

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 605**

51 Int. Cl.:

G01N 33/487	(2006.01) A61B 10/04	(2006.01)
G01N 33/48	(2006.01) G01N 1/28	(2006.01)
A61B 10/02	(2006.01) G01N 1/40	(2006.01)
A61M 27/00	(2006.01) G01N 1/44	(2006.01)
A61N 7/02	(2006.01) A61B 17/00	(2006.01)
A61B 18/20	(2006.01)	
A61M 37/00	(2006.01)	
A61B 17/32	(2006.01)	
A61B 18/00	(2006.01)	
A61B 10/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.02.2010 E 10741763 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2396654**

54 Título: **Composición y método para diagnóstico basado en tejido**

30 Prioridad:

13.02.2009 US 152585 P

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

03.05.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**MITRAGOTRI, SAMIR;
OGURA, MAKOTO y
PALIWAL, SUMIT**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 568 605 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

Composición y método para diagnóstico basado en tejido

Antecedentes de la invención

5 La composición biomolecular de los tejidos humanos, representada por una multitud de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otras moléculas diversas, es un indicador sensible de patologías locales, tales como el cáncer, alergias y eczema, así como de varias enfermedades sistémicas, tales como enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer y diabetes. Además, la composición molecular de los tejidos también tiene información crítica sobre la exposición del cuerpo a entidades químicas y biológicas exógenas. Sin embargo, esta información no se usa normalmente en métodos de diagnóstico, debido a la falta de métodos estandarizados y fáciles para el paciente para la obtención de muestra rutinaria de los tejidos. En su lugar, el diagnóstico clínico se lleva a cabo invariablemente por observación visual y análisis histopatológico de biopsias de tejidos, que están muy limitadas debido a su naturaleza cualitativa, conduciendo a más diagnósticos erróneos y uso inadecuado. Además de ser invasivos, los métodos actuales también se quedan cortos en explicar una génesis molecular completa de las enfermedades y no distinguen entre enfermedades.

15 Los procedimientos previos que usan métodos físicos y químicos para evaluar fluidos tisulares se han centrado principalmente en la extracción de algunas moléculas de bajo peso molecular que están presentes libres en el líquido intersticial, tal como calcio y glucosa. Se ha descrito el uso de cintas adhesivas para recoger físicamente constituyentes del tejido que se encuentran en la superficie con una cinta adhesiva; sin embargo se ha mostrado que esta técnica está limitada por ineficacia, falta de un protocolo estandarizado y heterogeneidad en la obtención de muestra de tejido.

Breve resumen de la invención

La presente invención describe un método y una composición para licuar muestras de tejidos. Los sistemas y dispositivos descritos no son parte de la presente invención.

25 Las muestras licuadas que comprenden constituyentes tisulares son útiles para proporcionar la obtención de muestra de tejido rápida, así como la detección cualitativa y/o cuantitativa de analitos que pueden ser parte de constituyentes de tejidos (p. ej., varios tipos de biomoléculas, fármacos y microbios). La determinación de la composición tisular se puede usar en una variedad de aplicaciones, que incluyen el diagnóstico o pronóstico de enfermedades, evaluación de la biodisponibilidad de productos terapéuticos en diferentes tejidos después de la administración de fármacos, detección forense de drogas, evaluación de cambios en el microentorno del tejido después de exposición a un agente dañino, descontaminación de tejidos y otras aplicaciones diferentes.

35 La presente invención proporciona métodos para generar una muestra de tejido de piel licuada de un sujeto, vivo o fallecido. El dispositivo y el método implican aplicar energía y un medio que favorece la licuación a un tejido de interés de un sujeto, produciendo la aplicación una muestra de tejido licuado, y recoger la muestra de tejido licuada. En algunas realizaciones, se lleva a cabo un análisis de la presencia o ausencia de al menos un analito en la muestra de tejido licuada, en donde el análisis facilita el diagnóstico de una afección de interés. En algunas realizaciones, el análisis implica generar un perfil de analitos de la muestra de tejido licuada y comparar el perfil de analitos con un perfil de analitos de referencia, en donde la comparación facilita el diagnóstico de una afección de interés.

40 En algunas realizaciones, el fin de dicha licuación de tejidos es eliminar o descontaminar el tejido de sustancias indeseadas. Ejemplos no limitantes de dichas sustancias indeseadas incluyen compuestos químicos, contaminantes ambientales, toxinas biológicas y en general sustancias que se consideran tóxicas o peligrosas para el cuerpo. En algunas realizaciones, dicho método de descontaminación se lleva a cabo moviendo continuamente el dispositivo de licuación de tejido sobre el tejido de interés hasta lograr eliminar las sustancias indeseadas a un nivel preferido.

El agente que favorece la licuación de la invención se define en la reivindicación 1.

45 En algunas realizaciones, la energía se aplica en forma de ultrasonidos, mecánica, óptica, térmica o eléctrica. En algunas realizaciones, la energía mecánica se aplica mediante un material abrasivo. En algunas realizaciones, la energía térmica se aplica en forma de energía de radiofrecuencia. En algunas realizaciones, la energía óptica se aplica en forma de un láser.

50 En algunas realizaciones, la muestra de tejido licuado se genera para cada uno de un tejido sano del sujeto y un tejido de interés del sujeto que se sospecha enfermo, y el análisis comprende comparar los resultados analíticos de la muestra de tejido sano con los resultados analíticos de la muestra de tejido que se sospecha enfermo, en donde la comparación facilita el diagnóstico de una afección de interés. En algunas realizaciones, la muestra de tejido licuada se genera para múltiples sitios del tejido y el análisis comprende comparar resultados analíticos de los múltiples sitios del tejido, en donde dicha comparación facilita el diagnóstico de una afección de interés. En algunas realizaciones, la muestra de tejido licuada se obtiene de múltiples sitios del tejido, y las muestras se combinan para hacer un diagnóstico.

En algunas realizaciones, la muestra de tejido licuada se obtiene por aspiración. En determinadas realizaciones, la obtención es por retención del agente de licuación en un bastidor puesto en contacto con el tejido. En determinadas realizaciones, la obtención es por transferencia mecanizada de la muestra de tejido licuada a un bastidor situado en el dispositivo.

- 5 En algunas realizaciones, la muestra de tejido licuada se mezcla con una sustancia que ayuda a la licuación adicional y a la estabilización de analitos de interés para el almacenamiento o transporte. En algunas realizaciones, la muestra de tejido transferida desde este recipiente de muestra se mezcla con las sustancias que están prealmacenadas en un recipiente. Los ejemplos incluyen un estabilizante de proteínas tal como un inhibidor de proteasa, un estabilizante de ácido nucleico tal como EDTA, fenol, proteinasa no específica, un inhibidor de RNasa y un inhibidor de DNasa, un agente desespumante y tensioactivos tales como Triton X-100, dodecilsulfato sódico y DMSO, y partículas abrasivas que comprenden sílice u óxido de aluminio.

- 10 En determinadas realizaciones, el dispositivo evalúa el tejido de interés antes, durante o después del procedimiento de licuación. En determinadas realizaciones, la evaluación se lleva a cabo por medios electroquímicos, bioquímicos u ópticos. En algunas realizaciones, la evaluación implica la medición de la conductividad eléctrica del tejido. En una realización de ejemplo, la conductividad eléctrica se mide por un medio que aplica una señal eléctrica AC a través del tejido de interés. Dicha señal eléctrica tiene un voltaje entre 0,1 mM y 10 V y frecuencia entre 1 Hz y 100 Hz.

- 15 En algunas realizaciones, el dispositivo implica detectar algunos constituyentes tisulares en la muestra de tejido licuada antes del análisis de un analito de interés, tal como un marcador de enfermedad. En algunas realizaciones, la detección es por medios electroquímicos, bioquímicos u ópticos. En algunas realizaciones, el medio electroquímico de detección es un electrodo selectivo de iones. En algunas realizaciones, el medio óptico de detección es midiendo el coeficiente de absorción o dispersión de una solución líquida.

- 20 En algunas realizaciones, la energía se aplica a un tejido en forma de ultrasonidos con un índice mecánico entre 0,1 y 50. En determinadas realizaciones, la energía se aplica poniendo en contacto el tejido con una superficie abrasiva que se mueve. En determinadas realizaciones, la energía se aplica al tejido poniendo en contacto el tejido con un dispositivo de cepillado que se mueve, que comprende una pluralidad de cerdas. En determinadas realizaciones, la energía se aplica al tejido por inserción mecánica de un parche que lleva una pluralidad de microagujas en el tejido; y posterior inyección de medio de licuación a través de las microagujas en el tejido. En algunas realizaciones, se aplica energía adicional moviendo dicho parche de microagujas después de su inserción en el tejido. En determinadas realizaciones, la energía se aplica al tejido por agitación mecanizada del agente de licuación. En determinadas realizaciones, la energía se aplica al tejido poniendo en contacto el tejido con un chorro de medio que favorece la licuación a alta velocidad, que también puede contener partículas abrasivas en diferentes realizaciones.

En el método de la presente invención, el tejido comprende piel.

- 25 En algunas realizaciones, el analito comprende una molécula pequeña, un fármaco o metabolito del mismo, un polipéptido, un lípido, un ácido nucleico o un microbio. En determinadas realizaciones, el analito comprende un anticuerpo, una citoquina, una droga ilegal, o un biomarcador de cáncer.

En algunas realizaciones, la muestra de tejido licuada se mantiene en un recipiente, y se genera el perfil de analitos integrando el recipiente con líquido con uno o más dispositivos analíticos. En determinadas realizaciones, el dispositivo de licuación de tejido contiene un medio para medir la concentración de un analito calibrador para proporcionar un medio para calibrar el análisis del analito.

- 30 En algunas realizaciones, el dispositivo implica el diagnóstico de una enfermedad alérgica en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar en la muestra de tejido licuada la presencia o ausencia de anticuerpos IgE e IgG, citoquinas tales como IL4, IL5, IL10, IL-12, IL13, IL-16, GM-CSF, RANTES, MCP-4, CTACK/CCL27, IFN-g, TNFa, CD23, CD-40, Eotaxina-2, y TARC, en donde el análisis facilita el diagnóstico de la enfermedad alérgica en el sujeto.

- 35 En algunas realizaciones, el dispositivo implica el diagnóstico de cáncer en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar en la muestra de tejido licuada la presencia o ausencia de uno o más marcadores de cáncer, en donde el análisis facilita el diagnóstico de cáncer en el sujeto. En determinadas realizaciones, el tejido de interés es de mama, colon, próstata, piel, testículo, intestino o boca.

- 40 En algunas realizaciones, el dispositivo implica el diagnóstico de una enfermedad cardiaca en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar en la muestra de tejido licuada la presencia o ausencia de uno o más de colesterol, triglicéridos, lipoproteínas, ácidos grasos libres y ceramidas, en donde el análisis facilita el diagnóstico de la enfermedad cardiaca en el sujeto.

- 45 En algunas realizaciones, el dispositivo implica la detección de la presencia de una droga ilegal, o un metabolito de la misma, en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para analizar en la muestra de tejido licuada la presencia o ausencia de una droga ilegal, o metabolitos de la misma, en donde el análisis proporciona la detección de drogas ilegales en el sujeto.

En algunas realizaciones, el dispositivo implica detectar un microorganismo en un sujeto, y el dispositivo comprende medios para aplicar energía y un medio de licuación de un tejido de interés en un sujeto y analizar en el medio de licuación la presencia o ausencia de un microorganismo, en donde el análisis proporciona la detección de la presencia o ausencia de un microorganismo.

- 5 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para licuar tejido de la piel de un sujeto para facilitar el paso de un fármaco a través de o al tejido. El método descrito se puede aplicar no solo a la obtención de constituyentes de tejido sino también al suministro de fármaco. El método implica aplicar energía y un medio de licuación a un tejido de interés de un sujeto, y suministrar un fármaco a través de o al sitio del tejido que se va a licuar. La ventaja de usar la presente invención es, 1) proporcionar flujos mayores de fármacos a un tejido, y 2) permitir mayor control de los flujos a un tejido. Fármacos que simplemente no pasarían a través de tejidos tales como la piel, son forzados a través de los tejidos cuando se aplica el método.

- 15 Esto también ofrece un método para suministrar uno o más fármacos a través del tejido que se va a licuar al sistema circulatorio, lo que evita la degradación en el tracto gastrointestinal y el metabolismo rápido por el hígado que sufren los fármacos que se administran de forma rutinaria por vía oral o por inyección. De esta forma se pueden suministrar fármacos al tejido de interés, limitando de esta forma efectos secundarios en los tejidos sanos. El método también puede ser aplicable para potenciar el transporte a membranas celulares.

El dispositivo usado en el método de la presente invención consiste en los siguientes componentes principales: 1) un generador de energía; 2) un medio que favorece la licuación; 3) un depósito para mantener el fármaco que se va a suministrar y/o recoger la muestra de tejido licuada.

- 20 El fármaco que se va a administrar se puede añadir al medio de licuación antes o durante el procedimiento de licuación del tejido. En una realización alternativa, la aplicación de energía es en combinación con el medio de licuación que no contiene un fármaco que se puede usar para licuar un tejido, y posteriormente se puede aplicar un fármaco en un vehículo adecuado tal como un parche en un sitio del tejido que se va a licuar.

- 25 El transporte del fármaco al tejido se puede potenciar más por la aplicación simultánea o posterior de una fuerza directora secundaria tal como potenciadores químicos de la permeabilidad o transporte, convección, gradiente de presión osmótica, gradiente de concentración, iontoforesis, electroporación, campo magnético, ultrasonidos o presión mecánica. La fuerza directora se puede aplicar de forma continua a lo largo de un periodo de tiempo o a intervalos durante el periodo de licuación.

- 30 En algunas realizaciones, el tejido al que se va a administrar comprende un órgano, así como superficies biológicas. En determinadas realizaciones, las superficies biológicas comprenden una membrana biológica y membrana celular. En determinadas realizaciones, la membrana biológica comprende piel o una membrana mucosa. En determinadas realizaciones, la membrana biológica comprende una membrana bucal, ojo, vagina, colon o intestino. En algunas realizaciones, el tejido comprende un tejido enfermo.

- 35 En una realización, se proporciona un dispositivo que se puede usar en un tejido para obtener una muestra licuada, que comprende una fuente de energía operativamente acoplada al tejido, y una cámara, operativamente acoplada a dicho tejido, capaz de suministrar medio que favorece la licuación a y/u obtener dicha muestra licuada de dicho tejido.

En otra realización, el dispositivo se puede usar en un tejido que es una parte de un organismo vivo; y el tejido se puede extirpar del organismo antes del diagnóstico.

- 40 En otra realización, el dispositivo de la realización 1, en donde la muestra de tejido es licuada, se transfiere a un ensayo para el control de la presencia o ausencia de al menos un analito.

En otra realización más, la cámara del dispositivo puede ser un montaje de esponja-fuelle donde la esponja es capaz de almacenar dicho medio que favorece la licuación y/o la muestra de tejido licuada.

- 45 En otra realización, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía operativamente acoplada al tejido, y una cámara, operativamente acoplada a dicho tejido, capaz de suministrar medio que favorece la licuación a y/o recoger dicha muestra licuada de dicho tejido; también comprende un tubo/aguja, conectado a dicha cámara, capaz de suministrar el medio que favorece la licuación a y/o aspirar la muestra de tejido licuada del tejido.

- 50 En otra realización más, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía operativamente acoplada al tejido, y una cámara, operativamente acoplada a dicho tejido, capaz de suministrar medio que favorece la licuación a y/o recoger dicha muestra licuada de dicho tejido; también comprende un recipiente de muestra, operativamente conectado a dicha cámara, capaz de almacenar la muestra de tejido licuada aspirada que contiene analitos, o transferir dicha muestra de tejido licuada aspirada a una cámara auxiliar; en donde la cámara se usa solo para suministrar el medio que favorece la licuación a la cámara.

- 55 En otra realización, un recipiente presurizado y/o recipiente de vacío es parte del dispositivo, que facilita la transferencia de dicho medio que favorece la licuación y/o muestra de tejido licuado.

- 5 En una realización, la energía emitida de la fuente de energía en el dispositivo es en forma de energía de ultrasonidos, mecánica, óptica, térmica o eléctrica. En una realización particular, la energía mecánica se aplica al tejido mediante un material abrasivo, vacío, presión o fuerza de cizalladura. En otra realización, la energía térmica se aplica al tejido en forma de energía de radiofrecuencia. En otra realización, la energía óptica se aplica al tejido en forma de un láser.
- 10 En otra realización más, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía operativamente acoplada al tejido, y una cámara, operativamente acoplada a dicho tejido, capaz de suministrar medio que favorece la licuación a y/o recoger dicha muestra licuada de dicho tejido, que además comprende un recipiente de muestra, operativamente conectado a dicha cámara, capaz de almacenar la muestra de tejido licuado aspirada que contiene analitos, o transferir dicha muestra de tejido licuada aspirada a una cámara auxiliar, en donde la cámara se usa solo para suministrar el medio que favorece la licuación a la cámara.
- 15 En otra realización más, se proporciona un dispositivo que comprende una fuente de energía operativamente acoplada al tejido, y una cámara, operativamente acoplada a dicho tejido, capaz de suministrar medio que favorece la licuación a y/o recoger dicha muestra licuada de dicho tejido, en donde la fuente de energía comprende una almohadilla conectada a un eje.
- En una realización más particular, el eje tiene una unidad de detección de la presión, que mantiene un perfil de presión predeterminado sobre el tejido tras el contacto.
- En otra realización, la almohadilla se selecciona del grupo que consiste en una superficie abrasiva y un parque que comprende una pluralidad de microagujas.
- 20 En otra realización más, el dispositivo comprende además un émbolo, operativamente conectado a la parte superior de la cámara.
- En otra realización, el dispositivo está dividido en una unidad superior e inferior, y en donde la unidad inferior se puede separar de dicha unidad superior; en donde la unidad superior comprende la fuente de energía y la unidad inferior comprende la cámara.
- 25 En otra realización más, el dispositivo comprende además una unidad analítica operativamente conectada a la cámara, y donde la unidad analítica puede llevar a cabo el control temporal de la muestra de tejido por medios electroquímicos, bioquímicos u ópticos; o la unidad analítica es capaz de analizar los analitos dentro de dicha muestra de tejido licuado.
- 30 En otra realización, el dispositivo está conectado a una sonda de diagnóstico o un catéter; en donde la sonda de diagnóstico se selecciona de un grupo que consiste en un endoscopio, colonoscopio y laparoscopio.
- En otra realización más, el uso del dispositivo produce la licuación in situ de la muestra de tejido.
- En otra realización, el dispositivo contiene un medio que favorece la licuación que puede conservar y potenciar y detección de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, que comprende: 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato (DPS) y éter dodecílico de polietilenglicol (Brij 30) disueltos en una disolución tamponada; y donde la concentración del 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato y el éter dodecílico de polietilenglicol (Brij 30) es entre 0,01 -10% (p/v); y donde el 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato y el éter dodecílico de polietilenglicol están presentes en una relación 50:50.
- 35 En otra realización más, el medio que favorece la licuación en el dispositivo está tamponado en una disolución que comprende disolución salina tamponada con fosfato, disolución salina tamponada con Tris, Tris-HCl o EDTA.
- 40 En otra realización, el medio que favorece la licuación en el dispositivo comprende un tensioactivo no iónico seleccionad de un tensioactivo de la serie Brij, un tensioactivo Triton-X y un tensioactivo de sorbitán; un tensioactivo aniónico o de ion híbrido; y un disolvente hidrófilo; en donde el medio tiene una concentración total de tensioactivos de aproximadamente 0,01%-10% (p/v).
- 45 Estas y otras características de la invención se harán evidentes para el experto en la técnica al leer los detalles del sistema, método y dispositivo para el diagnóstico basado en tejido como se describirá con más detalle a continuación.

Breve descripción de los dibujos

- 50 La invención se entiende mejor a partir de la siguiente descripción detallada cuando se lee junto con los dibujos que la acompañan. Hay que destacar que, de acuerdo con la práctica común, las diferentes características de los dibujos no están a escala. Al contrario, las dimensiones de las diferentes características están aumentadas o reducidas arbitrariamente por claridad. Están incluidas en los dibujos las siguientes figuras:

La figura 1 (paneles a-g) es una colección de dibujos de cortes transversales que ilustran la estructura, componentes y funcionamiento de diferentes dispositivos de licuación de tejido basados en energía abrasiva. Los paneles a-c y

paneles a-g muestran el trabajo secuencial de dos dispositivos de licuación separados. El panel d es una representación esquemática de un eje motorizado sensible a la presión que lleva una cabeza abrasiva.

La figura 2 (paneles a-b) es una colección de dibujos de cortes transversales de dispositivos de licuación de tejidos móviles para la toma de muestra continua de una zona grande de tejidos.

- 5 La figura 3 (paneles a-c) es una colección de dibujos de cortes transversales que ilustran la estructura y los componentes de diferentes dispositivos de licuación de tejido basados en movimiento abrasivo lineal. El panel c es una representación esquemática de un eje de soporte sensible a la presión que lleva una rueda dentada.

La figura 4 (panel a-g) es una colección de dibujos de cortes transversales que ilustran varios tipos de cabezas abrasivas.

- 10 La figura 5 (paneles a-d) es una colección de dibujos de cortes transversales del dispositivo y esquemas para medir la conductividad eléctrica del tejido.

La figura 6 (paneles a-g) es una colección de dibujos de cortes transversales que ilustran la estructura, componentes y funcionamiento de diferentes dispositivos de licuación de tejido basados en microagujas.

- 15 La figura 7 (paneles a-e) es una colección de dibujos de cortes transversales de un dispositivo de licuación de tejido basado en energía abrasiva de ejemplo. El panel muestra diferentes componentes de ensamblaje del dispositivo. Los paneles b-d muestran etapas de trabajo secuenciales del dispositivo que incluyen la transferencia del medio de licuación para ponerlo en contacto con el tejido (paneles b-c), generación de muestra por licuación (panel c), y recogida de la muestra en un recipiente (panel d). El panel e muestra la recuperación después de licuación del recipiente de muestra del dispositivo.

- 20 La figura 8 (paneles a-d) es una colección de dibujos de cortes transversales que ilustran las etapas de trabajo secuenciales de un dispositivo de licuación de tejido basado en microagujas de ejemplo: transferencia del medio de licuación que se va a poner en contacto con el tejido (paneles a-b); generación de muestra por licuación (panel c); y recogida de la muestra en un recipiente (panel d).

- 25 La figura 9 (paneles a-d) es una colección de dibujos que ilustran un recipiente de obtención de muestra. Los paneles a-d muestran las etapas de trabajo secuenciales para el transporte y/o análisis de las muestras generadas. El panel a muestra sustratos que se unen selectivamente a analitos de interés, que recubren la superficie interior del recipiente. Los analitos en las muestras de tejido licuadas son capturados selectivamente por los sustratos del recubrimiento (panel b). Después de suficiente incubación de la muestra de tejido, la muestra se descarta mientras que los analitos se mantienen en el recipiente (panel c). Los analitos son eluidos mediante un tampón para el posterior análisis (panel d).

