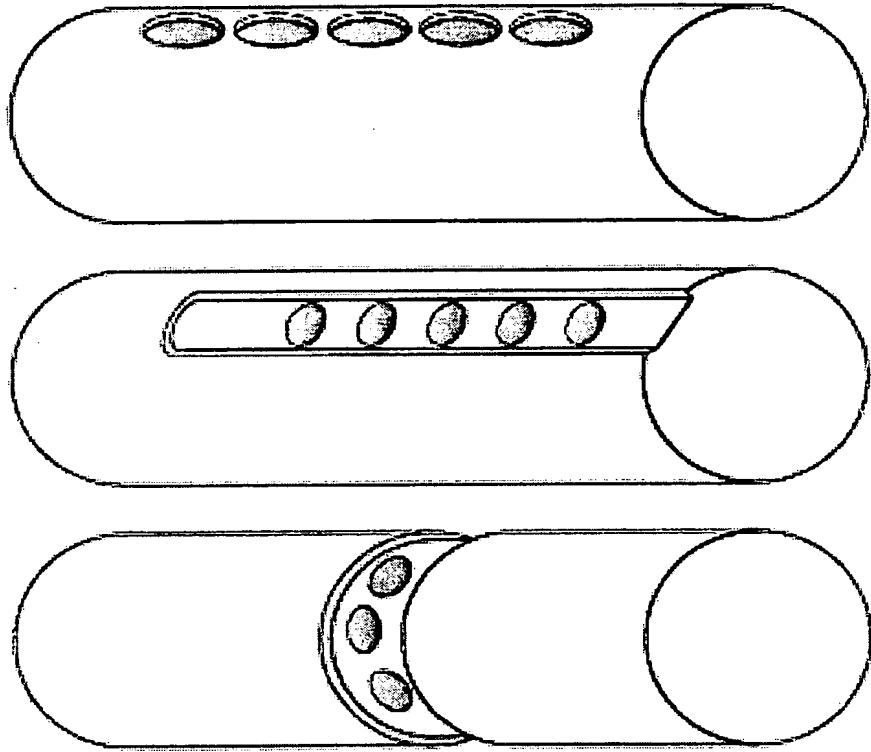


FIGURA 1

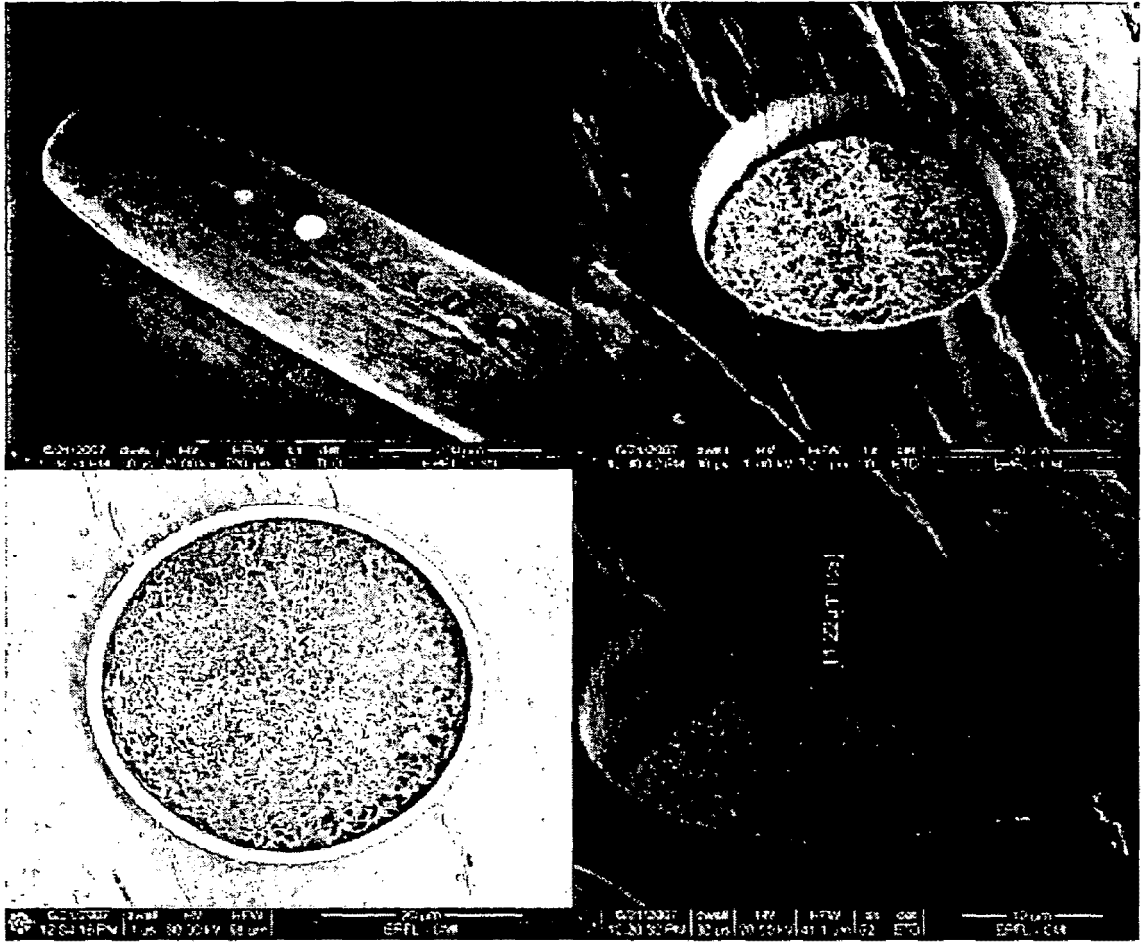


FIGURA 2

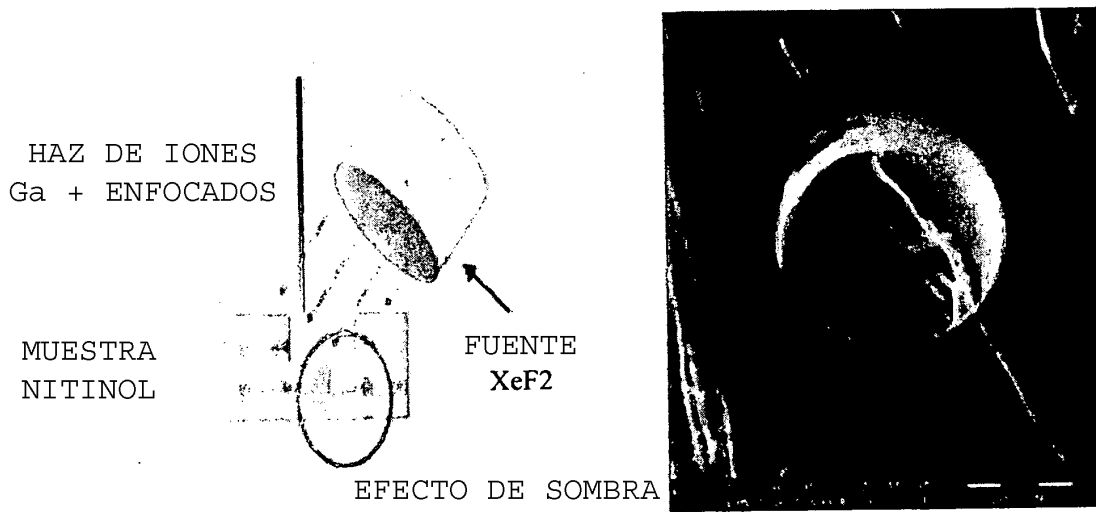


FIGURA 3

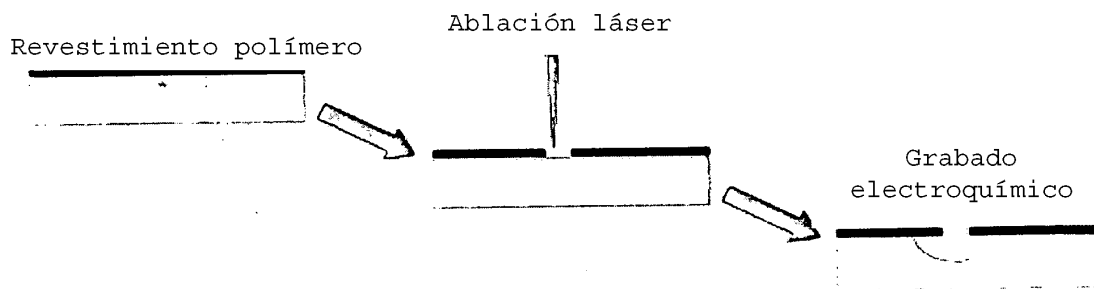