- 30 La figura 10 (paneles a-c) es una colección de dibujos que ilustran la metodología de cribado para identificar formulaciones tensioactivas únicas de los LPM. El panel a clasifica 150 formulaciones de tensioactivos según su capacidad para conservar la bioactividad de proteínas. El panel b clasifica las mejores formulaciones del panel a según su potencial de solubilización de tejido. El panel c compara el mejor LPM de todo el cribado - DPS-Brij30 al 0,5% (p/v) con otros tensioactivos convencionales en su potencial para obtener muestras de proteínas funcionales de tejido de la piel.

- 35 La figura 11 (panel a-b) es una colección de dibujos que ilustran la conservación asistida por el LPM de bioactividades de diferentes proteínas (IgE - panel a; IgE, LDH y β -gal - panel b), bajo tensión mecánica de exposición a ultrasonidos.

- 40 La figura 12 (panel a-c) es una colección de dibujos que ilustran la capacidad de la exposición a ultrasonidos en presencia del LPM (disolución salina de DPS-B30 al 0,5% (p/v)) para obtener muestras de una variedad de biomarcadores de enfermedades funcionales (IgE - panel a; colesterol - panel b; bacterias - panel c) de tejido de piel.

La figura 13 es una gráfica que ilustra el efecto de tampones en LPM en la compatibilidad con la PCR cuantitativa.

- 45 La figura 14 es una gráfica que ilustra la influencia de la mezcla de tensioactivos en la compatibilidad con la PCR cuantitativa.

La figura 15 es una gráfica que ilustra el efecto de la intensidad de ultrasonidos y el tiempo de exposición en la viabilidad de *E. coli*. Las muestras se expusieron a ultrasonidos con intensidades de 1,7 W/cm² (●) y 2,4 W/cm² (■). Cada punto representa el valor medio de tres muestras independientes.

- 50 La figura 16 es una fotografía de electroforesis en gel de agarosa de ADN genómico de células de *E. coli* tratadas con ultrasonidos en diferentes condiciones en tris-HCl. Banda 1, referencia molecular; banda 2, célula no tratada; banda 3, 1,7 W/cm², 2 min; banda 4, 1,7 W/cm², 3 min; banda 5, 2,4 W/cm², 3 min.

La figura 17 (paneles a y b) es una gráfica que ilustra el número de bacterias de muestras tomadas por técnica de ultrasonidos acoplada con tris-HCl, con hisopo y raspado con tensioactivo, medido por (a) ensayo de cultivo y (b)

PCR cuantitativa. Cada punto representa el valor medio de cinco muestras independientes.

La figura 18 es una gráfica que ilustra el efecto de añadir diferentes potenciadores de la sensibilidad en el LPM para la detección potenciada de un analito modelo, anticuerpo de IgE humana, en el mismo. Los potenciadores de la sensibilidad usados en el análisis son una mezcla de BSA al 10% p/v y Tween 20 al 0,5% p/v en disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (rombos blancos); y una mezcla de BSA al 10% p/v y Tween 20 al 0,5% p/v en disolución salina tamponada con tris (círculos negros). Antes del análisis, se diluyó cada uno de los potenciadores de la sensibilidad en una relación 1:10 con LPM que contenía analito modelo. Como control, se usaron LPM que contenía analito modelo (cuadrados blancos) y un disolvente analítico usado habitualmente que comprende una mezcla de BSA al 1% p/v y Tween 20 al 0,05% p/v en disolución salina tamponada con tris (cuadrados negros). El LPM estaba compuesto de una disolución de mezcla de NLS y Brij 30 al 1% en p/v en PBS. Las barras de error indican la desviación estándar.

La figura 19 (paneles a-b) es una colección de gráficas que ilustran el suministro de inulina a través y de aciclovir en la piel de cerdo in vitro, después de aplicación de ultrasonidos (a) o abrasión con una pluralidad de cerdas (b).

Descripción detallada de la invención

15 DEFINICIONES

“Energía” como se usa en la presente memoria significa cualquier energía adecuada que se pueda aplicar al tejido para lograr el objetivo de los métodos descritos en la presente memoria (p. ej., licuar tejidos). Los tipos de energía de ejemplo incluyen energía mecánica (p. ej., abrasión, cizalladura, vacío, presión, succión), ultrasonidos, óptica (p. ej., láser), magnética, térmica y energía eléctrica.

20 Un “analito” como se usa en la presente memoria significa cualquier biomolécula (p. ej., polipéptido, ácido nucleico, lípido y similares), fármaco (p. ej., fármacos terapéuticos, drogas, y similares), moléculas pequeñas (p. ej., factores hidratantes naturales, nicotina, y similares entendiendo que moléculas pequeñas también pueden ser fármacos), agente de guerra, contaminante ambiental (p. ej., plaguicidas, etc.), microbio (p. ej., bacteria, virus, hongo, levadura y similares) y similares, que está presente en o sobre el tejido y se puede extraer del tejido de interés (p. ej., piel, una membrana mucosa, y similares) y detectar, analizar y/o cuantificar.

25 El término “licuación” se usa para describir el procedimiento por el cual el tejido y/o constituyentes del tejido se convierten a un estado suficientemente soluble por exposición a suficiente energía y, opcionalmente, un medio que favorece la licuación, y puede implicar la conversión de al menos una parte de una estructura de tejido de interés a una forma líquida. Una muestra de tejido que se ha sometido a licuación se denomina a veces en la presente memoria una muestra “licuada”.

La expresión “medio que favorece la licuación” (LPM, por sus siglas en inglés *liquefaction-promoting medium*) se usa para describir una sustancia que facilita la solubilización de uno o más constituyentes del tejido, facilita la conversión de al menos una parte de la estructura del tejido a un líquido cuando se expone a energía, y/o facilita la conservación de la bioactividad de uno o más constituyentes del tejido solubilizados.

35 La expresión “agente que favorece la licuación” (LPA, por sus siglas en inglés *liquefaction-promoting agent*) se usa para describir un componente del medio que favorece la licuación, en particular un agente que favorece al menos la solubilización y/o conservación de bioactividad de uno o más constituyentes del tejido, y/o análisis de los posteriores ensayos de diagnóstico.

40 Un “analito de calibración” como se usa en la presente memoria significa cualquier molécula naturalmente presente en un tejido de interés en una concentración conocida, que puede servir como un analito de referencia (p. ej., como un control positivo para asegurar que se ha logrado un grado deseado de licuación).

45 Una “biomolécula” como se usa en la presente memoria significa cualquier molécula o ion que tiene un origen o función biológica. Los ejemplos no limitantes de biomoléculas incluyen proteínas (p. ej., biomarcadores de enfermedad, tales como biomarcadores de cáncer, anticuerpos: IgE, IgG, IgA, IgD o IgM, y similares), péptidos, lípidos (p. ej., colesterol, ceramidas o ácidos grasos), ácidos nucleicos (ARN y ADN), moléculas pequeñas (p. ej., glucosa, urea, creatina), fármacos moléculas pequeñas o metabolitos de los mismos, microbios, moléculas inorgánicas, elementos o iones (p. ej., hierro, Ca²⁺, K⁺, Na⁺, y similares). En algunas realizaciones, la biomolécula es distinta de la glucosa y/o distinta de un marcador del cáncer.

50 La expresión “droga” o “droga ilegal” se usan de forma intercambiable en la presente memoria para referirse a cualquier sustancia que es regulada por un gobierno (p. ej., regulada federal o estatalmente) cuya presencia en un tejido humano y/o presencia por encima de un determinado nivel en un tejido humano, es ilegal o puede ser dañina para un ser humano. Los ejemplos de drogas incluyen: cocaína, heroína, metilfenfetamina y fármacos de prescripción tomados en exceso o tomados sin prescripción (p. ej., analgésicos tales como opiáceos).

55 La expresión “agente de guerra” como se usa en la presente memoria se refiere a cualquier molécula, compuesto o composición sea de origen biológico o químico que se puede usar como un arma. Los ejemplos de agentes de

guerra incluyen gases nerviosos (p. ej., VX, sarín), fosgeno, toxinas, esporas (p. ej., ántrax) y similares.

La expresión “contaminante medioambiental” como se usa en la presente memoria incluye cualquier molécula, compuesto o composición que puede ser perjudicial para un individuo, p. ej., cuando está en concentraciones elevadas por encima de un umbral de riesgo. Los ejemplos incluyen contaminantes del agua (p. ej., fertilizantes, plaguicidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas, metales pesados, haluros), contaminantes del suelo (p. ej., fertilizantes, plaguicidas, fungicidas, insecticidas, herbicidas, metales pesados, haluros), contaminantes del aire (p. ej., NOx, SOx, gases invernadero, contaminantes orgánicos persistentes (POP), materia en partículas, polución).

El término “descontaminación” como se usa en la presente memoria incluye la eliminación de los tejidos de cualquier molécula, compuesto o composición no querida o indeseada, que puede ser perjudicial para un individuo. Los ejemplos incluyen contaminantes medioambientales (como se han definido antes), productos químicos tóxicos y toxinas biológicas.

La expresión “factor hidratante natural” (NMF, por sus siglas en inglés *natural moisturizing factor*) como se usa en la presente memoria significa cualquiera de varios tipos de moléculas pequeñas, que incluyen, pero no se limitan a aminoácidos libres, lactato y urea, que son derivados de filagrina. Los NMF se pueden usar como analitos para facilitar la evaluación de la salud general de la piel (p. ej., piel seca, piel escamosa, piel normal, etc.). La expresión “índice mecánico” como se usa en la presente memoria, significa la relación de la amplitud de la presión negativa máxima en un campo de ultrasonidos y la raíz cuadrada de la frecuencia de ultrasonidos (Índice mecánico = (Presión (MPa)) / (Frecuencia (MHz))^0,5).

La expresión “suministro de fármaco”, como se usa en la presente memoria, significa el suministro de uno o más fármacos en la sangre, linfa, líquido intersticial, una célula o tejido.

La expresión “potenciador de la sensibilidad” como se usa en la presente memoria, significa una sustancia o una mezcla de sustancias que se mezcla con el LPM para estabilizar analitos del tejido licuado y facilita su análisis en términos de potenciar la sensibilidad y especificidad de los ensayos analíticos de diagnóstico.

La expresión “reactivo bloqueante” se usa para describir un componente que se usa para prevenir la unión no específica de analitos a sustratos usados en un ensayo de diagnóstico.

Debe indicarse que, como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “un tejido” incluye una pluralidad de dichos tejidos y la referencia a “el líquido” incluye la referencia a uno o más líquidos, etc. Hay que indicar además, que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta exposición sirva como base de antecedentes para el uso de dicha terminología exclusiva como “solamente”, “solo”, y similares, en relación con la mención de elementos de las reivindicaciones, o el uso de una limitación “negativa”.

Las publicaciones descritas en la presente memoria se proporcionan solamente por su descripción antes de la fecha de solicitud de la presente solicitud. Nada en la presente memoria debe considerarse como una admisión de que la presente invención no tiene derecho a preceder dicha publicación en virtud de la invención previa. Además, las fechas de publicación proporcionadas pueden ser diferentes de las fechas de publicación reales que puede ser necesario confirmar independientemente.

La invención actual proporciona una composición que favorece la licuación de tejidos y un método de solubilización de tejidos de piel, para generar una muestra licuada que comprende constituyentes del tejido para así proporcionar la obtención de muestra de tejido rápida, así como la detección cualitativa y/o cuantitativa de analitos que pueden ser parte de constituyentes de tejidos (p. ej., varios tipos de biomoléculas, fármacos y microbios - puede querer un párrafo para definir formalmente que se entiende por constituyentes de tejidos). La determinación de la composición o constituyentes de tejidos se puede usar en una variedad de aplicaciones, que incluyen el diagnóstico o pronóstico de enfermedades locales así como sistémicas, evaluación de la biodisponibilidad de productos terapéuticos en diferentes tejidos después de la administración de fármacos, detección forense de drogas, evaluación de cambios en el microentorno de tejidos después de exposición a un agente dañino, descontaminación y otras aplicaciones diferentes.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para licuar una región de interés en la piel de un sujeto, para facilitar el paso de un fármaco a través de y al tejido. El método y dispositivo descritos antes se pueden aplicar no solo a recoger constituyentes de tejido sino también al suministro de fármacos. El dispositivo y métodos implican aplicar energía y un medio de licuación a un tejido de interés de un sujeto y suministrar un fármaco a través de o en el sitio del tejido que se va a licuar. La ventaja de usar la presente invención es 1) proporcionar flujos mayores de fármacos en un tejido, y 2) permitir un mayor control de flujos en un tejido. Los fármacos que simplemente no pasarían a través de tejidos tales como la piel y al sistema circulatorio, cuando se aplica el método son forzados a través de los tejidos.

Aunque la presente invención se puede describir junto con aplicaciones humanas, las aplicaciones veterinarias también están contempladas y en el alcance de la presente invención.

Diagnóstico de tejidos

Dispositivos de aplicación de energía

- Los dispositivos de licuación de tejidos descritos en la presente memoria se pueden describir en general como que tienen una fuente/generador de energía operativamente acoplado con una unidad/bastidor de depósito, donde el depósito alberga un medio en el que se recogen analitos y que, en muchas realizaciones facilita la transferencia de energía al tejido de interés y por lo tanto, cuando se desee, puede facilitar la licuación de una muestra de tejido. Cuando se usa, el bastidor del depósito se pone en contacto con el tejido del sujeto para poner en contacto el medio y el tejido, y se activa la fuente de energía. El dispositivo puede estar operativamente acoplado a fuentes de energía adicionales (p. ej., accionador de abrasivo, transductor piezoeléctrico, succión o presión), que también se pueden aplicar al tejido para facilitar la transferencia de energía al tejido. Puesto que se aplica energía al tejido, los constituyentes del tejido se solubilizan por la energía y se recogen en el medio. El medio se puede retener en el bastidor del depósito, o alternativamente se puede transferir a un recipiente separado. El bastidor del depósito o recipiente puede estar operativamente acoplado a un dispositivo de detección que puede medir cuantitativamente los constituyentes de tejido presentes en el medio.
- Se puede aplicar energía al tejido de una sola fuente de energía o como una combinación de fuentes. Las fuentes de energía de ejemplo incluyen energía mecánica (p. ej., abrasión, cizalladura, vacío, presión y similares), transductor piezoeléctrico, ultrasonidos, óptica (p. ej., láser), térmica y energía eléctrica. La intensidad de la energía aplicada, así como la duración de la aplicación de energía se pueden ajustar adecuadamente para el tejido particular de interés y la aplicación particular del método. La intensidad y duración de la energía también se pueden ajustar adecuadamente basándose en el medio que favorece la licuación (LPM) particular usado en relación con la energía. En algunas realizaciones, se proporciona un tiempo de exposición a la energía mayor que 1 minuto, mayor que 90 segundos, o mayor que 2 minutos, con el fin de producir una muestra de tejido licuada adecuada. La magnitud de la energía depende del analito y la selección del LPM. Son necesarias energías mayores para licuar tejidos en ausencia de tensioactivos o partículas en el LPM. El uso de energías altas está limitado por sus efectos adversos en el tejido o sus constituyentes. Un efecto adverso significativo es el daño tisular perjudicial. En algunas realizaciones, por lo tanto, puede ser necesario incorporar algunos componentes al dispositivo que proporcionen el control temporal (de forma ideal, en tiempo real) del cambio en las propiedades de tejido o la extensión de la licuación de tejido de modo que, una vez que se alcance el límite seguro para la exposición de energía, se puede detener el dispositivo. La evaluación temporal se puede llevar a cabo antes, durante y después del procedimiento de licuación. En algunas realizaciones, la evaluación temporal se lleva a cabo por medios electroquímicos (p. ej., conductividad eléctrica, medición de algunos iones por electrodos selectivos de iones, etc.), bioquímicos (p. ej., medición de algunos componentes de tejidos en el LPM por ensayos enzimáticos tales como ELISA y similares), u ópticos (p. ej., medición de la turbidez del LPM por espectrofotómetro, etc.). En una realización de ejemplo, la conductividad eléctrica temporal del tejido se mide aplicando un voltaje eléctrico AC predefinido a través del tejido con un generador de señal, y analizando la corriente eléctrica resultante por un multímetro. Otro efecto adverso significativo de la exposición a alta energía se atribuye a la elevación de temperatura en el tejido, también conocida como efectos térmicos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, puede ser necesario incorporar un elemento detector de temperatura (p. ej., un termopar) que permita controlar la temperatura del tejido y/o el LPM, facilitando el criterio de una cantidad segura de exposición de energía al tejido.
- El nivel de energía necesario se reduce significativamente mediante la selección adecuada del LPM. Por ejemplo, el uso de solución salina sola junto con ultrasonidos producía la recuperación de menos de 0,1 mg de proteína por cm² de piel. Por otra parte, la incorporación de tensioactivos tales como DPS, NLS y Brij-30 en una concentración de 1% en p/v en LPM aumentaba la recuperación de proteína a más de 0,6 mg por cm² de piel.
- En algunas realizaciones, el uso de energía para licuar tejido puede conducir a la reducción en la actividad biológica de constituyentes del tejido solubilizados, necesitando la selección de LPM que conserve adecuadamente la bioactividad de las moléculas del tejido así como que ayude a la solubilización del tejido. Por ejemplo, la incorporación de uno o más tensioactivos tales como DPS, NLS y Brij-30 en una concentración de 1% en p/v en el LPM, facilitaba la conservación completa de la bioactividad de las proteínas y ácidos nucleicos solubilizados bajo la exposición de energía ultrasónica.
- En algunas realizaciones, se puede aplicar energía a un tejido usando una cámara de suministro de energía que incluye un elemento productor de energía. La cámara, cuando se pone sobre el tejido, expondrá al tejido al elemento productor de energía y permitirá aplicar energía al tejido con interferencia mínima. Dicha cámara puede contener LPM y proporcionar el contacto del LPM con el tejido de modo que, tras la aplicación de energía, se pueden recoger los constituyentes del tejido directamente en la solución.
- En algunas realizaciones, la cámara de suministro de energía que contiene el LPM también puede comprender un dispositivo de diagnóstico, por ejemplo, un sensor de analitos, para detectar y opcionalmente cuantificar analitos que puedan estar presentes en el LPM. Estos dispositivos de diagnóstico pueden servir como sensores químicos, biosensores o pueden proporcionar otras mediciones para formar un sistema de obtención de muestra y medición completo. Se puede fabricar un elemento que tiene un canal interno para la transferencia de fluidos junto con un sensor para formar una unidad desechable. El dispositivo también puede estar adaptado para incluir o se puede

proporcionar como una unidad desechable que proporciona la obtención de analitos en el LPM para el análisis.

Alternativamente, el elemento de diagnóstico puede estar situado en otra parte (p. ej., separado del dispositivo de energía) y el contenido de la cámara de suministro de energía en contacto con el tejido se puede bombear usando fuerzas mecánicas, fuerzas capilares, ultrasonidos, vacío o fuerzas electrosmóticas, a una cámara de detección y analizar.

En algunas realizaciones, p. ej., cuando se evalúan las formulaciones tópicas o se determinan parámetros farmacológicos, la unidad puede estar construida para funcionar como una unidad de suministro de fármacos de bucle cerrado, que incluye medios de suministro de fármaco, medios de recuperación de analito, medios de detección para medir el analito y medios de control para proporcionar una señal al medio de suministro de fármaco.

Un ejemplo de la operación general de un dispositivo de analitos asistido por energía, se describe en la presente memoria. Una unidad portátil desechable se inserta en un generador de energía portátil o de sobremesa. El generador de energía puede incluir también circuitería para mediciones de resistencia del tejido, mediciones de concentraciones de analitos y presentación de las mediciones de concentraciones de analitos. El sistema (p. ej., aplicador de energía y unidad desechable) se pone contra el tejido, y se aplica energía durante un determinado periodo de tiempo, sola o como una combinación con otras fuerzas físicas, mecánicas, eléctricas y químicas. El tejido de interés se licua, y los analitos del tejido licuado se recogen en la unidad desechable y se miden usando ensayos adecuados.

La realización preferida de la presente invención y sus ventajas se entienden mejor con referencia a las figuras 1 a 19 de los dibujos, usándose números iguales para piezas iguales y correspondientes de los diferentes dibujos.

En relación a las figuras 1a a 1g, se muestran la estructura, componentes y funcionamiento de dispositivos de licuación de tejidos basados en energía abrasiva. Los paneles a a c de la figura 1 muestran el trabajo secuencial de un dispositivo que usa un componente abrasivo giratorio 101 como medio para aplicar energía a tejidos para la licuación. La licuación se logra poniendo y ajustando el componente abrasivo 101 en movimiento contra un tejido de interés 107. El componente abrasivo 101 está unido a un eje 102, que además está conectado a un motor giratorio 103 en el dispositivo. En algunas realizaciones, el eje 102 está diseñado para detectar y controlar la presión aplicada por el componente abrasivo 101 en el tejido 107. En una realización de ejemplo, el eje 102 está construido por el eje 1021 y el eje 1022 que están conectados entre sí por un muelle sensible a la presión 1023 (figura 1d). En otra realización el eje 1021 y el eje 1022 tienen entre ellos en sándwich un cristal piezoeléctrico sensible a la presión para vigilar y controlar la presión aplicada al tejido 107. Un paquete de baterías 104 alimenta el motor 103, el cual puede posteriormente poner el componente abrasivo 101 en movimiento giratorio cuando es dirigido por el operador del dispositivo. Antes de la licuación, el componente abrasivo 101 está diseñado para ser mantenido aislado contra el tejido 107 usando un bastidor 105, y específicamente una lámina fina 106 situada en la base del bastidor 105 (figura 1a). Tras el inicio del procedimiento de licuación, el LPM almacenado en el cartucho 108 es transferido al bastidor 105 (figura 1a), después de lo cual el LPM se pone en contacto con la superficie del material de la lámina 106, seguido de la puesta en movimiento del componente abrasivo 101 contra la lámina 106. El material de la lámina 106 se elige de modo que pueda ser erosionado rápidamente por el componente abrasivo 101, dejando que el LPM y el componente abrasivo 101 se pongan en contacto con el tejido 107 lo que conduce a la licuación de tejido (figura 1b). Los ejemplos no limitantes de la lámina 106 incluyen lámina de papel, lámina de caucho, lámina de metal, lámina de plástico o cualquier lámina soluble en agua. Tras completarse el procedimiento de licuación, el motor 103 se detiene y el LPM que contiene los constituyentes del tejido es transferido a un recipiente de muestra 110 (figura 1c) [la muestra no licuada no se muestra claramente en 110 por lo que habría que revisar la figura]; o directamente a un recipiente en el que se ha hecho previamente el vacío (evitando así la necesidad de la bomba de succión 109 y el recipiente 110). Cuando no hay recipientes con vacío hecho previamente, la recogida de la muestra se facilita mediante una bomba de succión 109.

En algunas realizaciones, algunos componentes del dispositivo están diseñados como unidades desechables de modo que, después de cada uso del dispositivo, estos componentes se pueden sustituir para permitir el uso estéril. Dichos componentes pueden incluir el bastidor 105, el componente abrasivo 101, cartucho 108, recipiente de muestra 110, y otros componentes del dispositivo que manejan fluidos, según se considere necesario para mantener la esterilidad del dispositivo. Alternativamente, en algunas realizaciones, el dispositivo entero se puede hacer desechable.