FIGURA 4

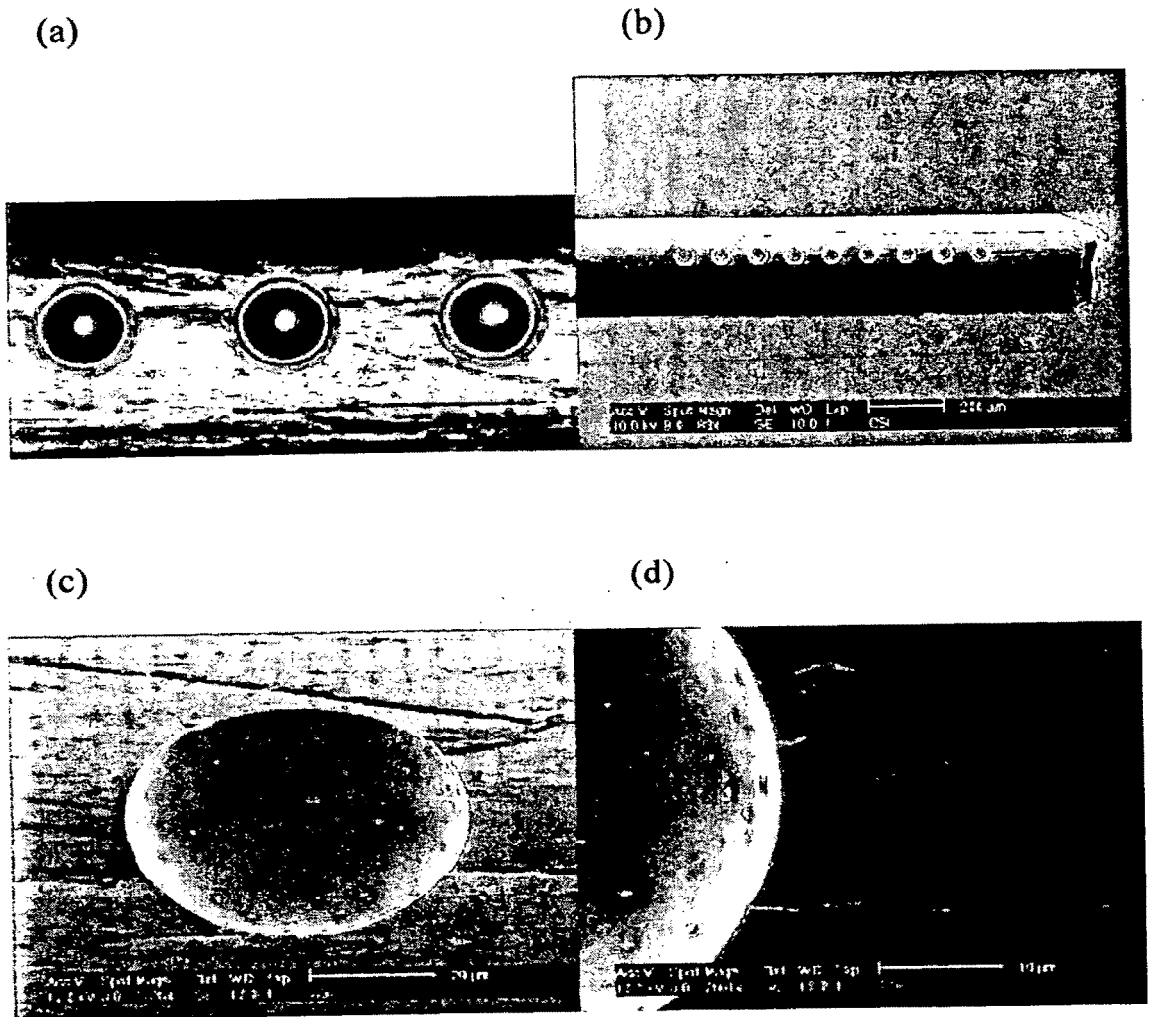


FIGURA 5