En algunas realizaciones, el cartucho 108 que almacena el LPM se puede sustituir por un montaje de esponja-fuelle para almacenar y liberar el LPM. Los paneles de e a g en la figura 1 muestran el trabajo secuencial de dicho dispositivo. Un bastidor en forma de fuelle flexible 112 contiene una esponja 111 cargada con LPM (figura 1e). Cuando el dispositivo se empuja contra el tejido 107, el bastidor de fuelle-esponja se exprime para liberar el LPM y el componente abrasivo 101 se pone en movimiento (figura 1f). Tras completarse el procedimiento de licuación, se detiene el motor 103 y el LPM que contiene los constituyentes del tejido se transfiere a un recipiente de muestra 110 (figura 1g). La recogida de la muestra se facilita por una bomba de succión 109. Alternativamente, en algunas realizaciones, la bomba de succión 109 y el recipiente 110 se pueden evitar recogiendo la muestra en la esponja levantando de nuevo el dispositivo a su posición original.

En relación con las figuras 2a y 2b, se muestran la estructura y componentes de los dispositivos de licuación de tejido que se pueden mover diseñados para la obtención de muestra continua de una zona grande de tejido. El panel a de la figura 2 muestra un dispositivo que usa un componente abrasivo giratorio 201 como medio para aplicar energía a tejidos para la licuación. La licuación se logra colocando y poniendo en movimiento el componente abrasivo 201 contra un tejido de interés 207. El componente abrasivo 201 está unido a un eje 202, que está además conectado a un motor giratorio 203 en el dispositivo. En algunas realizaciones, el eje 202 está diseñado para detectar y controlar la presión aplicada por el componente abrasivo 201 sobre el tejido 207. En una realización de ejemplo, el eje 202 está construido por dos ejes distintos que están conectados entre sí por un muelle sensible a la presión o un cristal piezoeléctrico sensible a la presión para la vigilancia y control de la presión aplicada al tejido 207. Un paquete de baterías 204 alimenta el motor 203, que posteriormente puede poner en movimiento giratorio el componente abrasivo 201 cuando es dirigido por el operador del dispositivo. Una vez que el dispositivo está puesto contra el tejido 207, se inicia un procedimiento de licuación continuo, llevando a cabo tres procedimientos clave: el LPM almacenado en un cartucho 208 es suministrado continuamente al bastidor 212 a la interfase de dispositivo-tejido; el componente abrasivo 201 se pone en movimiento contra el tejido 207; y la muestra de tejido licuada se recoge continuamente en un recipiente de muestra 210 usando una bomba de succión 209. El dispositivo se puede mover alrededor de modo que están expuestas superficies de tejido adicionales al dispositivo y son licuadas. Cuando se desea, se puede detener el procedimiento de licuación parando el motor 103, y se puede acceder a la muestra de tejido acumulado en el recipiente 210.

En algunas realizaciones, se pueden usar componentes del dispositivo adicionales para prevenir la fuga del LPM del bastidor 212 debido al movimiento del dispositivo sobre la superficie de tejido. En una realización de ejemplo, se puede usar la bomba de succión 209 para crear un sello asistido por vacío entre el tejido 207 y la cámara 206 situado en un bastidor de reborde 205 alrededor del dispositivo.

El panel b de la figura 2 muestra un dispositivo que usa un elemento piezoeléctrico 251 como medio para aplicar energía mecánica a los tejidos para la licuación. El elemento piezoeléctrico 251 se pone en un bastidor 252 que interconecta con un tejido de interés 259, y la licuación se lleva a cabo activando el elemento piezoeléctrico 251 con LPM presente como un fluido de acoplamiento entre el tejido 259 y el elemento piezoeléctrico 251. El elemento piezoeléctrico 251 es un transductor de energía eléctrica, que se le suministra mediante circuitos puestos en un tubo flexible 253. Durante la licuación, el LPM se suministra al bastidor 252 mediante un tubo flexible 254 usando un sistema de inyección controlado por el operador 256. La muestra de tejido licuada se puede recoger simultáneamente del bastidor 252 al recipiente de muestra 257 usando un tubo flexible 255. La recogida de muestra se facilita por una bomba de succión 258 que está conectada en serie al recipiente de muestra 257. En algunas realizaciones, la presión de succión creada en el bastidor 252 por la bomba de succión 258 puede proporcionar un sellado eficaz entre el bastidor 252 y el tejido 259 para prevenir la fuga de LPM del bastidor 252 durante la licuación. En algunas realizaciones, la presión de succión creada en el bastidor 252 por la bomba de succión 258 puede proporcionar una fuente de energía adicional para la licuación.

En algunas realizaciones, el bastidor 252 se puede mover para licuar superficies de tejido adicionales y recoger una muestra que representa constituyentes del tejido acumulados de las diferentes superficies del tejido. En dicho dispositivo se suministra continuamente LPM al bastidor 252 por el tubo 254 y la muestra se recoge continuamente por el tubo 255.

En algunas realizaciones, el dispositivo en la figura 2b puede operar sin un elemento piezoeléctrico 251. En esta realización, el LPM que fluye de un tubo 254 al bastidor 252 se pone en contacto con el tejido y licua el tejido. El tejido licuado se recoge del bastidor por el tubo 255. El bastidor se puede mover de forma continua o intermitente para recoger muestras de una zona de tejido grande. El dispositivo puede tener medios adicionales que en la práctica son necesarios para permitir el movimiento del dispositivo sobre un tejido, licuación del tejido y recogida del tejido licuado. En algunas realizaciones, se puede usar presión o vacío, pero no ambos, para dirigir el LPM hacia el tejido y recoger el tejido licuado.

En algunas realizaciones, los dispositivos de licuación pueden estar integrados con una sonda de diagnóstico tal como endoscopio, colonoscopio, laparoscopio, y similares.

En relación con las figuras 3a a 3c, se muestran la estructura y componentes de los dispositivos de licuación que usan un componente abrasivo oscilante como medio para aplicar energía a los tejidos para la licuación. En relación con las figuras 3a, la licuación se logra colocando y poniendo en movimiento el componente abrasivo 301 contra un tejido de interés 311. Se puede lograr un movimiento lineal, por ejemplo, mediante una disposición de piñón y cremallera (figura 3a). Específicamente, el componente abrasivo 301 está unido a una cremallera 302, que se desliza en un movimiento oscilatorio lineal usando una rueda dentada 303 (piñón). La rueda dentada 303 es dirigida en un movimiento circular oscilatorio por un motor 304. Un paquete de baterías 305 alimenta el motor 304. En algunas realizaciones, el motor 304 es un servomotor que puede requerir un controlador de microchip electrónico 306 para producir el movimiento circular oscilatorio. Antes de la licuación, el componente abrasivo 301 está diseñado para mantenerse aislado contra el tejido 311 usando un bastidor 307, y específicamente, una lámina fina 308 situada en la base del bastidor 307. El LPM se puede almacenar previamente en el bastidor 307, por ejemplo, de modo que está en contacto con 308. En algunas realizaciones, el LPM se puede transferir al bastidor 307 desde un cartucho situado en otra parte en el dispositivo. El procedimiento de licuación se inicia poniendo el componente abrasivo 301

en movimiento lineal contra la lámina 308. El material de la lámina 308 se elige de modo que sea erosionado rápidamente por el componente abrasivo 301, permitiendo que el LPM y el componente abrasivo 301 se pongan en contacto con el tejido 311 conduciendo a la licuación del tejido. Los ejemplos no limitantes de la lámina 311 incluyen lámina de papel, lámina de caucho, lámina de metal, lámina de plástico o cualquier lámina soluble en agua. Tras completarse el procedimiento de licuación, el motor 304 se detiene y el LPM que contiene los constituyentes del tejido es transferido a un recipiente de muestra 309. La recogida de la muestra se facilita mediante una bomba de succión 310. En algunas realizaciones, la muestra se puede recoger directamente a un recipiente en el que se ha hecho previamente el vacío, evitando así la necesidad de la bomba de succión 310 y el recipiente 310.

En algunas realizaciones, algunos componentes del dispositivo están diseñados como unidades desechables de modo que después de cada uso del dispositivo, estos componentes se pueden sustituir para permitir el uso estéril. Dichos componentes pueden incluir el bastidor 307, el componente abrasivo 301, recipiente de muestra 309, y otros componentes de dispositivo de manejo de fluidos, según se considere necesario para mantener la esterilidad. Alternativamente, en algunas realizaciones, el dispositivo entero puede estar hecho desechable.

En algunas realizaciones, el movimiento oscilatorio lineal del componente abrasivo 301 puede ser generado por otro mecanismo tal como usando motores lineales, accionadores de movimiento lineales, montaje de rosca de bolas, montaje de tornillo de avance, montaje de tornillo de apriete y separación, y otros dispositivos para traducir el movimiento rotacional en movimiento lineal.

En algunas realizaciones, un solo sistema de piñón y cremallera como se describe en la figura 3a se puede sustituir por una disposición de múltiples ruedas dentadas y una cinta transportadora como se ilustra en la figura 3b. Específicamente, una cinta transportadora 327 (no está claro dónde está la cinta transportadora en la figura - hay que revisar la figura) está montada en las ruedas dentadas 321, 322, 323, 324, 325 y 326. Un componente abrasivo 328 está unido a la cinta transportadora 327 y se ajusta en un movimiento oscilatorio lineal cuando la rueda dentada 321 es accionada por el motor 304 en un movimiento de rotación oscilatorio. Aunque las ruedas dentadas 321, 322 y 326 están fijadas al bastidor del dispositivo, las ruedas dentadas, 323, 324 y 325 están montadas sobre el eje 328. El eje 328 está fijado al bastidor del dispositivo. En algunas realizaciones, el eje 328 tiene una longitud flexible de modo que cuando el componente abrasivo 328 es presionado contra una superficie de tejido no plana, los ejes 328 unidos con las ruedas dentadas, 323, 324 y 325, pueden ajustar sus longitudes con el fin de hacer que el componente abrasivo 328 haga el perfil de la superficie de tejido no plana. Además, el eje 328 puede estar diseñado para detectar y controlar la presión aplicada por el componente abrasivo 328 sobre la superficie de tejido. En una realización de ejemplo, el eje 328 está compuesto del eje 3281 y el eje 3282 que están conectados entre sí mediante un muelle sensible a la presión 3283 (figura 3c).

En relación con las figuras 4a a 4g, se describen varios diseños del componente abrasivo usado en el método de la invención. La figura 4a ilustra un componente abrasivo que comprende una lámina de material abrasivo con espesor uniforme. Los ejemplos no limitantes de material abrasivo con espesor uniforme incluyen tela, cristales abrasivos (p. ej., cuarzo, metal, sílice, carburo de silicio, polvo y derivados de aluminio (tales como AlO_2), polvo de diamante, esponja polimérica y natural, y similares, etc. En algunas realizaciones, puede ser ventajoso diseñar un componente abrasivo con abrasividad heterogénea, por ejemplo, los que tienen variación espacial de la abrasividad. En una realización de ejemplo, el componente abrasivo es un disco con un gradiente de abrasividad que varía desde abrasividad alta en el centro del disco a abrasividad baja en la periferia del disco (figura 4b). En algunas realizaciones, la forma del componente abrasivo puede variar a una geometría no plana. En realizaciones de ejemplo, la figura 4c muestra un componente abrasivo con una superficie de cara al tejido lisa y redondeada (la relación de dimensiones, definida como la relación de la altura y la anchura, puede variar de 10 a 0,1), y la figura 4d muestra un componente abrasivo en forma de anillo circular. Las figuras de 4e a 4g muestran realizaciones de componentes abrasivos que usan cepillo como medio para la abrasión del tejido. La figura 4e ilustra un componente abrasivo que comprende un cepillo con cerdas de altura y abrasividad uniformes. En algunas realizaciones, el componente abrasivo comprende un cepillo con cerdas de diferente altura y/o abrasividad. La figura 4f muestra una realización de ejemplo de un cepillo en forma de disco circular con cerdas con abrasividad alta en el centro rodeadas de cerdas con abrasividad baja en la periferia del disco. La figura 4g muestra una realización de ejemplo de un cepillo con cerdas de diferentes longitudes que forman una superficie de cara al tejido lisa y redondeada (la relación de dimensiones, definida como la relación de la altura y la anchura del componente abrasivo, puede variar de 10 a 0,1).

En relación con las figuras 5a a 5d, se describen componentes del dispositivo para medir una conductividad eléctrica del tejido. Aunque la exposición a alta energía eléctrica favorece tejidos, su uso puede conducir a efectos adversos significativos tales como daño perjudicial de tejidos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, puede ser necesario incorporar algunos componentes del dispositivo que proporcionen control temporal (idealmente, en tiempo real) del cambio en las propiedades del tejido, p. ej., la conductividad eléctrica del tejido, de modo que una vez que se ha alcanzado el límite seguro de exposición de energía, se puede detener el dispositivo. La medición y vigilancia temporales de la conductividad eléctrica del tejido se pueden hacer durante el procedimiento de licuación aplicando un voltaje eléctrico AC predefinido a través del tejido de interés 503 usando un electrodo de medición 501 situado sobre el tejido 503 y un electrodo de referencia 502 situado en la proximidad de la región en el tejido 503 que se está licuando. La corriente eléctrica resultante a través de los dos electrodos, medida por un amperímetro 504, se puede tomar como una medida de la conductividad eléctrica del tejido. En algunas realizaciones, el electrodo de medición

501 se mantiene en contacto eléctrico con el LPM, o directamente con la región sobre el tejido 503 que se está licuando. En una realización, el electrodo de medición 501 está situado como un revestimiento de superficie interior del bastidor del LPM 509 (figura 5a). En algunas realizaciones, el electrodo de medición es un contacto deslizante 506 que se ha fijado a un eje 510 motorizado inmerso en LPM (figura 5b). La corriente eléctrica se transmite deslizándose el contacto 506 hasta a un perno aislado 505 asegurado sobre el bastidor del dispositivo. En algunas realizaciones, el electrodo de referencia 502 es una extensión del bastidor del LPM 509 y está situado en la proximidad periférica de la región del tejido 503 que se está licuando (figura 5a y figura 5b). En algunas realizaciones, el electrodo de referencia es un electrodo cilíndrico portátil 507 que está conectado eléctricamente con los componentes de medición de la conductividad eléctrica situados en el dispositivo de licuación (figura 5c). En algunas realizaciones, el electrodo de referencia es un electrodo de parche 508 que está conectado eléctricamente con los componentes de medición de la conductividad eléctrica situados en el dispositivo de licuación (figura 5d).

En relación con las figuras 6a a 6g, se describen la estructura, componentes y funcionamiento de dispositivos que usan licuación de tejido basado en microagujas. Los dispositivos basados en microagujas aplican energía al tejido por rotura mecánica de los componentes del tejido, lo cual se lleva a cabo principalmente empujando las microagujas en el tejido. La figura 6a muestra el diseño básico de un parche de microagujas 601 que lleva una multitud de microagujas 602 con una precarga con LPM 613. El parche de microagujas 601 se puede insertar en el tejido de interés permitiendo la rotura y disolución de componentes del tejido en el LPM 613. El LPM613 después se puede aspirar del parche 601 para el análisis de diagnóstico.

Se puede aplicar energía adicional para la licuación mediante movimiento de las microagujas después de inserción dentro del tejido. La figura 6b ilustra un componente vibrador 603 que puede estar asegurado sobre el parche de microagujas 601, que después de inserción del parche 601 en el tejido, se puede activar para agitar enérgicamente las microagujas 602 dentro del tejido. El componente vibrador 603 contiene una multitud de vibradores mecánicos 6031 y un panel 6032 de circuito electrónico operado con baterías para alimentar y controlar el movimiento de los vibradores mecánicos en las direcciones deseadas. En una realización de ejemplo, los vibradores 6031 se pueden hacer vibrar en direcciones paralelas y perpendiculares al eje de las microagujas 602.

En algunas realizaciones, el movimiento de las microagujas después de inserción se puede producir por el movimiento de cada microaguja 602 con respecto al parche 601. La figura 6f describe un electroimán 612 situado en la parte superior del parche 601. El electroimán 612 se puede usar para producir movimiento oscilatorio de cada microaguja 602 a lo largo de su eje. Esto se puede lograr sujetando un imán 611 en la parte superior de la microaguja 602, de modo que el imán 611 responde a un perfil de polaridad alternante del electroimán 612 conduciendo a movimiento lineal oscilatorio de las microagujas 602. En algunas realizaciones, puede ser conveniente el movimiento rotatorio de las microagujas. Los electroimanes 6121, 6122, 6123 y 6124 están situados simétricamente alrededor del parche 601 (figura 6g). El imán 611 unido a la parte superior de cada microaguja 602 responde al perfil de polaridad alternante del electroimán 6121, 6122, 6123 y 6124, conduciendo al movimiento rotatorio de las microagujas 602.

En las figuras 6b-6e, se puede aplicar energía adicional para la licuación mediante el movimiento forzado del LPM en el tejido usando la inyección activa y extracción de LPM a través de las microagujas. Un bastidor 604 situado en el dispositivo puede contener un recipiente de aire comprimido 605 que se puede usar para forzar el LPM contenido en el parche 601 a fluir dentro del tejido. Se puede usar una bomba de succión 606 en el bastidor 604 para aplicar vacío para la extracción de LPM del tejido. En algunas realizaciones, el recipiente de aire comprimido 605 y la bomba de succión 606 se pueden usar alternativamente para la inyección y extracción de LPM repetidas del tejido para la licuación potenciada. Se usa un panel de circuito electrónico operado con baterías 607 en el bastidor 604 para la alimentación eléctrica y control del recipiente de aire comprimido 605 y bomba de succión 606. En algunas realizaciones, la bomba de succión 606 puede estar además conectada a un recipiente de muestra para aspirar y transferir la muestra de tejido licuada desde el parche 601 al recipiente de muestra. En algunas realizaciones, el bastidor 604 se puede sustituir por una tapa elástica flexible 608 (véase la figura 6d) encajada en la parte superior del parche 601. La tapa flexible 608 se puede empujar hacia dentro y hacia fuera repetidamente, por ejemplo, empujando con un dedo, de modo que el LPM es inyectado y extraído repetidamente del tejido a través de las microagujas 602.

Las microagujas 602 puede estar revestidas con una sustancia 610 para potenciar la licuación de tejido (figura 6e). En algunas realizaciones, la sustancia 610 es un material abrasivo que puede ayudar a la rotura mejorada de los constituyentes del tejido y a su disolución más rápida en el LPM. En algunas realizaciones, la sustancia 610 es una enzima que puede escindir componentes del tejido específicos tales como la matriz extracelular para la licuación del tejido mejorada. En algunas realizaciones, la sustancia 610 es una molécula que se une específicamente a analitos del tejido de interés conduciendo a una recuperación mejorada del analito del tejido. En una realización de ejemplo, la sustancia 610 es un anticuerpo.

En relación con la figura 6, en algunas realizaciones, algunos componentes del dispositivo se pueden diseñar como desechables de modo que, después de cada uso del dispositivo, los componentes se pueden sustituir para permitir e uso estéril. Dichos componentes pueden incluir el parche de microagujas 601, las microagujas 602, recipiente de aire comprimido 605, bomba de succión 606 y otros componentes del dispositivo de gestión de fluidos, según se considere necesario para mantener la esterilidad del dispositivo. Alternativamente, en algunas realizaciones, se

puede hacer desechable el dispositivo entero.

Medio que favorece la licuación (LPM)

5 El LPM se puede diseñar para servir para uno o más de los siguientes propósitos: a) facilita la dispersión de tejidos en sus constituyentes, b) actúa como un medio para recoger los constituyentes de tejido líquidos, y c) inhibe la degradación de los constituyentes de la muestra obtenida de modo que se retiene su actividad química o biológica (p. ej., conservando diferentes conformaciones estructurales de las moléculas y conservando su capacidad de obtener muestras de microbios para la multiplicación), y d) asegura la compatibilidad con las posteriores técnicas analíticas.

10 En general, el LPM comprende un disolvente, tal como disoluciones acuosas (p. ej., Tris-HCl, solución salina tamponada de fosfato, etc.) o líquidos orgánicos ("no acuosos") (p. ej., DMSO, etanol y similares) que pueden contener además una variedad de agentes que favorecen la licuación, incluyendo, pero no limitado a tensioactivos (no iónicos, aniónicos o catiónicos), ácidos grasos, moléculas de tipo azona, agentes quelantes (p. ej., EDTA, etc.), compuestos inorgánicos y sustancias abrasivas. El "agente que favorece la licuación" como se usa en la presente memoria, se refiere a un componente de un LPM que puede facilitar la licuación de una muestra de tejido y/o la solubilización de constituyentes del tejido. Dependiendo del tipo de tejido y de los analitos de interés, los constituyentes del LPM se pueden seleccionar razonablemente basándose en los criterios descritos antes. Por ejemplo, un tejido delicado, tal como una membrana mucosa, se puede licuar mediante una disolución salina con una cantidad mínima o sin tensioactivos, mientras que tejidos queratinizados, tales como la piel, pueden requerir constituyentes adicionales, tales como tensioactivos.

20 Los agentes que favorecen la licuación en el LPM puede comprender una variedad de componentes adecuados que incluyen, pero no se limitan a: agua, tris-HCl, disolución salina (disolución salina tamponada con fosfato (PBS)) y disolución salina tamponada con tris (TBS)), alcoholes (que incluyen etanol e isopropanol (p. ej., en un intervalo de concentración de 10-100% en disolución acuosa)), sustancias abrasivas, tales como polvo o derivados de sílice, óxido de aluminio o carburo de silicio (p. ej., en un intervalo de concentración de 0,01-99% (p/v) en disolución basada en agua), tensioactivos tales como Brij (diferentes longitudes de cadena, p. ej., Brij-30), 3-(decil-dimetilamonio)propanosulfonato (DPS), 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato (DDPS), N-lauroil-sarcosina (NLS), Triton X-100, dodecilsulfato sódico (SDS) y laurilsulfato sódico (SLS), tensioactivo HCO-60, hidroxipolietoxidodecano, lauroil-sarcosina, nonoxinol, octoxinol, fenilsulfonato, Pluronic, polioléatos, laurato sódico, oleato sódico, dilaurato de sorbitano, dioleato de sorbitano, monolaurato de sorbitano, monooleatos de sorbitano, trilaurato de sorbitano, trioleato de sorbitano, Span 20, Span 40, Span 85, Synperonic NP, Tweens, alquilsulfatos sódicos y haluros de alquilamonio (p. ej., en concentraciones en el intervalo entre 0,01-20 % en disolución basada en agua), DMSO (p. ej., en un intervalo de concentración de entre 0,01-20 % en disolución basada en agua), ácidos grasos tales como ácido linoleico (p. ej., en un intervalo de concentración de entre 0,1-2 % en etanol:agua (50:50)), azona (p. ej., en un intervalo de concentración de 0,1-10 % en etanol:agua (50:50)), polietilenglicol (p. ej., en un intervalo de concentración de 10-50% en disolución basada en agua), histamina (p. ej., en un intervalo de concentración de 10-100 mg/ml en disolución basada en agua), EDTA (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-100 mM), e hidróxido sódico (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-100 mM). En algunas realizaciones, el LPM puede contener tensioactivos distintos de TWEEN, CTAB, SPAN o alquilsulfato sódico. En algunas realizaciones, el LPM puede contener tensioactivos distintos de tensioactivos catiónicos. Cuando el LPM incluye un tensioactivo, la concentración total del tensioactivo (p/v) en el LPM puede estar en el intervalo de al menos 0,5% a 10%, y puede ser, por ejemplo, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 2%, aproximadamente 2,5%, o aproximadamente 3%.