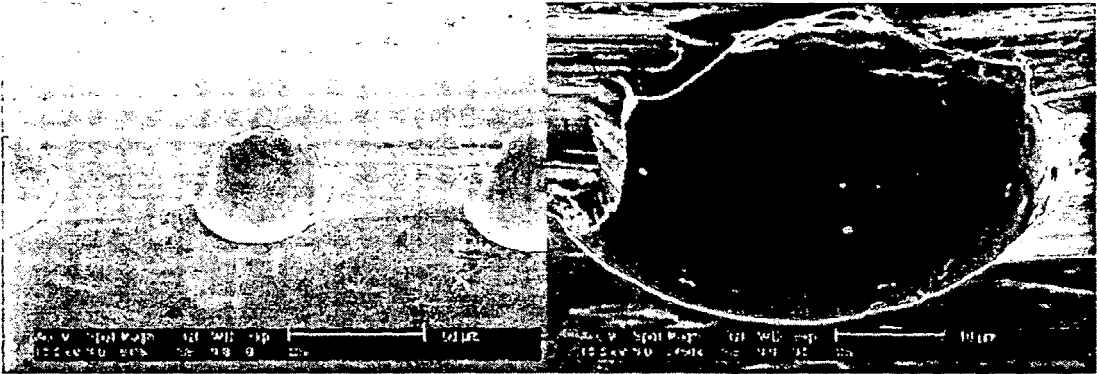


FIGURA 6

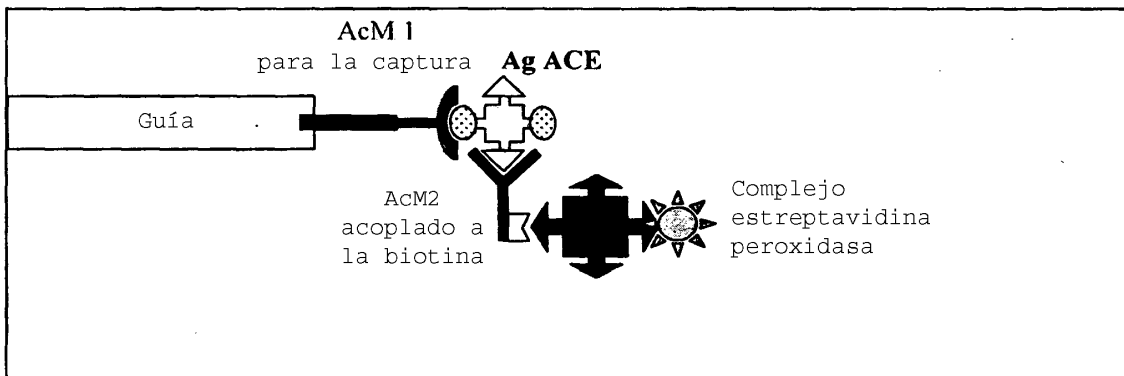


FIGURA 7

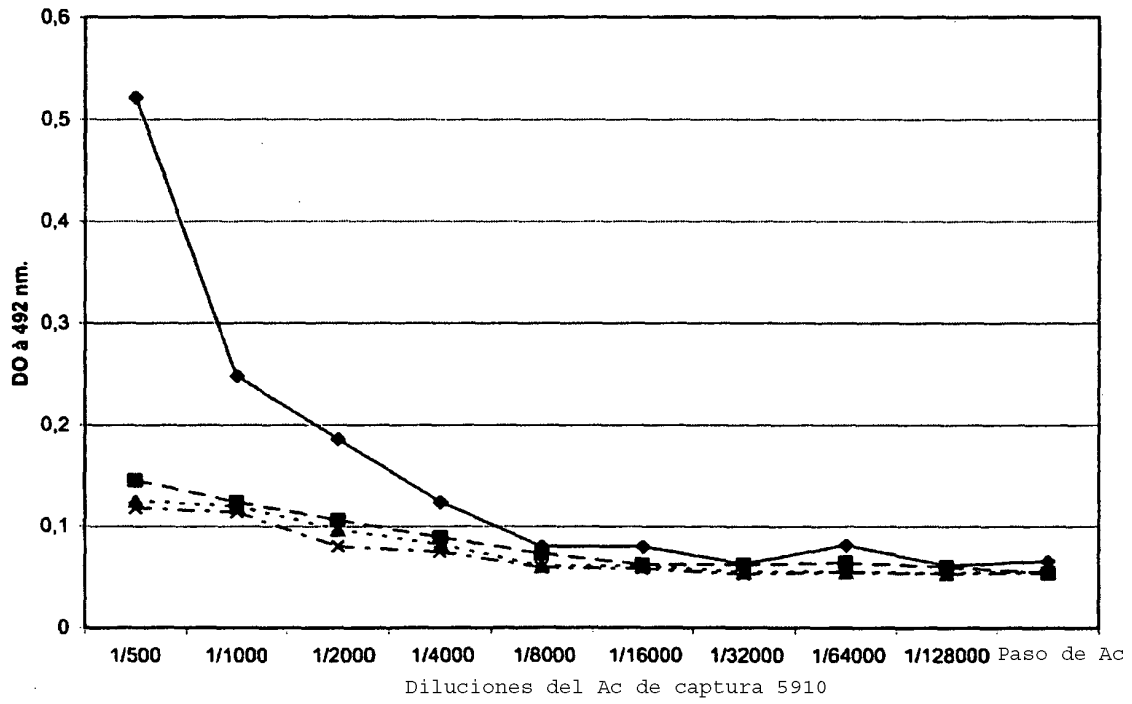


FIGURA 8

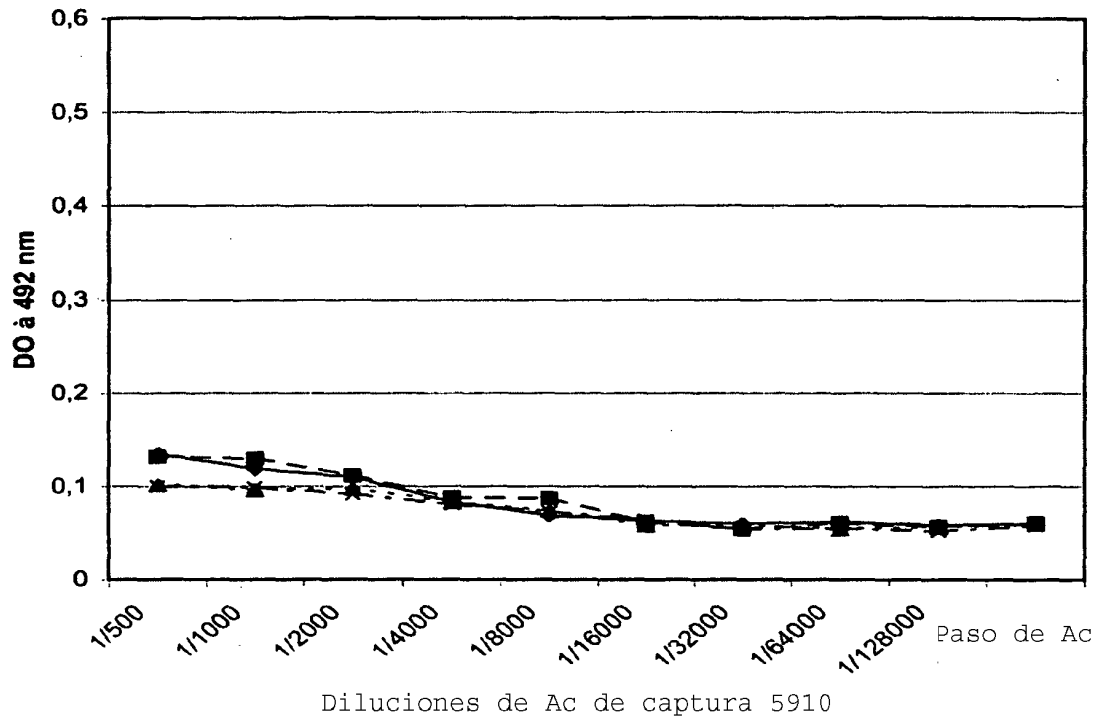