45 El LPM puede incluir agentes que facilitan la conservación de la bioactividad de un analito de interés. Por ejemplo, el LPM puede contener depuradores de radicales libres (p. ej., antioxidantes (p. ej., polifenol, beta-caroteno, luteína, licopeno, selenio, etc.), vitamina A, vitamina C, vitamina E, alfa-tocoferol, hidroxitolueno butilado, benzoato sódico, formiato sódico, y similares); agentes desespumantes (p. ej., agentes antiespumantes de silicona y que no son de silicona tales como dimetilpolisiloxano, aceite hidrocarbonado, diglicérido de ácido graso inferior, y similares); y protectores de cizalladura (p. ej., polietilenglicol, poli(alcohol vinílico), pluronic F68, y similares). La "bioactividad" usada en el contexto de un analito se refiere a una conformación estructural que facilita la detección (p. ej., tal como un epítipo unido a un anticuerpo específico u otra característica estructural que es sensible a la desnaturalización), y también puede incluir una actividad biológica de un analito (p. ej., actividad enzimática).

50 Los LPM de interés particular son los que contienen una combinación de tensioactivos que cuando se usan en relación con los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria, proporcionan un nivel deseado de constituyentes de tejido en el LPM a la vez que proporcionan conservación de la bioactividad de los analitos en el LPM, en particular de modo que proporcionan mantenimiento de la conformación estructural de un analito (p. ej., evitan la desnaturalización de un analito proteína).

60 El uso de diferentes combinaciones de tensioactivos, que incluye la combinación de tensioactivo no iónico, tensioactivo de ion híbrido y tensioactivo aniónico en el LPM puede proporcionar tanto niveles altos de constituyentes del tejido en el LPM como una buena conservación de la bioactividad de un analito contenido en el LPM después del uso en dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria.

Los ejemplos no limitantes de tensioactivos no iónicos de interés incluyen los tensioactivos de la serie Brij (p. ej., éter dodecílico de polietilenglicol (Brij 30), éter laurílico de polioxietileno-23 (Brij 35), éter cetílico de polioxietileno-2 (Brij 52), éter cetílico de polioxietileno-10 (Brij 56), éter cetílico de polioxietileno-20 (Brij 58), éter estearílico de polioxietileno-2 (Brij 72), éter estearílico de polioxietileno 10 (Brij 76), éter estearílico de polioxietileno 20 (Brij 78), éter oleílico de polioxietileno-2 (Brij 92), éter oleílico de polioxietileno-10 (Brij 96), éter estearílico de polioxietileno-100 (Brij 700), éter estearílico de polioxietileno-21 (Brij 721), y similares); Triton X (p. ej., Triton X-15, Triton X-45, Triton X-100, Triton X-114, Triton X-165, Triton X-200, Triton X-207, Triton X-305, Triton X-405, y similares); y sorbitano (p. ej., Span-20, Span-40, Span-60, Span-65, Span-80, Span-85, y similares).

Los ejemplos no limitantes de tensioactivos de ion híbrido de interés incluyen 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato, 3-(dodecildimetilamonio)-propanosulfonato, (miristildimetilamonio)-propanosulfonato, (hexadecildimetilamonio)-propanosulfonato, ChemBetaine C, ChemBetaine Oleyl, ChemBetaine CAS, y 3-(3-colamidopropil)-dimetilamonio-1-propanosulfonato.

Los ejemplos no limitantes de tensioactivos aniónicos de interés incluyen N-lauroil-sarcosina, cocoil-sarcosinato de sodio, miristoil-sarcosinato de sodio, lauril-sarcosinato de isopropilo, palmitoil-sarcosinato de sodio, y lauroanfodiacetato-lauroil-sarcosinato de sodio.

En algunas realizaciones, los tensioactivos no iónicos se combinan con tensioactivos de ion híbrido. En algunas realizaciones, los tensioactivos no iónicos se combinan con tensioactivos aniónicos. En estas realizaciones, la relación de tensioactivo no iónico a ion híbrido, o tensioactivo aniónico presente en el LPM se puede ajustar para lograr los resultados deseados. Las relaciones de interés no limitantes incluyen tensioactivo no iónico:ion híbrido 25:75, tensioactivo no iónico:ion híbrido 50:50, tensioactivo no iónico:ion híbrido 75:25, tensioactivo no iónico:aniónico 25:75, tensioactivo no iónico:aniónico 50:50 y tensioactivo no iónico:aniónico 75:25. Una mezcla de interés particular es una mezcla de tensioactivos 50:50 de un tensioactivo de la serie Brij (p. ej., Brij-30) y N-lauroil-sarcosina (NLS). Otra mezcla de interés particular es una mezcla de tensioactivos 50:50 de un tensioactivo de la serie Brij (p. ej., Brij-30) y 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato (DPS). Como se ilustra en los siguientes ejemplos, estas combinaciones de tensioactivos, cuando se incluyen en el LPM con una concentración total de tensioactivo de 0,5-1% (p/v), proporcionan solubilización de un nivel alto de constituyentes del tejido evaluado por la concentración total de proteínas, y proporcionan retención de bioactividad (evaluado por la técnica ELISA).

En algunos casos específicos, por ejemplo, para recoger patógenos vivos, se pueden usar diferentes composiciones de LPM para lograr los resultados deseados. Se usaron disolución salina y Tris-HCl como un LPM para proporcionar la recolección de una amplia variedad de bacterias residentes en la piel, y además estos microbios permanecían potentes para multiplicarse y crecer ex vivo. En algunas realizaciones, un LPM puede contener un medio de caldo de enriquecimiento para mantener el crecimiento de los microbios de la muestra obtenida. Algunas bacterias anaerobias son sensibles a una atmósfera de oxígeno. Por lo tanto, el LPM para recoger bacterias anaerobias puede contener una atmósfera de nitrógeno e hidrógeno. Será evidente para el experto en la técnica tras la lectura de la presente descripción, que las composiciones de LPM que varían en componentes se pueden producir fácilmente para usar en aplicaciones específicas.

El LPM también puede incluir estabilizadores de analitos de interés, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de RNasa e inhibidores de DNasa, que pueden proporcionar la recolección y al menos el almacenamiento temporal de analitos con degradación mínima o no detectable o pérdida de bioactividad. Otros agentes que favorecen la licuación de ejemplo se describen en la patente de EE.UU. nº 5.947.921, que se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad. Por ejemplo, el agente que favorece la licuación puede incluir tensioactivos, partículas abrasivas y estabilizantes de biomoléculas.

En una realización de ejemplo, el LPM está compuesto de una disolución de mezcla de NLS y Brij-30 al 1% en p/v en PBS estéril. En otra realización de ejemplo, el LPM está compuesto de una disolución de mezcla de DPS y Brij-30 al 0,5% en p/v en PBS estéril. En algunas realizaciones, específicamente cuando los analitos son una o más proteínas, el LPM contiene un cóctel inhibidor de proteasa al 1-10% en v/v (p. ej., número de catálogo P8340, proporcionado por Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). En algunas realizaciones, el LPM es una disolución salina. En algunas realizaciones, el LPM es una disolución de tris-HCl.

El LPM también puede incluir agentes definidos como "potenciadores de la sensibilidad", que se usan para estabilizar analitos de tejidos licuados y facilitar su análisis en términos de potenciar la sensibilidad y especificidad de los ensayos analíticos de diagnóstico. Cuando se considere necesario lograr estos objetivos, se pueden añadir potenciadores de la sensibilidad en el LPM antes, durante o después del procedimiento de licuación, o antes o durante el análisis de diagnóstico. Por ejemplo, el potenciador de sensibilidad se puede almacenar previamente en un recipiente, y se puede mezclar más tarde la muestra de tejido licuada.

En realizaciones típicas, los potenciadores de la sensibilidad se formulan con sustancias que actúan sinérgicamente con componentes específicos del LPM (como se ha descrito antes) para potenciar la sensibilidad y especificidad de la detección de analitos de interés. En una realización de ejemplo, los potenciadores de la sensibilidad se formulan con sustancias para prevenir la unión no específica de analitos de proteínas presentes en la muestra de tejido a diferentes sustratos del ensayo de diagnóstico, que dan como resultado su detección sensible y específica. En

algunas realizaciones, los potenciadores de la sensibilidad se pueden formular con sustancias que activan proteasas para prevenir la unión no específica de determinados analitos de interés con proteínas presentes en la muestra licuada. En algunas realizaciones, los potenciadores de la sensibilidad se usan para ajustar el estado fisiológico (por ejemplo, pH) de las muestras licuadas para facilitar el análisis corriente abajo de analitos de interés.

- 5 En algunas realizaciones, el potenciador de la sensibilidad puede comprender un disolvente, tal como disoluciones acuosas (p. ej., disolución salina tamponada con fosfato, disolución salina tamponada con tris, etc.) o líquidos orgánicos (“no acuosos”) (p. ej., DMSO, etanol, fenol, etc.), que puede contener adicionalmente, pero no limitado, reactivos de bloqueo (p. ej., Tween 20, Triton X-100, albúmina de suero bovino, leche en polvo desnatada, caseína, caseinato, gelatina de pescado, ácidos nucleicos espermáticos tratados con ultrasonidos y similares), estabilizantes
10 tales como proteasa, inhibidores de proteasa, inhibidores de RNasa e inhibidores de DNasa, medios de caldos. Dependiendo del tipo de tejido y analito de interés, los componentes del potenciador de la sensibilidad se pueden elegir racionalmente. En una realización de ejemplo, para detectar ácidos nucleicos en tejido queratinizado licuado tal como piel, el potenciador de la sensibilidad comprende NaCl 100 mM, Tris-Cl 10 mM (pH 8), EDTA 25 mM (pH 8), SDS al 0,5%, y proteasa K 0,1 mg/ml. En la presente memoria, la proteasa K no solo facilita la licuación de la piel
15 sino que también puede estabilizar los ácidos nucleicos descomponiendo la DNasa y RNasa presentes en la muestra como un analito del tejido.

- En algunas realizaciones que implican la detección de analito por un inmunoensayo, el potenciador de la sensibilidad puede comprender una variedad de componentes adecuados que incluyen, pero no se limitan a: disolvente (p. ej., agua, una disolución tampón (p. ej., disolución salina tamponada con fosfato, tris-HCl, disolución salina tamponada con tris, etc.) y similares), un estabilizante tal como un inhibidor de proteasas y un reactivo de bloqueo tal como
20 Tween 20, Triton X-100, albúmina de suero bovino (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-5%), leche en polvo desnatada (p. ej., en un intervalo de concentración de 0,1-0,5%), caseína o caseinato (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-5%), gelatina de pescado (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-5%). En una realización de ejemplo, el potenciador de la sensibilidad para inmunoensayos está compuesto de una disolución de BSA al 10% y Tween 20 al 0,5% en disolución salina tamponada con Tris, y se mezcla con la muestra de tejido en una relación de 1:10.
25

- En algunas realizaciones que implican la detección de ácidos nucleicos como un analito de interés, el potenciador de la sensibilidad puede estar compuesto de diferentes componentes adecuados que incluyen, pero no se limitan a: agua, una disolución tampón (p. ej., TE, TAE, citrato sódico, etc.), un agente quelante tal como EDTA, un estabilizante (p. ej., inhibidor de RNasa, inhibidor de DNasa, proteasa, fenol, sulfato amónico, isotiocianato de guanidina, etc.), un tensioactivo tal como dodecilsulfato sódico y reactivos de bloqueo tales como ácidos nucleicos espermáticos tratados con ultrasonidos, Tween 20, Triton X-100, albúmina de suero bovino (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-5%), leche en polvo desnatada (p. ej., en un intervalo de concentración de 0,1-0,5%), caseína o caseinato (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-5%), gelatina de pescado (p. ej., en un intervalo de concentración de 1-5%). En algunas realizaciones, donde se desea la detección de ácidos nucleicos usando tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el LPM debe elegirse para así evitar la inclusión de inhibidores de la PCR como LPA. En realizaciones de ejemplo, el LPM compatible con la PCR es tampón de Tris-HCl, o tampón de EDTA.
30
35

- En algunas realizaciones que implican la detección de microbios como un analito de interés, el potenciador de la sensibilidad puede comprender un medio de caldo de enriquecimiento para así facilitar el crecimiento de microbios ex vivo. Algunas bacterias anaerobias son sensibles a una atmósfera de oxígeno. Por lo tanto, el potenciador de la sensibilidad para recoger bacterias anaerobias contiene una atmósfera de nitrógeno e hidrógeno.
40

Otras formulaciones de potenciador de la sensibilidad para sistema de ensayo específico o analito de interés específico serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la presente descripción.

- 45 En algunas realizaciones, las propiedades térmicas (p. ej., temperatura, capacidad térmica, y similares) del LPM se pueden manipular antes o durante la licuación de tejidos para así reducir los efectos térmicos adversos de la exposición a energía en el tejido y/o sus constituyentes. En una realización, la temperatura del LPM se mantiene suficientemente baja para no inducir la fusión de los constituyentes del tejido. En otra realización de ejemplo, se puede usar un LPM previamente enfriado que tiene temperatura inferior a la temperatura ambiente
50 (aproximadamente 25°C) para la licuación por ultrasonidos. En otra realización de ejemplo, la temperatura del LPM se puede reducir continuamente durante la exposición a energía transfiriendo su calor a un líquido previamente enfriado que fluye por una cámara de transferencia de calor acoplada al depósito que contiene el LPM.

Analitos

- 55 Se puede detectar una variedad de analitos (cualitativa o cuantitativamente) con dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria, y opcionalmente, caracterizados para proporcionar un perfil de analitos del tejido en cuestión. Los ejemplos no limitantes incluyen: proteínas estructurales y de señalización (p. ej., queratinas (p. ej., queratinas básicas, queratinas ácidas), β -actina, interleuquinas, quimioquinas, factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias, interferones, anticuerpos, (IgE, IgG, IgA, IgD, IgM), biomarcadores del cáncer (p. ej., CEA, y similares), proteínas de choque térmico (p. ej., Hsp-60, Hsp-70, Hsp-90, etc.), y similares, lípidos (p. ej.,

colesterol), ceramidas (p. ej., ceramidas 1-6), ácidos grasos, triglicéridos, hidrocarburos parafínicos, escualeno, ésteres de colesterilo, diésteres de colesterilo, ácidos grasos libres, lanosterol, colesterol, lípidos polares (p. ej., derivados de glucosilo y fosfolípidos) y similares, ácidos nucleicos (p. ej., ARN y ADN), moléculas pequeñas (p. ej., aminoácidos libres, lactato, moléculas de fármaco suministradas de forma exógena, contaminantes medioambientales, agentes de guerra, y similares) y microorganismos (p. ej., bacterias, hongos, virus y similares). Estos analitos se encuentran dentro del propio tejido y pueden estar presentes no solamente en el líquido intersticial alrededor del tejido. El analito puede ser distinto de un marcador asociado con el líquido intersticial, tal como un marcador tumoral. Por lo tanto, los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria se pueden adaptar para detectar marcadores tumorales que están presentes en estructuras de tejidos, pero que pueden estar también o no presentes en el líquido intersticial.

En una realización particular, se licuan anticuerpos contra alérgenos y citoquinas (se licuan estos o se licua el tejido para producir estos analitos solubles) y se caracterizan para proporcionar un perfil de alergia para el tejido y el sujeto en cuestión. Los tipos específicos de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos IgE e IgG. Los tipos específicos de citoquinas incluyen, pero no se limitan a IL4, IL5, IL10, IL-12, IL13, IL-16, GM-CSF, RANTES, MCP-4, CTACK/CCL27, IFN- γ , TNF α , CD23, CD-40, Eotaxina-2 y TARC.

Estos analitos se pueden analizar de muchas formas, que puede seleccionar fácilmente el experto en la técnica de acuerdo con el analito que se va a evaluar. Se puede aplicar un depósito o recipiente de recolección en el sitio para recoger la muestra, que después se mide usando técnicas analíticas. Se puede optimizar la aplicación de energía para maximizar la recuperación de analitos. Para algunas aplicaciones puede ser deseable mantener los niveles relativos del analito respecto a otros componentes de la muestra. Los métodos de ensayo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a electroforesis en gel, cultivo en placa de agar, ensayo enzimático, ensayos basados en anticuerpos (p. ej., ensayos de transferencia western, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), ensayos de flujo lateral y similares), cromatografía en capa fina, HPLC, espectrometría de masas, ensayos basados en radiación, electroforesis de ADN/ARN, espectrofotometría (UV/Vis), ensayos de flujo y similares.

Una medición cuantitativa de la presencia de constituyentes del tejido en la muestra de tejido licuada puede evaluar la extensión de la licuación de tejido. Dicha calibración interna se puede llevar a cabo midiendo una o más propiedades ópticas de la muestra de tejido licuada, tales como la absorbancia, transmitancia, dispersión o emisión de fluorescencia tras ser irradiada mediante una fuente que emite ondas electromagnéticas. Se pueden usar parámetros adicionales de la muestra tales como el peso gravimétrico, contenido total de proteínas, pH, y la conductancia eléctrica, para calibrar la extensión de la licuación. Además, se puede usar la medición de propiedades del tejido tales como el espesor, velocidad de pérdida de agua, y conductividad eléctrica. Se puede usar la medición directa de la concentración de uno o más analitos de la muestra tomada tales como β -actina, β -tubulina, GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato-deshidrogenasa), LDH (lactato deshidrogenasa), o cualquier otra biomolécula presente en abundancia, cuyas concentraciones se espera que permanezcan constantes en el tejido, para calibrar la extensión de la licuación de tejido. Los analitos también se podrían cuantificar usando ensayos inmunológicos (es decir, radioinmunológicos; Eliza, FACS).

Células tisulares y microorganismos

Además de los analitos descritos antes, se pueden detectar células enteras del tejido que se analiza, así como una variedad de microorganismos, en tejidos de interés usando los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria. Las células de los tejidos y la mayoría de los microorganismos son mucho mayores que los analitos descritos antes, y su extracción de un tejido de interés se puede llevar a cabo usando diferentes realizaciones de la presente invención. Las bacterias, virus, protozoos y hongos patógenos y no patógenos tienen funciones conocidas en diferentes enfermedades infecciosas, y su detección puede facilitar el diagnóstico de una enfermedad causada por el microorganismo (p. ej., tuberculosis, herpes, malaria, tiña, etc.). El estado de la enfermedad presenta la presencia de nuevos microorganismos o una alteración en la proporción de microorganismos residentes. Cuando se sospecha que un sujeto tiene una infección con dicho microorganismo, se pueden usar los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria para cuantificar o detectar la presencia o ausencia de un microorganismo, y facilitar el diagnóstico de la afección.

Los microorganismos no patógenos normalmente están presentes en tejidos sanos ("flora normal") y pueden tener una función en muchas funciones corporales y de mantenimiento de la salud de un sujeto. La detección de estos microorganismos de la flora normal (p. ej., bacterias) en un tejido de interés también se puede llevar a cabo con el método y dispositivo actuales. Se puede obtener una muestra de un tejido de un sujeto y analizar usando los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria para examinar los diferentes microorganismos que están naturalmente presentes. Cuando se sospecha que un sujeto tiene una afección anómala, se puede tomar una muestra de tejido del sujeto de acuerdo con los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria, para detectar la presencia o ausencia de un cambio en un perfil de microorganismos no patógenos con respecto al de un sujeto sano normal. Un cambio en este perfil de microorganismos puede facilitar el diagnóstico de una afección de interés en un sujeto.

En algunas realizaciones, los tejidos se pueden licuar para recuperar sus células o microorganismos que residen en los mismos. La aplicación de los presentes dispositivos, métodos y sistemas que usan energía, permite recoger

bacterias de la piel de un sujeto en un medio de recolección que puede contener opcionalmente un LPA. Por ejemplo, la aplicación de energía de ultrasonidos en el tejido de interés usando Tris-HCl o PBS es suficiente para recoger microflora bacteriana. En general, el uso de un dispositivo que usa este método implica la aplicación de un nivel suficiente de energía de ultrasonidos para así desprender microorganismos del tejido y meterlos en el medio de recolección, el cual después se recoge para el posterior análisis, que puede incluir cultivo del medio para determinar si determinados microorganismos están presentes, ensayo directamente del medio (p. ej., que usan técnicas de ELISA, p. ej., que implican anticuerpos específicos de microorganismos, p. ej., que implican un ensayo de aglutinación de látex, p. ej., que usan un ensayo de diagnóstico basado en ácidos nucleicos incluyendo la hibridación por reacción en cadena de la polimerasa, método de secuenciación de ADN) o una combinación de estos procedimientos. La detección de los microorganismos en el medio facilita el diagnóstico de una afección de interés. Además, una recolección de microorganismos de alto rendimiento podría acortar o eliminar un procedimiento para amplificar el número de ácidos nucleicos para el diagnóstico.

La invención descrita en la presente memoria también se puede usar para recoger células del tejido. La aplicación de energía con un LPM adecuado que licua los tejidos sin alterar las membranas celulares, se puede usar para recoger células enteras, incluyendo células enteras de tejidos. El LPM en este caso puede comprender productos químicos que incluyen, pero no se limitan a agentes quelantes de iones tales como EDTA o enzimas tales como tripsina para desprender las células. Igualmente, con cambios en parámetros de energía y/o LPM como se ha descrito antes, los dispositivos, métodos y sistemas descritos de la presente descripción se pueden usar para recoger núcleos u otros orgánulos celulares.

20 Tejido de interés

Una variedad de tejidos son adecuados para los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria. Estos tejidos incluyen, pero no se limitan a piel, membranas mucosas (nasal, intestino, colon, bucal, vaginal, etc.) o moco, mama, próstata, ojo, intestino, vejiga, estómago, esófago, uña, testículos, cabello, pulmón, cerebro, páncreas, hígado, corazón, hueso, o pared de la aorta. En una realización, el tejido es piel, que puede ser piel de la cara, brazos, manos, piernas, espalda, o cualquier otro lugar. Aunque la piel y las superficies mucosas son muy accesibles para realizar la licuación, los dispositivos, métodos y sistemas de licuación descritos en esta descripción se pueden diseñar para adaptarse fácilmente a diferentes tejidos internos citados antes. Los dispositivos de ejemplo específicos para tejidos internos que pueden ser útiles en los métodos descritos en la presente memoria incluyen los descritos en los documentos U.S. 5.704.361, U.S. 5.713.363 y U.S. 5.895.397, cada uno de los cuales se incorpora en la presente memoria por referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, el tejido de interés es otro distinto de un tumor o tejido que se sospecha que es un tumor. Cuando los dispositivos, métodos y sistemas descritos en la presente memoria se aplican a la detección de un microorganismo, el tejido de interés es uno que se sospecha que contiene un microorganismo (p. ej., un tejido que se sospecha que tiene una infección, en particular una infección de tejido profundo, p. ej., infección de las capas dérmica y/o subdérmica de la piel, incluyendo dichas capas de membranas mucosas).