FIGURA 9

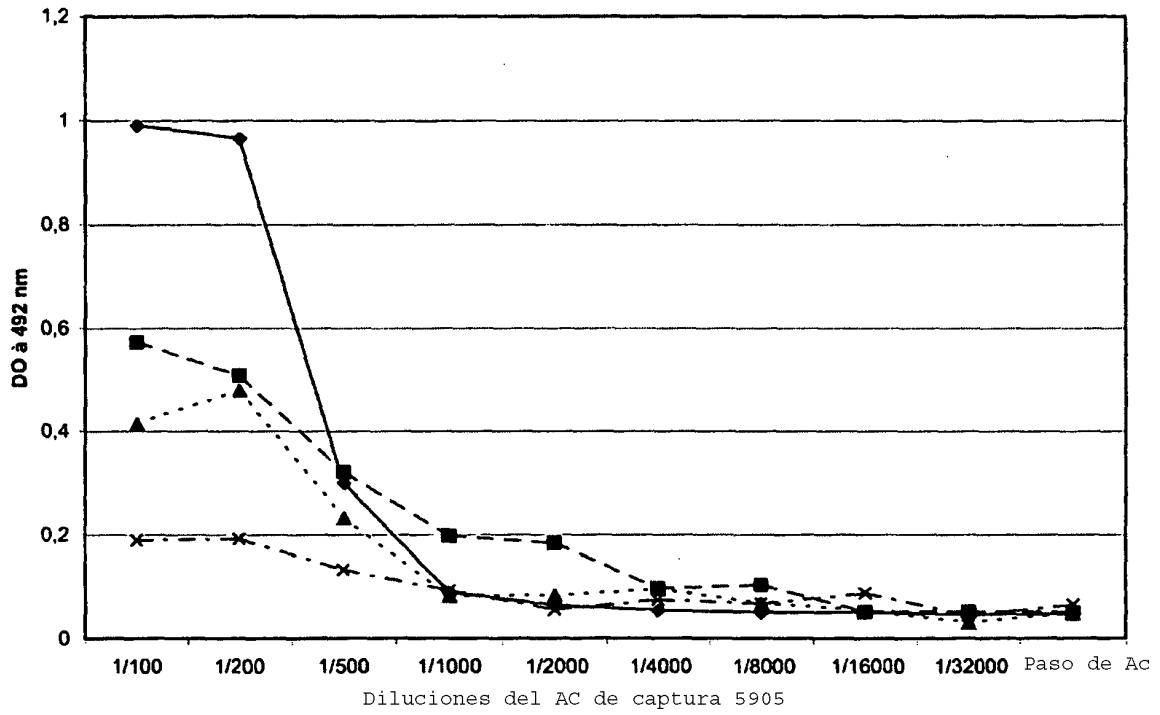


FIGURA 10