Método de uso

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para una amplia variedad de evaluaciones de tejidos, que incluyen la evaluación de la presencia o ausencia de un analito o analitos de interés para facilitar el diagnóstico de una afección de interés. En algunas realizaciones, los métodos son útiles, por ejemplo, cuando el paciente presenta signos y síntomas clínicos que sugieren una o más afecciones, en las que los métodos descritos en la presente memoria pueden facilitar un diagnóstico diferencial.

Los métodos descritos pueden implicar comparar un perfil de analitos de ensayo generado a partir de una muestra de paciente con un perfil de analitos de referencia. Un "perfil de analitos de referencia" o "perfil de analitos para un tejido de referencia" en general se refieren a niveles cualitativos o cuantitativos de un analito seleccionado o un conjunto de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más analitos, que son característicos de una afección de interés. Las afecciones de interés de ejemplo para las cuales se puede proporcionar un perfil de analitos de referencia incluyen, pero no se limitan, a perfil de analitos de referencia normal, (p. ej., tejido sano (es decir, ausencia de enfermedad), salud tisular general, niveles aceptables o tolerados de un analito (p.ej., un fármaco, contaminante ambiental, etc.), perfil de analitos de referencia de enfermedad (p. ej., un perfil de analitos característico de la presencia, por ejemplo, de infección microbiana (p. ej., infección bacteriana, vírica, fúngica u otra infección microbiana), enfermedades localizadas en tejidos (p. ej., dermatitis, psoriasis, cánceres (próstata, mama, pulmón, etc.), urticaria, etc.) enfermedades sistémicas manifestadas en tejidos (p. ej., alergias, diabetes, enfermedad de Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, y similares); etc.), perfil de analitos de referencia de contaminantes medioambientales (p. ej., agente de guerra, pólenes, partículas, pesticidas, etc.), perfil de analito de referencia de fármacos (p. ej., un perfil de analito característico de niveles terapéuticos de un fármaco, droga (p. ej., para facilitar la evaluación de drogas, etc.); y similares. Los perfiles de analitos de referencia pueden incluir analitos que son miembros de una o más clases de analitos (p. ej., proteínas (p. ej., anticuerpos, biomarcadores del cáncer, citoquinas, proteínas citoesqueléticas/citoplasmáticas/extracelulares, y similares), ácidos nucleicos (ADN, ARN), lípidos (que incluyen ceramidas, colesterol, fosfolípidos, etc.), moléculas pequeñas biológicamente obtenidas, fármacos (p. ej., fármacos terapéuticos, drogas), contaminantes medioambientales, agentes de guerra, etc.) o

miembros de una subclase de analitos (p. ej., anticuerpos, fosfolípidos). Los perfiles de analitos de referencia de una afección dada de interés se pueden conocer previamente en la técnica o se pueden obtener usando los métodos descritos en esta invención. Los perfiles de analitos de referencia se pueden almacenar en forma electrónica (p. ej., en una base de datos) para proporcionar la comparación fácil de un perfil de analitos de ensayo para facilitar el análisis y diagnóstico.

Un “perfil de analitos de ensayo” o “perfil de analitos para un tejido de interés” se refiere a niveles cualitativos o cuantitativos de un analito seleccionado o un conjunto de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más analitos, para facilitar diagnósticos o pronósticos de una afección de interés. Un perfil de analitos de ensayo puede incluir analitos que son miembros de una o más clases de analitos (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, moléculas pequeñas obtenidas biológicamente, fármacos (p. ej., proteínas (p. ej., anticuerpos, biomarcadores del cáncer, citoquinas, proteínas citoesqueléticas/citoplasmáticas/extracelulares, y similares), ácidos nucleicos (ADN, ARN), lípidos (que incluyen ceramidas, colesterol, fosfolípidos, etc.), moléculas pequeñas biológicamente obtenidas, fármacos (p. ej., fármacos terapéuticos, drogas), contaminantes medioambientales, agentes de guerra, etc.) o miembros de una subclase de analitos (p. ej., anticuerpos, fosfolípidos). En general, los analitos seleccionados para el análisis para generar un perfil de analitos de ensayo se seleccionan de acuerdo con analitos de un perfil de analitos de referencia deseados. La comparación de un perfil de analitos de ensayo con un perfil de analitos de referencia adecuados facilita determinar la presencia o ausencia de la afección o estado de interés, p. ej., evaluando si hay una “correspondencia” sustancial entre un perfil de analitos de ensayo y un perfil de analitos de referencia.

Los métodos para generar perfiles de analitos de referencia y de ensayo de un analito seleccionado o conjunto de analitos, se pueden llevar a cabo usando métodos disponibles en la técnica, y se seleccionarán de acuerdo con el o los analitos a evaluar.

Los métodos actuales se pueden usar para una amplia variedad de evaluaciones de tejidos. La licuación de tejido asistida por energía puede proporcionar una evaluación cuantitativa y perfil del tejido normal. La comparación del perfil del tejido normal con un perfil de tejido que se está investigando puede facilitar el diagnóstico de cambios en el microentorno del tejido (p. ej., regulación por aumento/disminución de varias proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, moléculas pequeñas, fármacos, etc.) que pueden indicar diferentes afecciones patológicas tales como alergias, enfermedad cardiovascular, dermatitis, etc. Los métodos también se pueden usar como herramienta para la vigilancia de la recuperación del tejido y evaluación de la eficacia terapéutica de diferentes tratamientos (como en la vigilancia de terapia, que se puede combinar con modificación de terapia según se desee o necesite). Los métodos de determinación de perfiles de analitos también pueden proporcionar herramientas para la industria del cuidado personal para evaluar formulaciones tópicos (p. ej., como en cosméticos). Esta metodología se puede usar para determinar parámetros farmacológicos licuando tejidos y detectando las moléculas de fármaco en los mismos. De una forma similar, también se puede llevar a cabo cuantitativamente el ensayo rápido y rutinario de productos químicos, contaminante biopeligrosos, y drogas. Los métodos también se pueden usar para la detección sensible y diagnóstico de microflora patógena.

En algunas realizaciones, los métodos actuales proporcionan un perfil de tejido normal, en donde el tejido normal se define por la ausencia de la afección del tejido anormal de interés. Se aplica energía al tejido normal, p. ej., por exposición a ultrasonidos o abrasión, en presencia de un agente que favorece la licuación. Se llevan a cabo diferentes ensayos tras la licuación de muestra de tejido para aislar e identificar los analitos presentes en el tejido.

En determinadas realizaciones, los métodos se pueden aplicar para facilitar el diagnóstico de diferentes enfermedades tisulares que se caracterizan por una evaluación cuantitativa de un cambio en el microentorno del tejido. Esta evaluación se lleva a cabo comparando un perfil de analitos de un tejido de referencia (p. ej., un perfil de analitos de referencia, que puede estar almacenado en una base de datos) con el perfil de analitos del tejido de interés (es decir, el perfil de analitos de ensayo). La presencia o la ausencia cuantitativa de un determinado analito o conjunto de analitos presentes en un tejido que se está investigando, comparado con la presencia o ausencia cuantitativa de los mismos analitos en un tejido de referencia, indicará la presencia o ausencia de una enfermedad particular, y por lo tanto facilitará el diagnóstico de la afección. El perfil de analitos de referencia puede ser uno característico del tejido que se sabe que no está afectado con la enfermedad en cuestión, o puede ser un perfil de analitos de referencia característico de la enfermedad en cuestión para el tejido en cuestión.

En una realización, el tejido que se está investigando es piel y/o membranas mucosas, y el perfil de analitos de ensayo cuantitativo se compara con un perfil de analitos de referencia para determinar la presencia o ausencia de una enfermedad tal como alergia, urticaria, infección microbiana, enfermedad autoinmunitaria, enfermedad cardiovascular o cáncer.

En algunas realizaciones, este método se puede usar para vigilar la recuperación del tejido. Esta vigilancia se lleva a cabo comparando un perfil de analitos del tejido de referencia con el perfil de analitos del tejido que se está investigando. La presencia o ausencia cuantitativa de un determinado analito o composición de analitos presentes en un tejido que se está investigando, cuando se compara con la presencia o ausencia cuantitativa de los mismos analitos en un tejido de referencia puede indicar si el tejido está volviendo o no a su estado de salud. El tejido de referencia normalmente es tejido que está en un estado sano.

En algunas realizaciones, los métodos presentes se pueden usar para evaluar el efecto terapéutico de diferentes tratamientos, incluyendo la biodisponibilidad de productos terapéuticos en tejidos de interés. El analito en la muestra de tejido licuada se puede cuantificar para indicar cuánto analito está presente en el tejido. La presencia o ausencia cuantitativa de un determinado analito o composición de analitos presentes en un tejido que se está investigando, cuando se compara con la presencia o ausencia cuantitativa de los mismos analitos de referencia, puede indicar si el agente terapéutico administrado está permaneciendo o no en el tejido específico o el cuerpo suficiente tiempo para lograr el efecto deseado. El tejido de referencia normalmente es tejido que está en estado sano.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para evaluar formulaciones terapéuticas en un tejido tal como la piel, específicamente, si el o los componentes de una formulación (p. ej., lociones, cremas, bálsamos y similares) están siendo absorbidos por el tejido, y si la cantidad suministrada es terapéuticamente eficaz. En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria pueden incluir un sistema de bucle cerrado, en el que el mismo sistema puede aplicar la formulación terapéutica, licuar los analitos, analizar el perfil de analitos y ajustar el suministro de la formulación en consecuencia. El tejido de referencia en este caso sería tejido sano, o tejido en diferentes niveles de recuperación de la afección que se está tratando con la formulación terapéutica.

En algunas realizaciones, los métodos actuales se pueden usar para determinar el perfil de analitos para usar en la determinación de parámetros farmacológicos o la eficacia de agentes farmacéuticos. La presencia o ausencia de determinados analitos (p. ej., de respuesta del sistema inmunitario, citoquinas) se puede usar para correlacionar determinadas dosis de agentes farmacéuticos con parámetros biológicos, que incluyen, pero no se limitan a biodisponibilidad, AUC, aclaramiento y semivida.

En algunas realizaciones, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para detectar la presencia o ausencia de determinados productos químicos, que incluyen, pero no se limitan a contaminantes biopeligrosos, agentes de guerra, drogas ilegales, agentes farmacéuticos conocidos, y similares. Dichos métodos son útiles, por ejemplo, en el cumplimiento de la ley, regulación de dopaje en deportes de competición, evaluación de la exposición y/o riesgo de enfermedad como resultado de la exposición a toxinas o contaminantes y similares.

En algunas realizaciones, los métodos actuales se pueden usar para detectar o diagnosticar microbios patógenos (p. ej., bacterias, hongos, virus, y similares). Las metodologías actuales para el diagnóstico microbiano en tejidos, tales como réplica en placa, técnica de hisopo y lavado, no son atractivos debido a la gran variabilidad y baja dispersión de extractos, que conduce a menor sensibilidad y alta dependencia del protocolo. Se pueden llevar a cabo diferentes ensayos tras la licuación de la muestra de tejido para aislar e identificar analitos microbianos presentes en el tejido. En algunas realizaciones, estos ensayos incluyen sembrado en placas de agar.

Suministro de fármacos

La presente invención proporciona un método que implica la licuación de un tejido de piel para así controlar y potenciar el flujo de fármacos en o a través del tejido. El método incluye las etapas de 1) aplicar energía y un medio que favorece la licuación a un tejido de un sujeto donde se desea transporte; y 2) suministrar uno o más fármacos en o a través de la piel que se va a licuar de forma continua o repetida. El método puede además incluir volver a licuar el tejido a lo largo de un periodo de tiempo durante el cual se produce el transporte. El método que comprende licuar un tejido puede alterar las propiedades de barrera de un tejido o superficie biológica, conduciendo a la reducción de la resistencia del paso del fármaco. La ventaja de la presente invención es que se mejora y controla tanto la velocidad como la eficacia de la transferencia. Los fármacos que simplemente no pasarían a través de las superficies biológicas, o pasarían a una velocidad que no es adecuada o es variable a lo largo del tiempo, son forzados en las superficies biológicas cuando se aplica la energía en combinación con un LPM. Al controlar el modo, la intensidad y el tiempo de aplicación de energía, y la formulación de un LPM, se controla la velocidad de transferencia.

El transporte de fármacos se puede modular o potenciar mediante la aplicación simultánea o posterior de una segunda fuerza directora tal como potenciadores de la permeabilidad o transporte químico, convección, gradiente de presión osmótica, gradiente de concentración, iontoforesis, electroporación, campo magnético, ultrasonidos o presión mecánica.

La potenciación del método descrito se demostró mediante el siguiente ejemplo no limitante que usa aciclovir e inulina marcada con ³H. El tipo, periodo de tiempo e intensidad de energía requeridos y la formulación de un LPM dependen de una serie de factores que incluyen el tipo de tejido y las propiedades de los fármacos, que varían de una especie a otra, con la edad, lesión o enfermedad, y situación en el cuerpo.

Fármaco que se administra

Los fármacos que se administran incluyen una variedad de agentes bioactivos, pero preferiblemente son proteínas o péptidos. Los ejemplos específicos incluyen insulina, eritropoyetina e interferón. También se pueden administrar otras sustancias, incluyendo moléculas de ácido nucleico tales como no codificantes, ARNip y genes que codifican proteínas terapéuticas, moléculas orgánicas e inorgánicas sintéticas incluyendo antiinflamatorios, antivíricos, antifúngicos, antibióticos, anestésicos locales y sacáridos. El fármaco típicamente se administrará en un vehículo farmacéuticamente aceptable que tiene un coeficiente de absorción similar al agua, tal como un gel acuoso.

Alternativamente, se puede usar un parche como vehículo. El fármaco se puede administrar en un gel, pomada loción o suspensión.

En una realización, el fármaco está en forma de o encapsulado en un dispositivo de suministro tal como liposoma, vesícula lipídica, emulsión o nanopartícula, micropartícula, microcápsula o microesfera poliméricas (denominadas colectivamente micropartículas salvo que se exponga otra cosa). Estas pueden estar formadas de polímeros tales como polihidroxiácidos, polioctoésteres, polianhídridos y polifosfazenos, o polímeros naturales tales como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos y combinaciones de los mismos. Las micropartículas se pueden recubrir o formar de materiales que potencian la penetración, tales como materiales lipófilos o moléculas hidrófilas, por ejemplo, polímeros de poli(óxido de alquileo) y conjugados tales como polietilenglicol.

Administración de fármaco

Los fármacos se administran preferiblemente usando los dispositivos de licuación mencionados, a los tejidos en el sitio seleccionado basándose en la conveniencia del paciente, así como para lograr los resultados del tratamiento deseados. En la presente invención el método se aplica preferiblemente en la piel de la cara, brazos, manos, piernas, espalda o cualquier otro sitio.

En alguna realización, el tejido al que se va a administrar es un tejido enfermo tal como órganos infecciosos, tejidos que están inflamados y tumores sólidos. En una realización determinada, la presente invención comprende usar dispositivos de licuación sobre tejidos sanos cercanos a y/o el tejido enfermo, y suministrar fármacos a través de los tejidos sanos y/o en el sitio enfermo. Los esteroides tales como los corticoesteroides y muchos otros agentes quimioterapéuticos que incluyen el fosfato de estramustina, paclitaxel y vinblastina tienen potencialmente efectos secundarios. Por lo tanto si se dan por vía sistémica, es probable que produzcan efectos secundarios indeseados. Este problema se supera suministrando estos fármacos de forma local en los tejidos enfermos. Otras indicaciones incluyen el suministro de fármacos en la piel anómala tal como psoriasis, dermatitis atópica y cicatrices.

En algunas realizaciones, la presente invención se usa para potenciar el paso de un compuesto tal como una molécula de peso molecular grande o polar a través de tejido tal como la piel, membranas mucosas (nasal, intestinal, colon, intestino, bucal, vaginal, etc.). Se logran un mayor control y uso del fármaco aumentando la velocidad y el control direccional del fármaco aplicado. El porcentaje de fármaco que entra rápidamente en el torrente sanguíneo aumenta en consecuencia y se evitan efectos secundarios indeseados. Los fármacos a través de los tejidos expuestos antes, son infundidos en el torrente sanguíneo a una velocidad óptima.

Medio que favorece la licuación (LPM) para el suministro de fármacos

Un LPM también es un componente importante para el suministro de fármacos. El diseño del LPM para el suministro de fármacos se solapa algo con el del LPM para recoger la muestra. El LPM se puede diseñar para que sirva para uno o más de los siguientes cinco propósitos: a) conecta energía a un tejido, b) facilita la licuación del tejido, c) almacena fármacos para ser administrados al tejido, d) aumenta la solubilidad de los fármacos, y e) inhibe la degradación de los fármacos de modo que se retiene su actividad biológica o química.

El LPM también puede contener un fármaco antes o durante el procedimiento de licuación del tejido. En una realización alternativa, se puede usar la aplicación de energía y el LPM que excluye un fármaco para licuar un tejido, y posteriormente se puede aplicar un fármaco en un vehículo adecuado tal como un parche en el sitio del tejido que se va a licuar.

Kits

La presente descripción también abarca kits para la práctica de los métodos presentes. Los kits presentes pueden incluir, por ejemplo, el dispositivo de aplicación de energía entero y un agente que favorece la licuación para licuar tejidos de interés, reactivos para llevar a cabo ensayos para detectar y analizar (cualitativa o cuantitativamente) la presencia o ausencia de analitos del tejido en la muestra de tejido licuada generada por los métodos descritos en la presente memoria. Los diferentes componentes del kit pueden estar presentes en envases separados, o algunos componentes compatibles se pueden combinar previamente en un solo envase, según se desee.

Además de los componentes mencionados antes, los kits típicamente incluyen además instrucciones para usar los componentes del kit para la práctica de los métodos. Las instrucciones para la práctica de los presentes métodos en general están grabadas en un medio de grabación adecuado. Por ejemplo, las instrucciones se pueden imprimir sobre un sustrato, tal como papel o plástico, etc. Por lo tanto, las instrucciones pueden estar presentes en los kits como un inserto del envase, en la etiqueta del recipiente del kit o sus componentes (es decir, asociadas con el envasado o subenvasado) etc. En otras realizaciones, las instrucciones están presentes como un fichero de datos de almacenamiento electrónico presente en un medio de almacenamiento legible por ordenador adecuado, p. ej., CD-ROM, disquete, etc. En otras realizaciones más, las instrucciones reales no están presentes en el kit, pero se proporcionan medios para obtener instrucciones de una fuente remota, p. ej., por internet. Un ejemplo de esta realización es un kit que incluye una dirección de internet donde se pueden ver las instrucciones y/o de la que se pueden descargar las instrucciones. Como con las instrucciones, este medio para obtener instrucciones está

grabado en un sustrato adecuado.

Ejemplos

Ejemplo 1

Obtención de muestra de piel mediante un dispositivo basado en energía abrasiva

5 Con referencia a las figuras 7a a 7e, se describe un dispositivo de licuación de tejido basado en energía abrasiva. El dispositivo se ensambla a partir de tres componentes, 751 (conjunto del bastidor del dispositivo 701 que contiene el motor 704 y componentes de conductividad eléctrica 705 y 706); 752 (conjunto desechable del cartucho de LPM 708, recipiente de recolección 707 y aguja 709); y 753 (conjunto desechable del bastidor del LPM 712, almohadilla abrasiva 711 y eje 710) (figura 7a). El dispositivo ensamblado se pone contra una región previamente identificada de interés sobre la piel 713, de modo que la almohadilla abrasiva 711 esté de cara a la piel 713 (figura 7b). El émbolo deslizante 702 situado en la parte superior del dispositivo se empuja contra la piel, que empuja la aguja 709 dentro del cartucho de LPM 708, rompiendo su cierre estéril y transfiere el LPM al bastidor 712. El émbolo deslizante 702 también activa el motor 704 mediante el paquete de baterías 703, poniendo el eje 710 y la almohadilla abrasiva 711 en movimiento giratorio contra el tejido de piel 713. Al licuar el tejido cutáneo, los componentes del tejido se disuelven en LPM que se encuentra en el bastidor 712. Simultáneamente también se mide la conductividad eléctrica del tejido de piel 713 usando el contacto deslizante 705 sujeto al eje 710 como electrodo de medida y el electrodo de referencia 706. Una vez que se ha alcanzado el límite de exposición de energía segura determinado por la conductividad eléctrica umbral, se detiene el motor 704. El émbolo deslizante 702 se empuja más hacia la piel de modo que la aguja 709 perfora un recipiente de muestra al que se ha hecho el vacío previamente 707, el cual aspira la muestra del bastidor 712 en el mismo (figura 7d). El dispositivo se retira de la piel y se desmonta. Se desmonta además el componente del dispositivo 752 y el recipiente de muestra 707 se procesa para la detección de analitos.

Ejemplo 2

Obtención de muestra de piel mediante un dispositivo basado en microaguja

25 Con referencia a las figuras 8a a 8d, se describe un dispositivo de licuación de tejido basado en microaguja para la obtención de muestra de tejido. El dispositivo se pone contra una región previamente identificada de interés sobre la piel 807, de modo que el parche que lleva microagujas 805 está de cara a la piel 807 (figura 8a). El émbolo deslizante 801 situado en la parte superior del dispositivo se empuja hacia la piel 807 de modo que la esponja empapada en LPM 804 se exprime y libera el LPM en el bastidor 803 (figura 8b). Por consiguiente, las microagujas en el parche 805 y el bastidor 803 en la interfase de la piel están cargadas de LPM. Para iniciar el procedimiento de licuación, el émbolo deslizante 801 se empuja más en el tejido de piel 807 conduciendo a la inserción de las microagujas 805 en el tejido de piel 807 (figura 8c)). Cuando se licua el tejido de piel, se disuelven los componentes de tejido en el LPM contenido en el bastidor 803. Tras completarse la licuación de la piel, el recipiente de muestra al que se ha hecho el vacío previamente 802 se empuja hacia el tejido de piel 807 de modo que la aguja 806 perfora el recipiente de muestra 802 produciendo la aspiración de la muestra del bastidor 803 en el mismo (figura 8d). El dispositivo se retira de la piel y se desmonta. Se recupera el recipiente de muestra 802 para el análisis de analitos y el resto de los componentes del dispositivo se desechan.

Ejemplo 3

Bastidor de depósito para capturar analitos del tejido

40 Con referencia a la figura 9 (paneles a - d) se describe un diseño para un bastidor de depósito para capturar analitos del tejido de las muestras de tejido licuado. El bastidor de depósito (901) está dirigido a usarse con dispositivos de aplicación de energía descritos en la presente memoria, como un recipiente para recoger la muestra de tejido licuada. El bastidor está recubierto con sustratos de captura (902) que se unen selectivamente a analitos del tejido (903) presentes en la muestra. Tras suficiente incubación de la muestra de tejido, la muestra se descarta mientras que los analitos (903) se mantienen en el bastidor. Los analitos se eluyen mediante un tampón de elución en el batidor para la posterior captura de los analitos como una muestra separada (904). Alternativamente, el bastidor puede estar integrado en una herramienta analítica para analizar los analitos unidos (903).

Ejemplo 4

Formulaciones de tensioactivos para la solubilización de tejido potenciada y retención de funcionalidad de las proteínas

50 Se identificaron formulaciones de tensioactivos únicas que componen el medio que favorece la licuación (LPM) según la definición descrita en este texto. Se creó una biblioteca de 153 formulaciones de tensioactivos binarias usando 19 tensioactivos que pertenecían a cuatro categorías diferentes: (i) tensioactivos aniónicos (lauril sulfato sódico (SLS), lauril éter sulfato sódico (SLA), tridecil-fosfato sódico (TDP), desoxicolato sódico (SDC), decanoil-sarcosinato sódico (NDS), lauroil-sarosinato sódico (NLS), palmitoil-sarosinato sódico (NPS)); (ii) tensioactivos catiónicos (cloruro de octiltrimetilamonio (OTAB), cloruro de dodeciltrimetilamonio (DDTAB), cloruro de

tetradeciltrimetilamonio (TTAB)); (iii) tensioactivos de ion híbrido (3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propano-sulfonato (CHAPS), 3-(decildimetilamonio)propano-sulfonato (DPS), 3-(dodecildimetilamonio)propano-sulfonato (DDPS)); (iv) tensioactivos no iónico (éter dodecílico de polietilenglicol (B30), éter laurílico de polioxietileno-23 (B35), éter cetílico de polioxietileno-10 (B56), éter estearílico de polioxietileno-2 (B72), éter oleílico de polietilenglicol (B93), éter de nonilfenol y polietilenglicol (NP9)). Tradicionalmente solo se han usado uno cuantos tensioactivos de estas categorías (por ejemplo, tensioactivos no iónico) para la extracción de proteoma de tejido funcional. Además, estos tensioactivos están muy limitados en su capacidad para solubilizar eficazmente constituyentes de tejidos. Como tal, a lo largo de todos los tipos de tensioactivos, el potencial de extracción y la conservación de la bioactividad de los constituyentes del tejido se consideran en gran medida propiedades mutuamente en conflicto. Mediante la combinación de tensioactivos no iónicos con otros tipos de tensioactivos que se han descrito previamente por su alta capacidad de solubilización (tensioactivos aniónicos, catiónicos y de ion híbrido), se muestra el descubrimiento de nuevas familias de formulaciones de tensioactivos que tienen simultáneamente solubilización superior así como capacidad no desnaturizante.

La biblioteca de tensioactivos se cribó primero para identificar formulaciones de tensioactivos no desnaturizantes que retenían la bioactividad de las proteínas en los extractos, y posteriormente se clasificó según la capacidad de las formulaciones para solubilizar las proteínas de tejidos. La figura 10a muestra la potencia de 153 formulaciones de tensioactivos para conservar la funcionalidad específica de una proteína modelo, el anticuerpo IgE. Específicamente, se ensayó la capacidad de unión del anticuerpo IgE con ovoalbúmina. El eje x en esta figura representa el índice de formulación único para cada formulación binaria. El eje y representa el % de retención de la bioactividad de la IgE, definido como la actividad de unión de IgE fraccionaria en la formulación de tensioactivos comparado con la actividad de unión de la IgE cuando los tensioactivos están en disolvente puro (disolución salina tamponada con fosfato, PBS). Las formulaciones abarcaban una amplia variedad de potenciales desnaturizantes. Sorprendentemente, un número creciente de tensioactivos desnaturizantes tras la combinación con tensioactivo no iónico más suave, dieron una alta ganancia de sinergia en la retención de la funcionalidad de la IgE. Se encontró que el potencial no desnaturizante, promediado de todas las formulaciones de tensioactivos binarias era significativamente mayor que las formulaciones de sus tensioactivos constituyentes individuales ($p < 0,006$; prueba t de Student heterocedástica de dos colas); demostrando además interacciones sinérgicas únicas.

Las formulaciones de tensioactivos que presentaban alta retención de la bioactividad ($\geq 90\%$) se cribaron además según su capacidad para extraer proteínas del tejido junto con un breve tratamiento con ultrasonidos. Se usó piel porcina como un tejido modelo para estos estudios. Aunque una mayoría de las formulaciones puso de manifiesto un potencial de extracción cercano a $0,1 \text{ mg}$ de proteínas por cm^2 de tejido de piel, solo un par de formulaciones lograron una extracción de proteínas que superaba $0,3 \text{ mg/cm}^2$ (figura 10b).

Los candidatos destacados cribados de la biblioteca de tensioactivos en general dieron lugar a formulaciones que eran excepcionalmente no desnaturizantes, incluso más eficaces en la solubilización de tejidos que algunos de los tensioactivos de extracción más ampliamente usados descritos en la bibliografía. La figura 10c compara la formulación de tensioactivos destacados, DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v), con SDS al 1% (p/v) SDS para obtener muestras de la piel. A pesar de una capacidad de extracción moderada ($0,16 \pm 0,07 \text{ mg/cm}^2$), el SDS es muy desnaturizante lo que produce un bajo rendimiento de la recuperación de proteínas funcionales (producto de bioactividad fraccionaria retenida y proteína extraída total). En cambio, la formulación de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v) no solo extrae más proteínas de la piel ($0,48 \pm 0,12 \text{ mg/cm}^2$) sino que también conserva la actividad de las proteínas, dando una potenciación de más de 100 veces en la recuperación de proteínas funcionales esperada frente al SDS. Igualmente, se logró recuperación de proteína de más de 10 veces frente al tensioactivo no desnaturizante usado habitualmente Triton X-100 y PBS al 1% (p/v).

Ejemplo 5:

Retención de la bioactividad bajo tensión

Los autores de la invención muestran que las formulaciones de tensioactivas únicas, o LPM (identificadas por el método descrito en el ejemplo 1), protegen adicionalmente una variedad de analitos bajo tensión. Muestran específicamente que los efectos desnaturizantes de la energía mecánica tal como la exposición a ultrasonidos (un desnaturizante de biomoléculas normalmente conocido), se pueden neutralizar usando formulaciones de tensioactivos únicas.

En experimentos separados, una proteína globular (IgE) y dos enzimas representativas, la lactato deshidrogenasa (LDH) y la beta-galactosidasa (β -Gal), se disolvieron en la formulación de tensioactivos de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v), y se trataron con ultrasonidos para determinar la retención de la bioactividad de las proteínas a lo largo del tiempo. Se prepararon proteínas disueltas en disolución salina (PBS) como testigos comparativos. Se observó una disminución progresiva fuerte en la funcionalidad para la IgE disuelta en PBS; sin embargo, la formulación de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v), sorprendentemente extendió la protección a las proteínas IgE frente a la tensión desnaturizante de los ultrasonidos (figura 11a). Independientemente del tratamiento con ultrasonidos, la IgE disuelta en SDS mostró un estado completo de desnaturización. Se observaron tendencias similares en la conservación extendida de las actividades enzimáticas para la LDH y β -Gal preparadas en formulación de DPS-B30 al $0,5\%$ (p/v) (figura 11b). La preparación de proteína en PBS dio como resultado la pérdida significativa de bioactividad ($p < 0,006$; prueba t de

Student heterocedástica de dos colas), que da una bioactividad fraccionara de 16,7% (IgE), 70,8% (LDH) y 68,7% (β -Gal) después de 3 minutos de ultrasonidos.

Ejemplo 6

Obtención de muestra de tejido y diagnósticos moleculares

- 5 Se demostró la capacidad de la exposición a ultrasonidos en presencia de LPM (disolución salina de DPS-B30 al 0,5% (p/v)) para obtener muestras de una variedad de biomarcadores de enfermedad funcionales de tejidos.

Se demostró la obtención de muestra de anticuerpos IgE específicos de alergia de la piel de ratones alérgicos al huevo. Se adquirieron ratones BALB/CJ hembra de 6 a 8 semanas de edad de Charles River Labs (Wilmington, MA) y se mantuvieron en condiciones exentas de patógenos. La reacción alérgica se indujo en los ratones por un protocolo de exposición epicutánea. Después de anestesia con isoflurano al 1,25-4% en oxígeno, la piel del dorso de los ratones se afeitó y después se despegó una cinta adhesiva 10 veces (Scotch Magic tape, 3M Health Care, St Paul, MN) para introducir una lesión en la piel normalizada. Se puso un parche de gasa (1 cm x 1 cm) empapado con 100 μ l de OVA al 0,1% sobre la piel del dorso y se sujetó con una cinta adhesiva basada en tela elástica transpirable. Los parches se mantuvieron fijos durante 1 semana. El experimento completo comprendía un total de tres exposiciones de 1 semana con un intervalo de 2 semanas entre cada semana de exposición. La obtención de muestra se llevó a cabo pegando una cámara con brida hecha a medida (área de exposición de la piel de 1,33 cm²) a la zona de la piel afeitada con una cantidad mínima de adhesivo basado en cianoacrilato. La cámara se llenó con 1,8 ml de formulación de tensioactivos de DPS-B30 al 0,5% (p/v) y se aplicaron ultrasonidos a 20 kHz con un ciclo de trabajo de 50%, 2,4 W/cm² durante 5 minutos. Se obtuvieron biopsias de los sitios de piel con eczema tratados con ultrasonidos y no tratados, y se prepararon muestras de homogeneizado de piel como testigos positivos. La figura 12a muestra que la obtención de muestra asistida por ultrasonidos obtuvo muestras satisfactoriamente con significativamente más cantidad de anticuerpos IgE específicos de alergia de la piel de ratón alérgico comparado con ratones sanos. Como se esperaba, no se vio diferencia entre la cantidad de anticuerpos IgG en las muestras de las pieles de ratones alérgicos y sanos.

25 También se demostró la obtención de muestra de colesterol de la piel de ratón. Con procedimientos similares a los descritos en el párrafo anterior, se recogieron muestras de piel con el procedimiento de ultrasonidos. Se prepararon homogeneizados de piel como testigos positivos de biopsias recogidas de piel sin tratar. El colesterol de la piel es un biomarcador importante para el diagnóstico de enfermedad cardiovascular [1]. La figura 12b muestra que la obtención de muestra asistida por ultrasonidos obtiene muestras de colesterol satisfactoriamente de la piel y la cantidad de muestra obtenida es comparable al colesterol presente en el homogeneizado de la piel.

Por último, se demostró la obtención de muestras de genoma bacteriano de piel porcina. Los tejidos, en particular la piel y membranas mucosas son colonizadas por un conjunto diverso de microorganismos que incluyen bacterias, hongos y virus [2-5]. El diagnóstico preciso de la infección bacteriana conduce al tratamiento adecuado del paciente, proporcionando información sobre el pronóstico y permitiendo el uso de un antibiótico de espectro estrecho [6-8]. Por lo tanto, la detección definitiva de microorganismos es esencial para el diagnóstico para el tratamiento de la infección y rastrear el foco de enfermedades asociadas con infecciones microbianas. Sin embargo, la obtención de muestras de forma precisa que representen microorganismos en la piel, es un reto importante [2]. El método más práctico de recolección sería mediante hisopo porque es sencillo, rápido y no invasivo [3,9]. Sin embargo, la obtención de muestra con hisopo tiene varias limitaciones que incluyen recuperaciones pobres de los microorganismos y falta de un protocolo estandarizado, lo que sugiere que no representan de forma precisa los microorganismos en la piel ni proporcionan datos cuantitativos. La obtención de muestras asistida por ultrasonidos puede abordar eficazmente estas limitaciones. En particular, se obtuvo muestra de piel porcina extirpada, mediante hisopo con una bola de algodón empapada en disolución salina (PBS), y mediante obtención de muestra asistida con ultrasonidos con DPS-Brij30 al 0,5% (p/v) como LPM en experimentos separados. Se purificó el genoma bacteriano de cada muestra por el método de extracción con fenol-cloroformo convencional. Brevemente, las muestras primero se incubaron en una disolución que consistía en Tris 20 mM a pH 8,0 (BP154-1, Fisher Scientific), EDTA 2 mM (BP120-500, Fisher Scientific), Triton X-100 al 1,2% (BP151-100, Fisher Scientific), y lisozima 20 mg/ml (62970-1G-F, Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37°C [9]. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 3 horas a 37°C en una disolución que consistía en Proteinasa K 0,1 mg/ml (P2308-25MG, Sigma-Aldrich), lauril-sulfato sódico al 0,5% (p/v) (S529, Fisher Scientific), y cloruro sódico 100 mM (BP358-1, Fisher Scientific). Después se extrajo el ADN genómico con un volumen igual de fenol (P4557, Sigma-Aldrich), seguido de extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, 25:24:1 (P2069, Sigma-Aldrich). El ADN se precipitó por incubación con etanol y se centrifugó durante 20 min. Los sedimentos de ADN se lavaron dos veces con etanol al 70%, se dejaron secar y se volvieron a suspender en 80 μ l de tampón tris. La cantidad de bacterias obtenidas en la muestra por cada metodología se evaluó determinando la presencia del gen bacteriano 16S conservado en cada muestra usando la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR). La figura 12c muestra que la obtención de muestra asistida por ultrasonidos obtenía muestras con una cantidad al menos 7 veces mayor de genoma bacteriano de la piel que por el procedimiento convencional de hisopo de algodón.

Ejemplo 7

Diseño de tampón de LPM compatible con ensayos basados en ácidos nucleicos

Para asegurar la compatibilidad de las muestras de tejido licuadas con los posteriores análisis, los componentes de los LPM deben elegirse con cuidado. Se ensayó la compatibilidad de varios componentes con la técnica analítica basada en ácidos nucleicos. Específicamente, se evaluó la compatibilidad de los componentes del LPM con la qPCR, el ensayo basado en genes más común, midiendo la capacidad del ensayo para amplificar ADN plasmídico añadido en diferentes LPM.

Se enriquecieron con 10 millones de copias de plásmido de luciferasa (E1741, Promega Corp.) 10 µl de diferentes disoluciones: (i) agua, (ii) cloruro sódico al 0,91% (p/v) (BP358-1, Fisher Scientific) en agua, (iii) PBS (P4417, Sigma-Aldrich), (iv) Tris-HCl 10 mM, pH 7,9 (BP154-1, Fisher Scientific), (v) tampón de fosfato sódico 0,075 M, pH 7,9, derivado de fosfato sódico monobásico monohidrato y fosfato sódico dibásico (S9638-25G, S7907-100G, Sigma-Aldrich), y (vi) EDTA 0,5 mM (BP120-500, Fisher Scientific) en agua. Las disoluciones se combinaron con 10 µl de tampón de reacción de PCR. Los cebadores de amplificación de la luciferasa eran 5'-GCC TGA AGT CTC TGA TTA AGT-3' para el cebador directo 5'-ACA CCT GCG TCG AAG-3' para el cebador inverso, creando un amplicón de 96 pb [10]. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en 20 µl de una disolución que contenía MgCl₂ 1,5 mM, cebadores 0,2 µM (cada uno), y dNTP 0,2 mM en tampón de PCR y 0,025 unidades/µl de polimerasa Taq (10966-034, Invitrogen) y SYBR-green (S-7563, Invitrogen) en relación 1:45.000. Se diluyeron partes alícuotas del ADN plasmídico en agua para generar una curva patrón. El análisis se llevó a cabo en una máquina de PCR iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando placas de 96 pocillos de calidad óptica. El ciclo térmico de la reacción se ajustó como sigue: desnaturalización inicial 95° durante 3 min, seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 s, 30 s de reasociación a 60°C y 30 s de elongación a 72°, todos seguidos de una extensión final de 10 min a 72°C. Para cada muestra, se llevaron a cabo 3 repeticiones. Se calculó la compatibilidad para cada tampón comparando con el control (ADN plasmídico en agua).

La figura 13 muestra que el cloruro sódico, PBS y tampón de fosfato sódico eran incompatibles como tampón de detección para el ensayo de PCR cuantitativa comparado con el control. Sin embargo, el uso de tris-HCl o EDTA como tampón aumentó la capacidad de detección del análisis analítico.

Ejemplo 8

Compatibilidad de los LPM con los ensayos basados en ácidos nucleicos

Se ensayó la compatibilidad de diferentes LPM (descritos en el ejemplo 1) con ensayos basados en ácidos nucleicos existentes. Específicamente, se mezcló ADN plasmídico con diferentes LPM y se evaluó la capacidad de la qPCR para amplificar el ADN. Los LPM se prepararon añadiendo tensioactivos a diferentes concentraciones en tampón de Tris-HCl 10 mM. Para imitar el procedimiento de licuación de tejidos como se describe en este texto, se mezcló cada LPM con 0,2 mg/ml de homogeneizado de piel de cerdo y se enriquecieron con 10 millones de copias de luciferasa (E1741, Promega Corp.) por 10 µl de LPM. Esta disolución se combinó con 10 µl de tampón de reacción de PCR. La qPCR se llevó a cabo de acuerdo con el protocolo descrito en el ejemplo 4. El ADN plasmídico purificado se diluyó en una disolución de Tris-HCl para generar una curva patrón. La compatibilidad de cada LPM se calculó determinando la cantidad de plásmido amplificado por qPCR y comparándola con el tampón de control (ADN plasmídico en Tris-HCl sin tensioactivo).

La figura 14 muestra que X-100, Brij 30, DMSO, OTAB, OTAB-Brij 30, y DPS-Brij 30 eran muy compatibles con la PCR cuantitativa; sin embargo, los LPM que consistían en NLS o NLS-Brij30 no amplificaron el ADN. En especial, DPS-Brij 30 como un LPM obtiene muestras eficazmente de biomoléculas de tejidos, retiene la actividad de las proteínas y es compatible con métodos analíticos que incluyen ELISA, cromatografía y qPCR. Por lo tanto, DPS-Brij 30 es el más conveniente como medio que favorece la licuación para analizar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Triton X-100 y DMSO, que se conocen como facilitadores de la PCR [11], mostraron consistentemente la producción eficaz de reacciones en cadena de la polimerasa; sin embargo, no dan rendimiento satisfactorio en la extracción de tejidos.

Ejemplo 9

Identificación de los parámetros de ultrasonidos para obtener muestras viables y microorganismos genéticamente intactos de tejidos

Este ejemplo describe unas condiciones no letales de ultrasonidos para recoger eficazmente organismos vivos de tejidos. Los microorganismos se pueden recoger de tejidos aplicando diferentes formas de energía a los tejidos; sin embargo, el uso de energías altas es muy perjudicial para la viabilidad de los microorganismos. Por lo tanto, es esencial encontrar condiciones no letales de aplicación de energía para obtener muestras de microorganismos vivos. Se describe la exposición a ultrasonidos para la obtención de muestras viables y bacterias genéticamente intactas.

Se desarrollaron cultivos de bacterias de la cepa de *E. Coli* DH10α (18290-015, Invitrogen) en Luria-Bertani (BP1426, Fisher Scientific) a 37°C, 250 rpm o como un cultivo sólido en placas de Agar (37°C). El cultivo se recogió por centrifugación y el sedimento resultante se suspendió en LPM que comprendía Tris-HCl 10 mM, pH 7,9 a una concentración de 10⁹ células/ml. Las células de *E. Coli* se cuantificaron con un espectrofotómetro (Biophotometer,

Eppendorf), y se consideró que un cultivo bacteriano de $0,25 \times 10^9$ células/ml correspondía a un valor de absorbancia de densidad óptica de 0,25 a una longitud de onda de 600 nm. Se puso 1 ml de las células resuspendidas en un recipiente cilíndrico esterilizado (diámetro interno 20 mm, base plana, espesor de la pared 1,3 mm, altura 31 mm). Todos los experimentos se llevaron a cabo con un dispositivo de ultrasonidos de 600 Watt (Sonics & Materials, Newtown, CT) trabajando a una frecuencia de 20 kHz en ciclo de trabajo al 50%. En este experimento variaron el ajuste de potencia y el tiempo de exposición a ultrasonidos. El transductor se bajó al recipiente hasta que la sonda estaba sumergida en el fluido a una distancia de 5 mm del fondo. El transductor se esterilizó con etanol al 70% entre los procedimientos de ultrasonidos en diferentes muestras. Después de los ultrasonidos, se prepararon diluciones seriadas de 10 veces de cada muestra en Tris-HCl 10 mM (pH 7,9). Se pusieron en placa 100 μ l de muestra de cada etapa de dilución en agar Luria-Bertani y se extendió con un extensor estéril. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y se hicieron los recuentos de las colonias bacterianas viables en la superficie de las placas de agar. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de viabilidad con respecto a testigos no tratados con ultrasonidos. Para evaluar la integridad del genoma bacteriano en las muestras expuestas a ultrasonidos, se llevó a cabo la electroforesis. Todas las muestras se incubaron a 56°C en proteinasa K (19131, Qiagen) y lauril-sulfato sódico al 0,5% (p/v) (S529, Fisher Scientific). Después de 1 h de incubación, se extrajo el ADN genómico total usando el kit de extracción DNeasy DNA (69504, Qiagen). Se siguió el protocolo convencional para los kits en todas las etapas posteriores. El ADN genómico purificado se volvió a suspender en 400 μ l de tampón AE y se almacenó a -20°C hasta el análisis. El ADN purificado se trató por electroforesis durante 90 min a 100 V en un gel de Tris-acetato-EDTA-agarosa al 2% (p/v). Los geles se tiñeron con SYBR Gold (S11494, Invitrogen) y se visualizaron con luz UV.

La figura 15 muestra que la viabilidad de *E. coli* expuesta a ultrasonidos a una intensidad de $1,7 \text{ W/cm}^2$ durante hasta 2 min era estadísticamente insignificante respecto a la viabilidad de las muestras de *E. coli* no tratadas. Esto sugiere que estas condiciones de licuación con ultrasonidos se pueden usar para la obtención de muestras de bacterias sin una pérdida importante de viabilidad. Sin embargo, las muestras tratadas con ultrasonidos a una potencia de salida mayor presentaban una disminución más rápida con el tiempo de aplicación, y las viabilidades celulares eran significativamente diferentes comparadas con las células no tratadas. Incluso después de 1 min de exposición a mayor intensidad, la viabilidad se redujo a 3,6% ($p < 0,05$). Esta observación está de acuerdo con la integridad del genoma bacteriano evaluada por electroforesis (figura 16). No se observó daño al genoma bacteriano tras tratamiento con ultrasonidos durante 2 minutos a $1,7 \text{ W/cm}^2$ (las condiciones mostraban mantener la viabilidad celular); sin embargo, a diferencia de esto, el ADN genómico de las células de *E. coli* tratadas con ultrasonidos con intensidades de $1,7 \text{ W/cm}^2$ (32% de viabilidad) y $2,4 \text{ W/cm}^2$ (8% de viabilidad) durante 3 min estaba muy fragmentado como puede verse por su migración a la parte del gel de peso molecular menor. Estos resultados sugieren que la obtención de bacterias vivas debería llevarse a cabo con una intensidad de ultrasonidos de $1,7 \text{ W/cm}^2$ durante hasta 2 min.