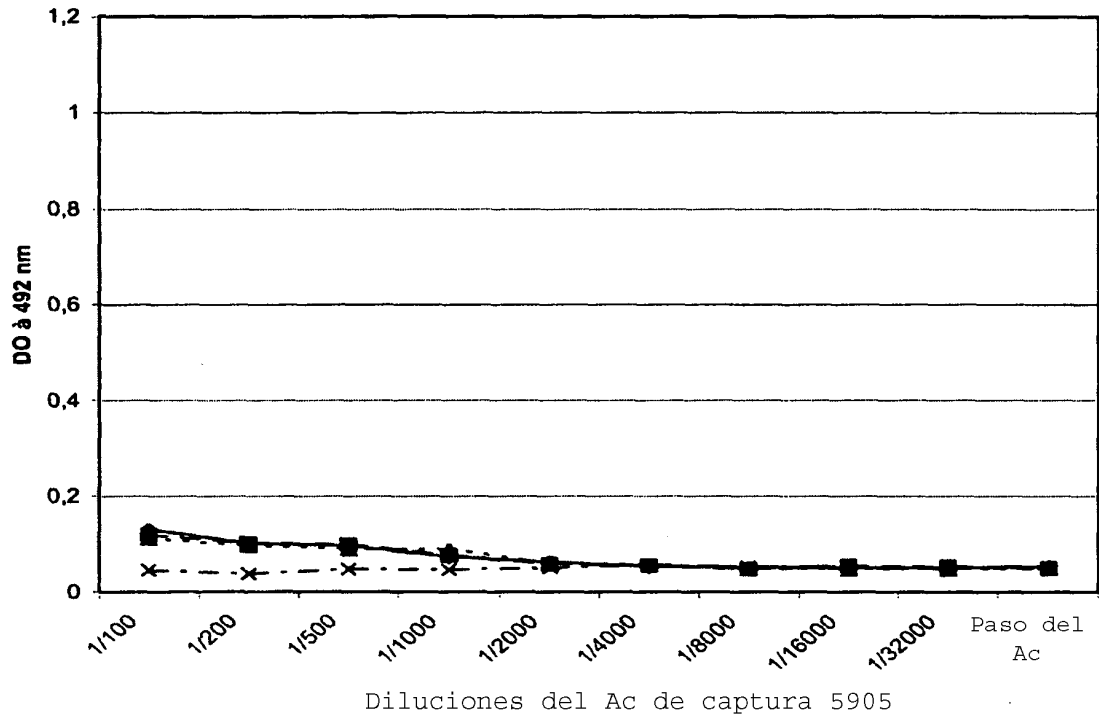


FIGURA 11

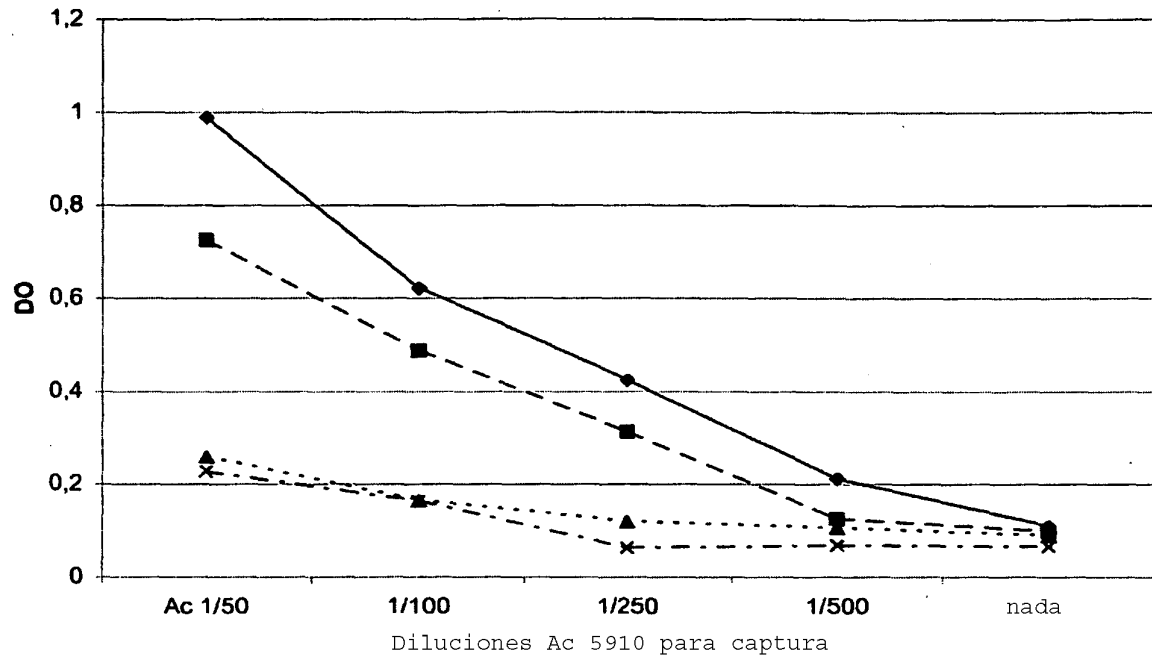


FIGURA 12