35 Ejemplo 10

Detección de microorganismos vivos de tejidos

Una breve exposición a energía ultrasónica acoplada con LPM (tampón de tris-HCl) puede obtener muestras de bacterias viables de la piel. Las bacterias de la piel obtenidas en las muestras por ultrasonidos se cuantificaron por el ensayo de recuento de colonias convencional, así como por la PCR cuantitativa en tiempo real, y se evaluaron comparando con métodos de obtención de muestra convencionales tales como la técnica del hisopo y el raspado con tensoactivo.

Los experimentos in vitro se llevaron a cabo en piel porcina para evaluar la obtención de muestra de bacterias residentes en la piel. Se adquirió piel porcina de espesor completo congelada precortada obtenida de la región abdominal lateral de cerdos Yorkshire en tiras de 10 cm x 25 cm de Lampire Biological Laboratories Inc., PA. La piel se almacenó a -70°C hasta el experimento. Se descongelaron trozos de piel sin imperfecciones visibles tales como arañazos y abrasiones, a temperatura ambiente y se cortaron en trozos pequeños (2,5 cm x 2,5 cm) y se montaron en una celda de difusión de Franz (PermeGear, Hellertown, PA, EE-UU.). La cámara de recepción de las celdas de difusión se llenó con disolución salina tamponada con fosfato (PBS) (P4417, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y la cámara donadora (área de exposición de la piel $1,77 \text{ cm}^2$) se llenó con 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,9), que también actuaba como fluido de acoplamiento entre el transductor de ultrasonidos y la piel. El transductor de ultrasonidos se puso a una distancia de 5 mm de la superficie de la piel y se aplicó una intensidad de ultrasonidos de $1,7 \text{ W/cm}^2$ durante 2 min. La sonda se desinfectó con etanol al 70% entre experimentos de diferentes muestras. Como testigos comparativos, se obtuvieron muestras de la piel mediante hisopo. Se empaparon hisopos de algodón (B4320115, BD Diagnostics) en disolución salina tamponada con fosfato esterilizada. El área del sitio de la muestra se estandarizó manteniendo un anillo metálico esterilizado que encerraba un área de $3,3 \text{ cm}^2$ sobre la superficie de la piel. La superficie de la piel se frotó suave y repetidamente durante aproximadamente 20 segundos. Cada hisopo se extrajo con 1 ml de PBS. También se obtuvieron muestras de bacterias de la piel mediante la técnica de raspado con tensoactivo de Williamson y Kligman [2, 12]. Se sujetó firmemente un anillo metálico estéril contra la superficie de la piel y se añadió mediante pipeta en el mismo 1 ml de Triton X-100 al 0,1% en tampón de fosfato 0,075 M, pH 7,9. La superficie de la piel dentro del anillo se frotó firmemente durante 1 min con un raspador de células de Teflon y la muestra resultante se recogió en un tubo de centrífuga estéril. El procedimiento se repitió en el mismo sitio de la piel durante dos veces adicionales y se mezclaron las muestras. Se hicieron diluciones seriadas de 10 veces de

5 cada muestra y se pusieron partes alícuotas de 100 µl de cada muestra diluida en placas de agar de Tryptic Soy (90002, BD Diagnostics) [12]. Posteriormente las placas se incubaron en condiciones aerobias a 37°C durante 24 horas y se contaron las colonias para obtener una estimación de la eficacia de extracción calculando las unidades formadoras de colonia por área unitaria de piel de la muestra (UFC/cm²). Para cuantificar las bacterias totales, se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real basada en un amplicón del gen 16S rARN. Todas las muestras biológicas primero se incubaron en una preparación de tampón de lisis enzimático (Tris 20 mM a pH 8,0, EDTA 2 mM, Triton X-100 1,2%) y lisozimas (20 mg/ml) durante 30 min a 37°C [9]. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 1 hora a 56°C en tampón AL y Proteínasa K del kit de extracción DNeasy DNA (Qiagen). Se siguió el protocolo convencional para el kit para todas las etapas posteriores. El ADN eluido por el tampón AE precipitó por 10 incubación con volúmenes iguales de isopropanol absoluto y después centrifugando durante 20 min. Los sedimentos de ADN se lavaron una vez con etanol al 70%, se dejaron secar y se volvieron a suspender en 80 µl de tampón AE. También se prepararon testigos negativos usando hisopos de algodón estériles no tratados en PBS. El análisis de los genes 16S se llevó a cabo en una máquina de PCR iCycler (Bio-Rad Laboratories, Inc.) usando placas de 96 pocillos de calidad óptica. Una parte del gen 16S bacteriano se amplificó usando el cebador directo 63F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y el cebador inverso 355R (5'-GACGGGCGGTGTGTRCA-3' [9, 13]. Se construyó una curva patrón amplificando diluciones seriadas del ADN genómico de cantidades conocidas de células de *E. Coli* en 10 µl de tampón AE. Se mezclaron 10 µl de ADN purificado con 2 pmol de cada cebador y Platinum PCR Supermix (11784, Invitrogen) hasta un volumen de reacción final de 20 µl. Los ciclos térmicos se establecieron como sigue: desnaturalización inicial a 94° durante 5 min, seguido de 32 ciclos de una desnaturalización de 30 s a 94°C, 30 s de reasociación a 66°C, y 30 s de elongación a 72°C, todos seguidos por una extensión final de 10 min a 72°C. Se hicieron 3 repeticiones para cada muestra.

25 La figura 17 muestra la comparación de las eficacias de la obtención de muestra de diferentes técnicas. La figura 17a muestra que la obtención de muestra con ultrasonidos recuperaba un número de bacterias de la piel aproximadamente 17 veces mayor que con el hisopo de algodón ($p < 0,05$). En especial, los recuentos del número total de bacterias recogidas por ultrasonidos no diferían significativamente de los del testigo positivo (método de raspado con tensioactivo). La eficacia de la obtención de muestra se ensayó además usando la PCR en tiempo real cuantitativa basada en la amplificación del gen bacteriano 16S rDNA (figura 17b). Consistentemente, con ultrasonidos se recogieron $1,7 \times 10^4$ bacterias/cm² que es significativamente mayor que con hisopo ($4,5 \times 10^3$ bacterias/cm²) y equivalente a la técnica de raspado ($1,6 \times 10^4$ bacterias/cm²).

30 Ejemplo 11

Uso de potenciadores de la sensibilidad para facilitar la detección de IgE humana en el LPM

35 Se ensayó la capacidad de potenciadores de la sensibilidad para facilitar la detección de un analito modelo, el anticuerpo IgE humano, que se disolvió en un LPM modelo, NLS-Brij 30 al 1% en p/v en un PBS. Se usó el ensayo de ELISA para evaluar la detección del anticuerpo IgE humano en presencia o ausencia de potenciadores de la sensibilidad en LPM. Específicamente, se aplicó 1 microgramo de anticuerpos (A80-108A, Bethyl laboratory, TX) con unión específica a anticuerpos IgE humanos como recubrimiento por pocillo de una placa ELISA de 96 pocillos. La IgE humana (RC80-108, Bethyl laboratory, TX) se disolvió en el LPM con o sin potenciador de la sensibilidad en una concentración de 0-100 ng/ml. Como testigo positivo, se prepararon muestras de IgE humana disolviendo en un diluyente convencional que contenía BSA al 1% p/v y Tween 20 al 0,05% p/v (P7949, Sigma-Aldrich, MO) en 40 disolución salina tamponada con Tris 50 mM (T6664, Sigma-Aldrich, MO) que se usa habitualmente en inmunoensayos. Se formularon dos tipos de potenciadores de la sensibilidad: BSA al 10% y Tween 20 al 0,5% en PBS y BSA al 10% y Tween 20 al 0,5% en disolución salina tamponada con Tris 50 mM Tris. Cada uno de estos potenciadores de la sensibilidad se añadió por separado a LPM que contenía IgE en una relación 1:10. Después de 45 30 minutos de incubación de las placas ELISA con un tampón de bloqueo convencional, estas muestras se incubaron en pocillos individuales durante 1 hora. Después de lavar los pocillos, se incubaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP en una concentración de 1 microgramo/ml en cada pocillo durante 1 hora. Después de lavado, se midió una señal quimioluminiscente basada en HRP (inducida por sustratos 54-61-00, KPL, MD), que significaba la capacidad de detección de anticuerpos IgE por ELISA, para cada caso de ensayo usando un espectrofotómetro.

50 La figura 18 representa gráficamente la intensidad de la señal de quimioluminiscencia de diferentes casos de ensayo en función de la concentración de analito. Los resultados muestran que el propio LPM no era un reactivo de detección adecuado para el ensayo de ELISA comparado con el control positivo. Sin embargo, la adición de potenciadores de la sensibilidad al LPM aumentó la capacidad de detección del ensayo analítico. Además, se mostró que la disolución salina tamponada con tris elevaba la intensidad de la señal comparado con la disolución salina 55 tamponada con fosfato, cuando se usan como disolvente para preparar potenciadores de la sensibilidad. Estos resultados demostraban que el propio LPM no es eficaz para facilitar la detección de analitos por ELISA; sin embargo, la adición de potenciadores de la sensibilidad puede potenciar significativamente la capacidad de detección de analitos por ELISA.

Ejemplo 12

60 Suministro de inulina y aciclovir a la piel de cerdo

5 Se llevaron a cabo experimentos de suministro de fármaco en piel de cerdo in vitro. Se obtuvo piel porcina de espesor completo congelada precortada, recogida de la región abdominal lateral de cerdos Yorkshire de Lampire Biological Laboratories Inc., PA. La piel se almacenó en congelador a -80°C antes del experimento. La piel se descongeló a temperatura ambiente, y la piel que no tenía imperfecciones visibles tales como arañazos y abrasiones se cortó en trozos pequeños ($2,5 \times 2,5 \text{ cm}$). Los trozos de piel se montaron en una celda de difusión de Franz (PermeGear, Hellertown, PA, EE-UU.). Antes de cada experimento, el compartimento receptor se llenó con un LPM o disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se eligió una mezcla al 1% en p/v de NLS y Brij 30 en PBS como una formulación modelo de un LPM. Antes de cada experimento, se midió la conductividad eléctrica de la piel para asegurar su integridad. La piel se consideró dañada si la conductividad inicial era más de $2,2 \text{ microA/cm}^2$. Se aplicaron ultrasonidos usando un dispositivo de ultrasonidos (VCX 400, Sonics and Materials) trabajando a una frecuencia de 20 kHz a una intensidad de $2,4 \text{ W/cm}^2$ durante 5 minutos. Después se separó el LPM o PBS, el compartimento donador se llenó con una disolución de inulina 10 microCi/ml (NET086L001MC, PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Inc., MA) en PBS. Las muestras se tomaron de los compartimentos receptores 24 horas después de la aplicación de ultrasonidos. En un experimento separado, se introdujo una superficie abrasiva giratoria (un cepillo circular con cerdas de plástico) en la cámara donadora de modo que se ponía en contacto directamente con la muestra de piel. Se puso una disolución de aciclovir de 10 microCi/ml sobre la piel durante 24 horas. La piel se lavó con una disolución salina y se disolvió en Solvable (PerkinElmer, MA). Las concentraciones de esas muestras se midieron mediante un contador de centelleo (Tri-Carb 2100 TR, Packard, CT). Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente, 22°C . No se aplicaron ultrasonidos ni dispositivo abrasivo en los testigos. Las barras de error indican la desviación estándar.

25 5 minutos de irradiación de ultrasonidos en combinación con el LPM aumentaron el transporte de fármaco comparado tanto con los ultrasonidos solos como con la difusión pasiva en piel intacta, como se muestra en la figura 19(a). Se observó el mismo efecto cuando se produjo la abrasión de la piel con un dispositivo de cepillo móvil que comprendía una pluralidad de cerdas (figura 19(b)). En resumen, los ejemplos usando piel de cerdo in vitro demostraron que la aplicación de energía con el LPM es eficaz en la potenciación del paso de moléculas a través de o en la piel. Los parámetros tales como potencia, tiempo de aplicación y una formulación de un LPM, se pueden optimizar para para adecuarse a la situación individual, tanto con respecto al tipo de tejido como de las sustancias a transportar.

REIVINDICACIONES

- 1.- Una composición que comprende:
3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato; y
un éter dodecílico de polietilenglicol,
- 5 en donde el 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato y el éter dodecílico de polietilenglicol están presentes en una concentración total de 0,5% a 10% (p/v) en una disolución tampón.
- 2.- La composición de la reivindicación 1, en donde el 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato y el éter dodecílico de polietilenglicol están presentes en una concentración total de 0,5% (p/v) en una disolución tampón.
- 10 3.- La composición de la reivindicación 1, en donde el 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato y el éter dodecílico de polietilenglicol están presentes en una relación de aproximadamente 75:25 a aproximadamente 25:75.
- 4.- La composición de la reivindicación 1, en donde el éter dodecílico de polietilenglicol comprende éter dodecílico de tetraetilenglicol.
- 5.- Un método para solubilizar una región de interés sobre la piel, que comprende:
aplicar energía a la región de interés; y
- 15 poner en contacto la región de interés con una composición,
en donde la composición comprende:
3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato; y
un éter dodecílico de polietilenglicol,
- 20 en donde el 3-(decildimetilamonio)-propanosulfonato y el éter dodecílico de polietilenglicol están presentes en una concentración total de 0,5% a 10% (p/v) en una disolución tampón.
- 6.- El método de la reivindicación 5, en donde el éter dodecílico de polietilenglicol comprende éter dodecílico de tetraetilenglicol.
- 7.- El método de la reivindicación 5, en donde la aplicación de energía comprende aplicar energía mecánica.
- 8.- El método de la reivindicación 5, en donde la aplicación de energía comprende aplicar energía de ultrasonidos.
- 25 9.- El método de la reivindicación 5, que además comprende:
separar al menos una parte de la región solubilizada de interés para dejar una zona expuesta en la piel; y
aplicar en la zona expuesta al menos uno de una composición terapéutica y una composición cosmética.
- 30 10.- El método de la reivindicación 9, en donde la composición terapéutica comprende al menos uno de un fármaco basado en proteína, un fármaco basado en péptido, insulina, eritropoyetina, interferón, moléculas de ácido nucleico, antiinflamatorios, antivíricos, antifúngicos, antibióticos, anestésicos locales, sacáridos, un fármaco basado en lípido, un fármaco basado en hidrato de carbono, un fármaco molécula pequeña, un fármaco basado en nanopartículas, y un fármaco encapsulado en liposoma.
- 11.- El método de la reivindicación 5, que además comprende recoger al menos un analito de la región solubilizada de interés.

35

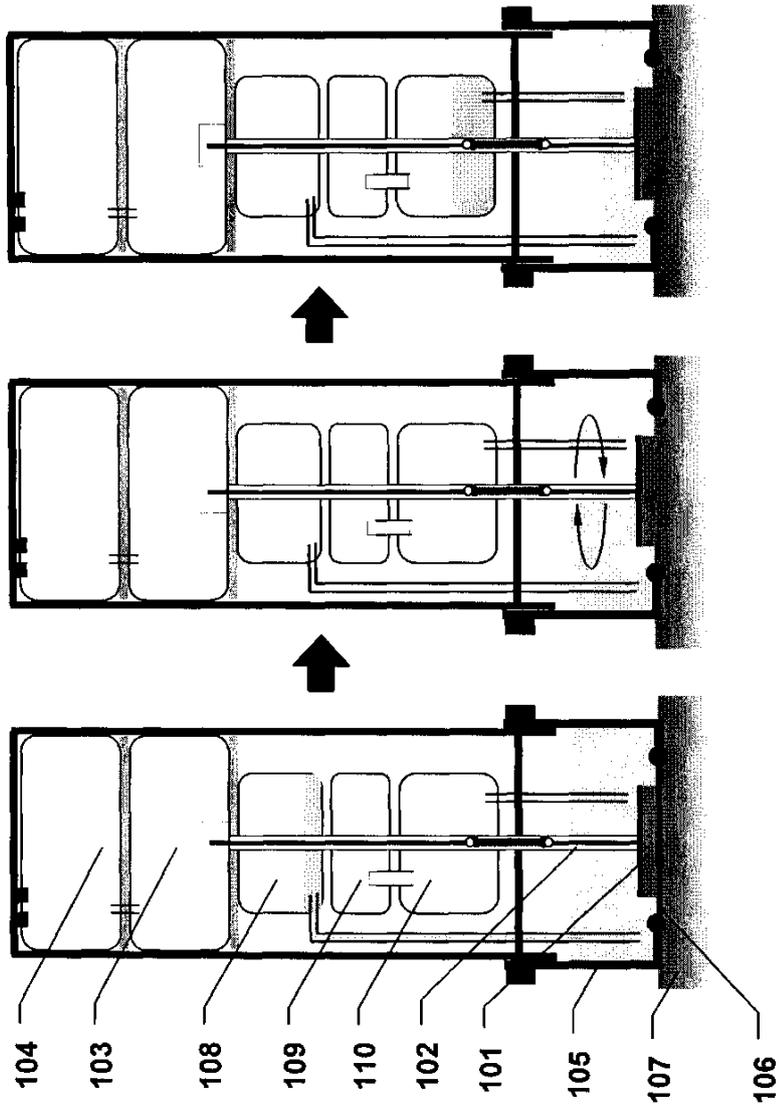


Figura 1d

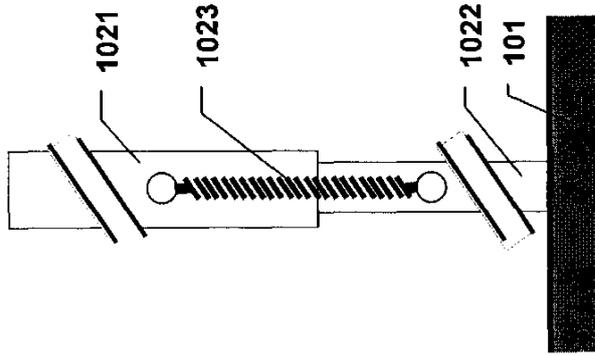


Figura 1c

Figura 1b

Figura 1a

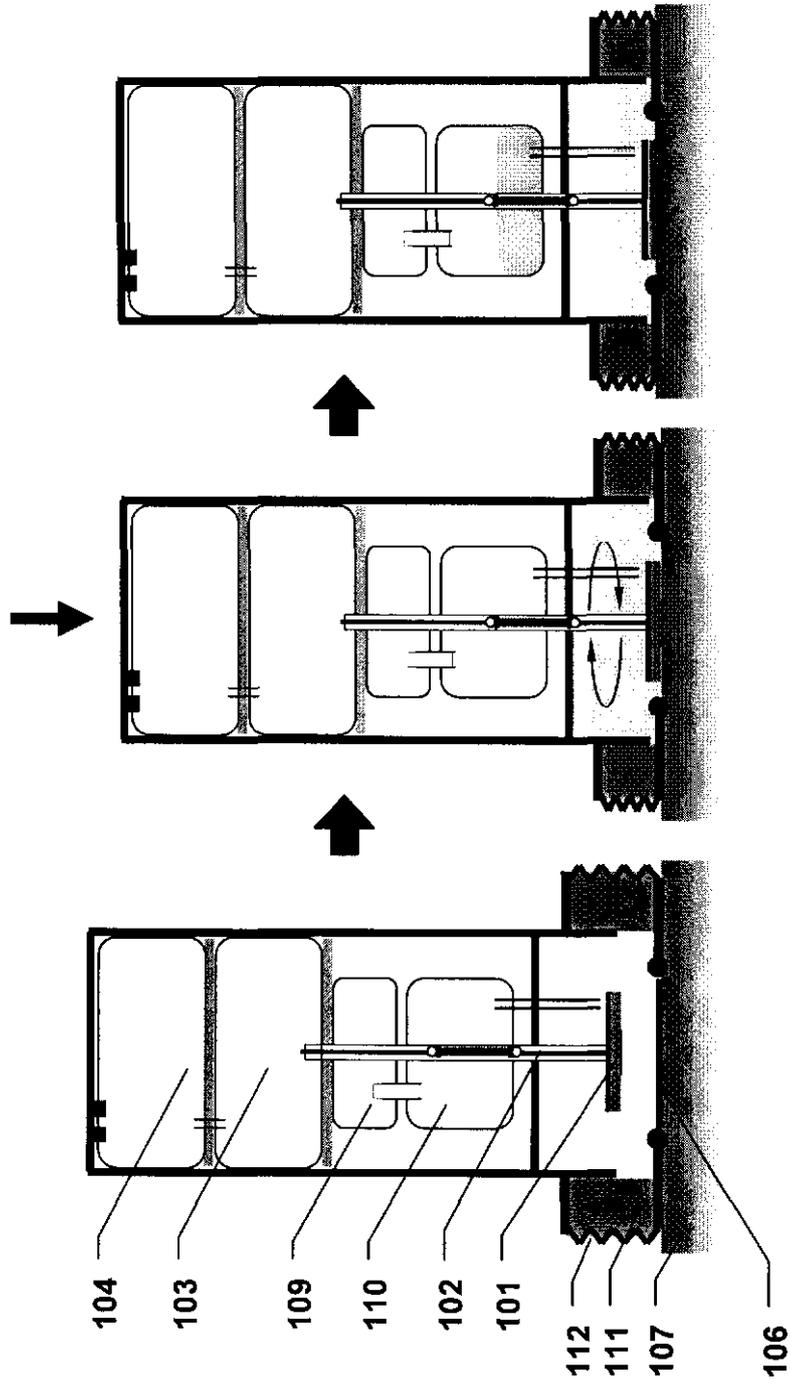


Figura 1g

Figura 1f

Figura 1e

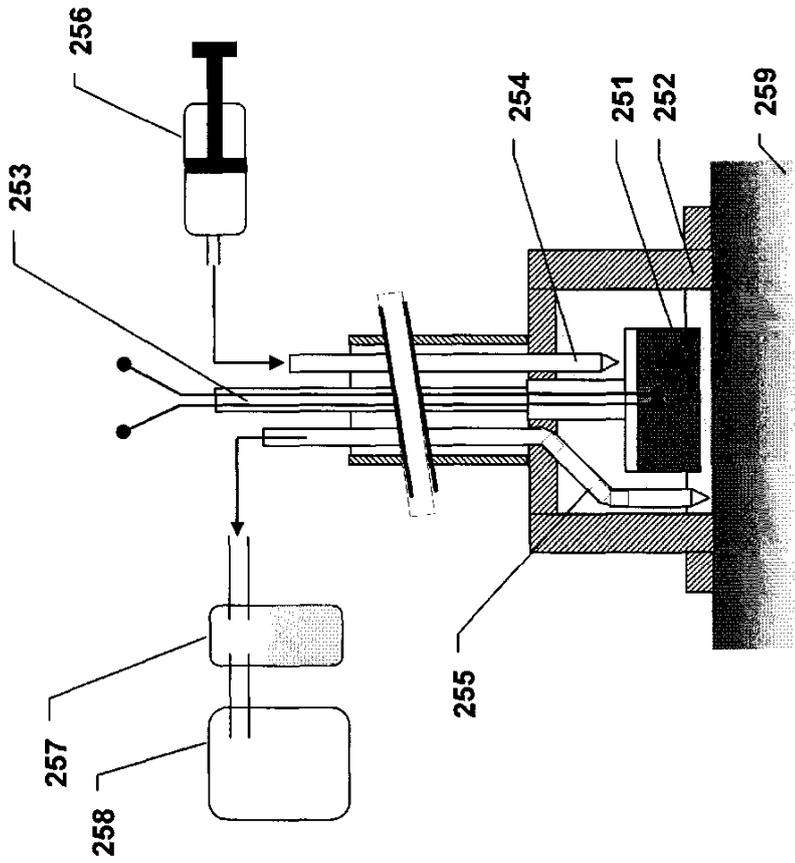


Figura 2b

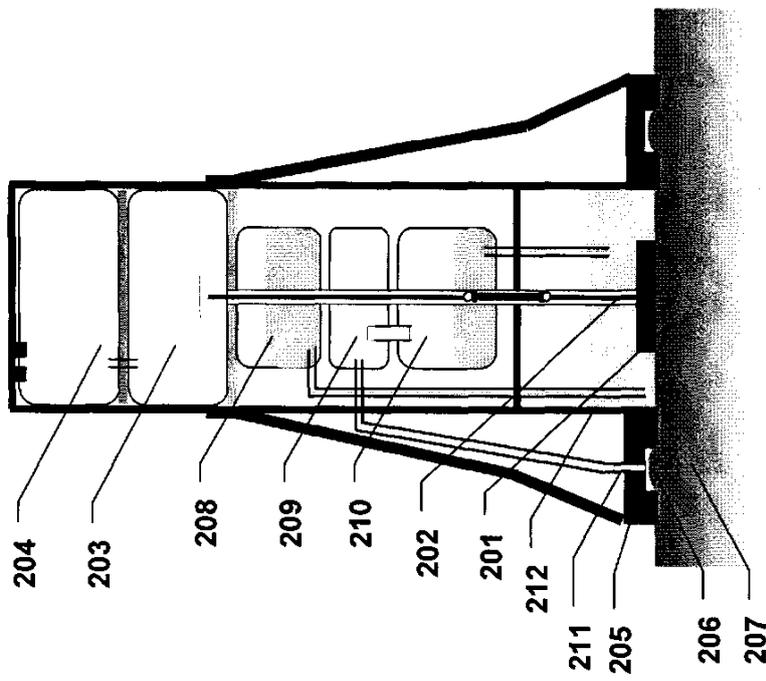


Figura 2a

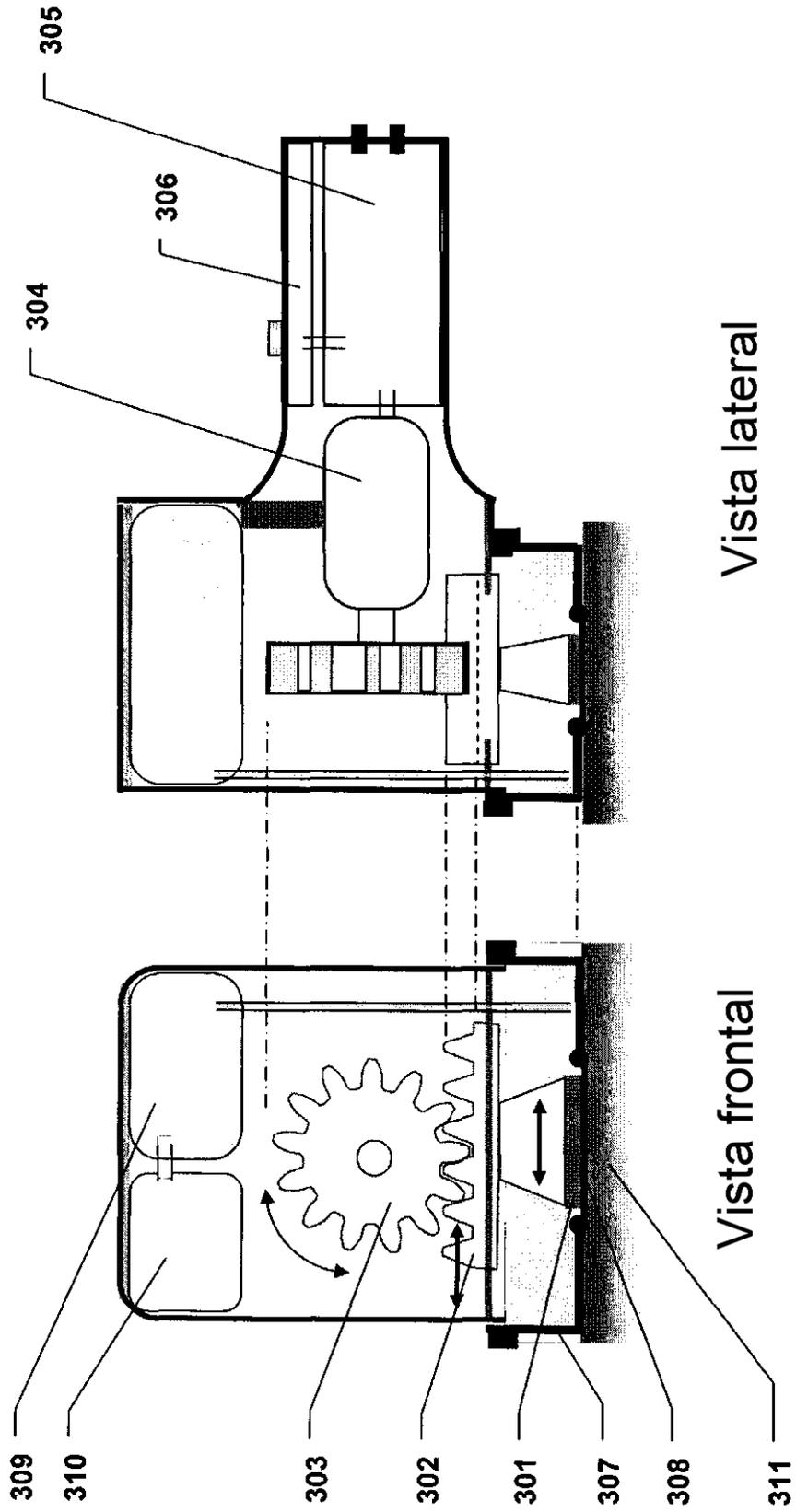


Figura 3a

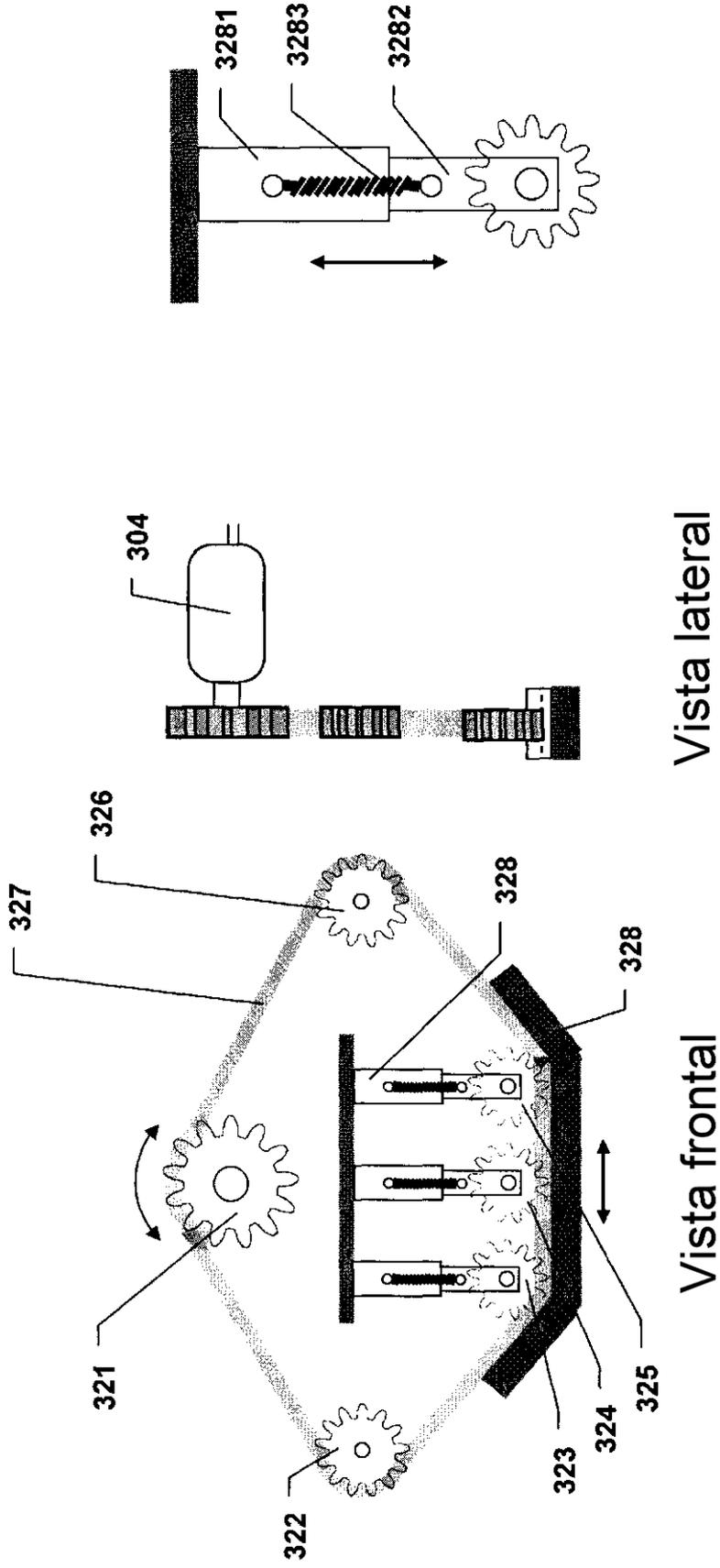


Figura 3c

Figura 3b

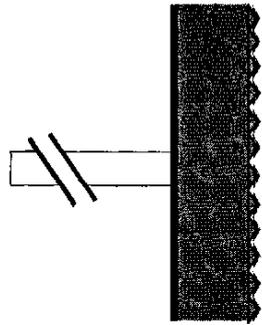


Figura 4a

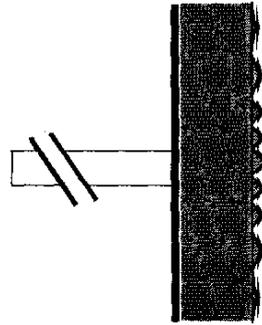


Figura 4b

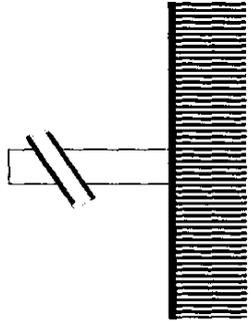


Figura 4e

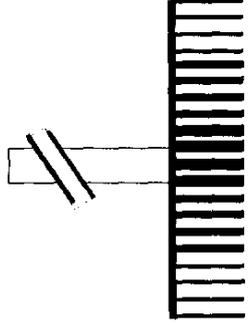


Figura 4f

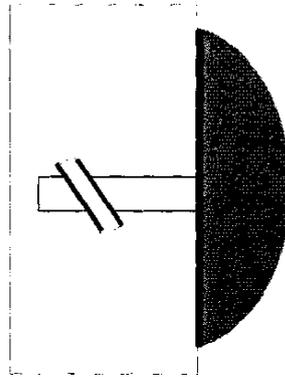


Figura 4c

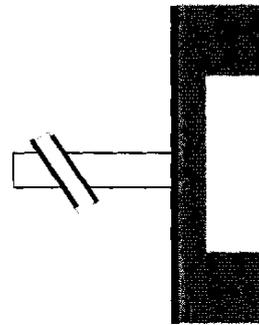


Figura 4d

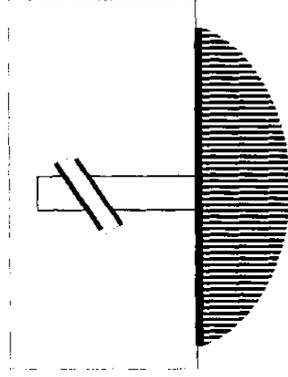


Figura 4g

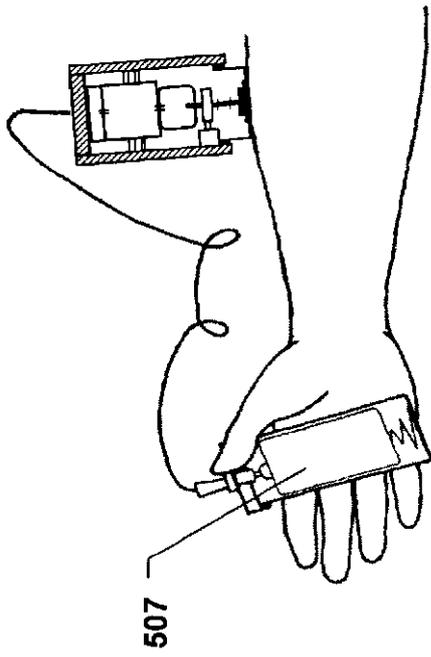


Figura 5c

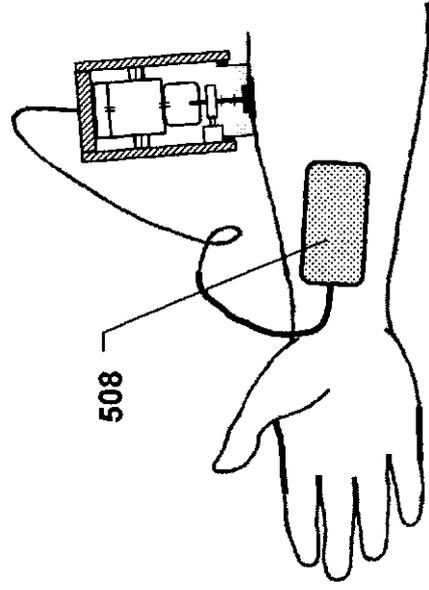


Figura 5d

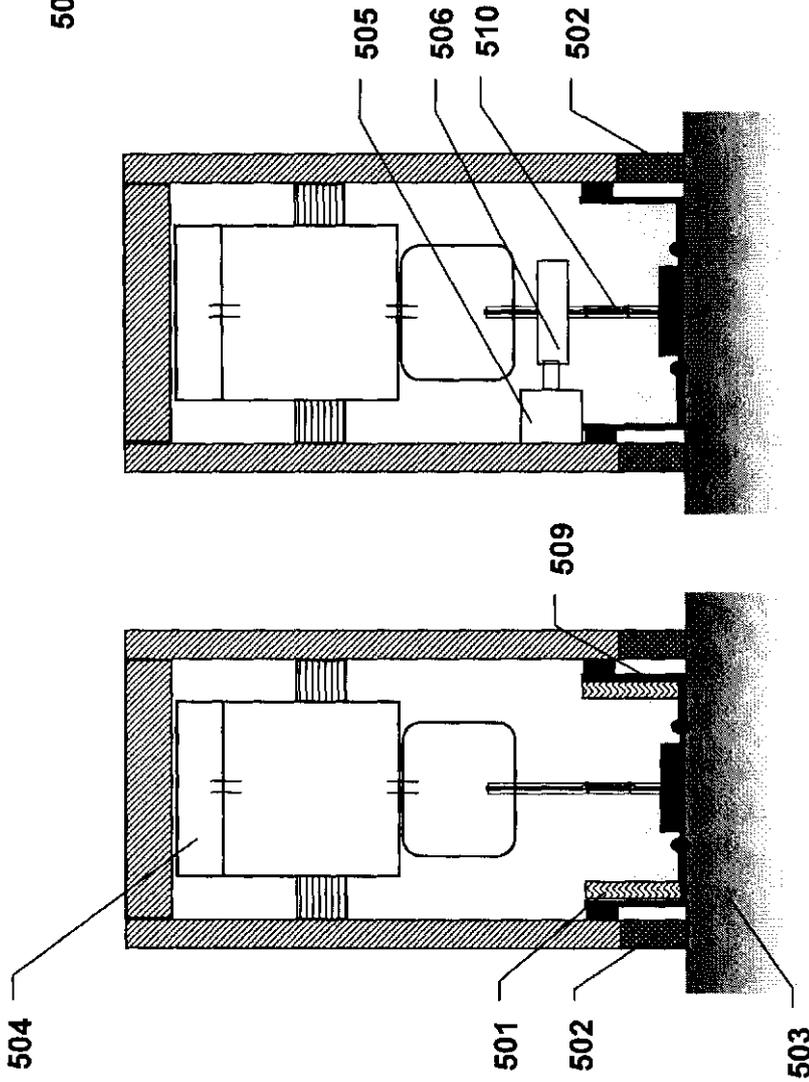


Figura 5b

Figura 5a

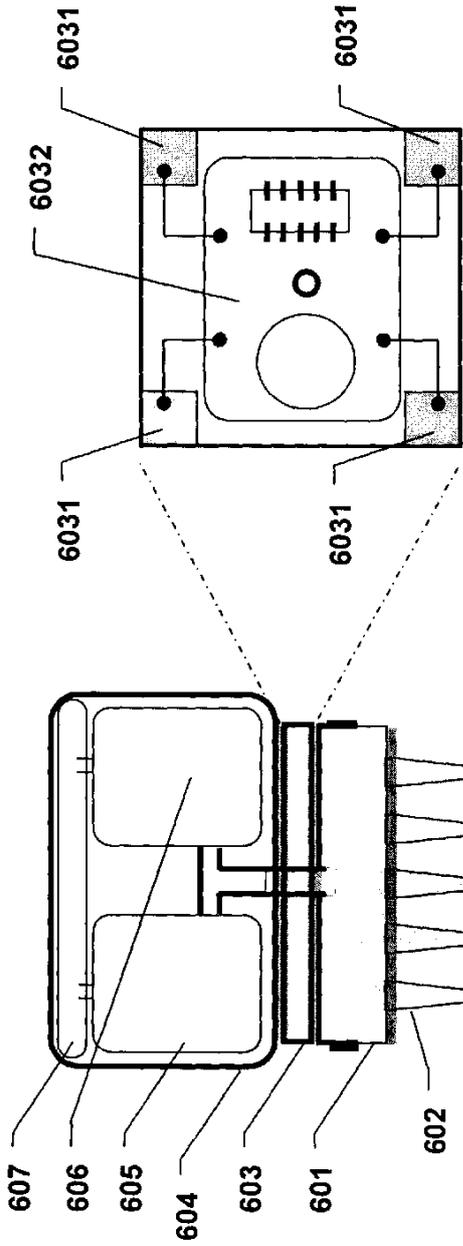


Figura 6c

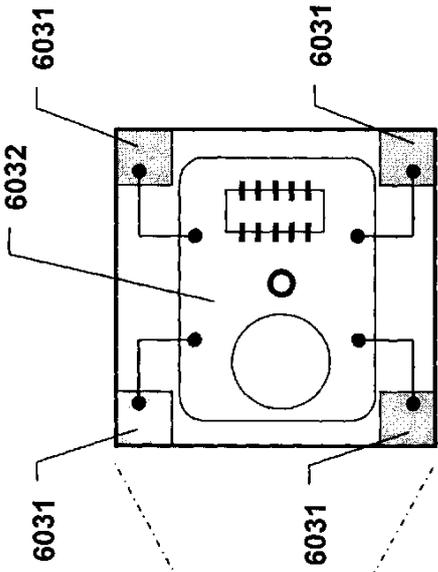


Figura 6d

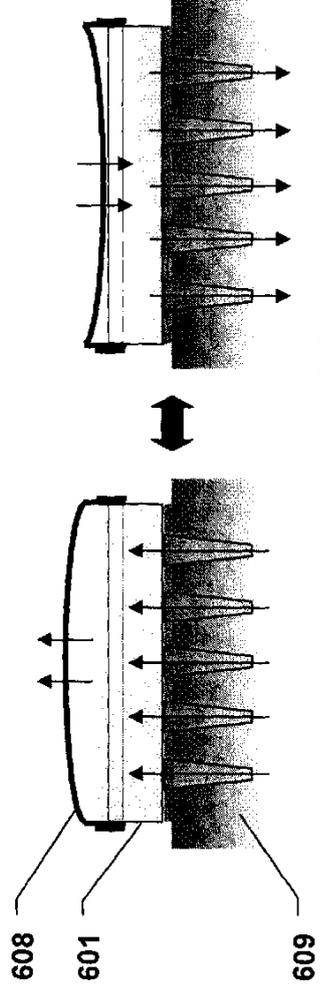


Figura 6e

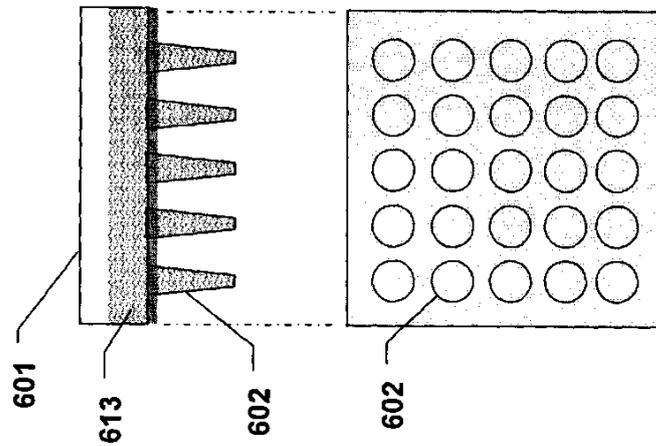
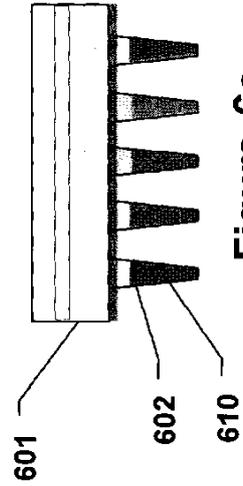


Figura 6a

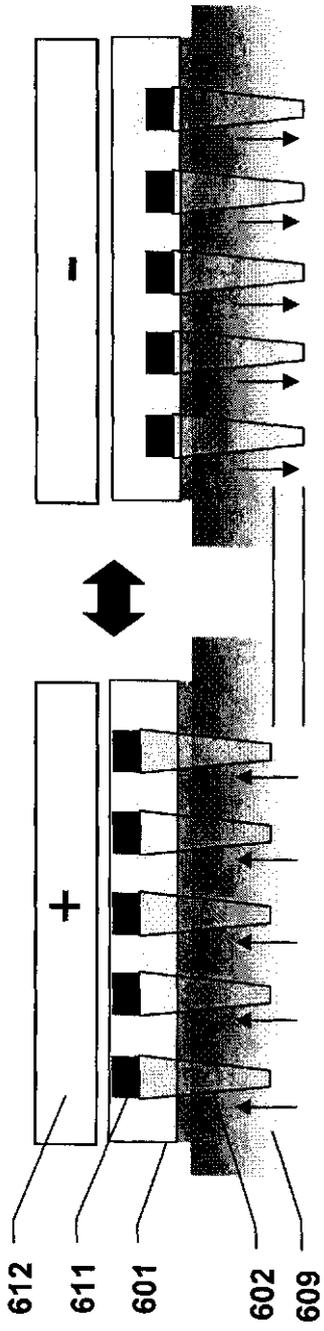


Figure 6f

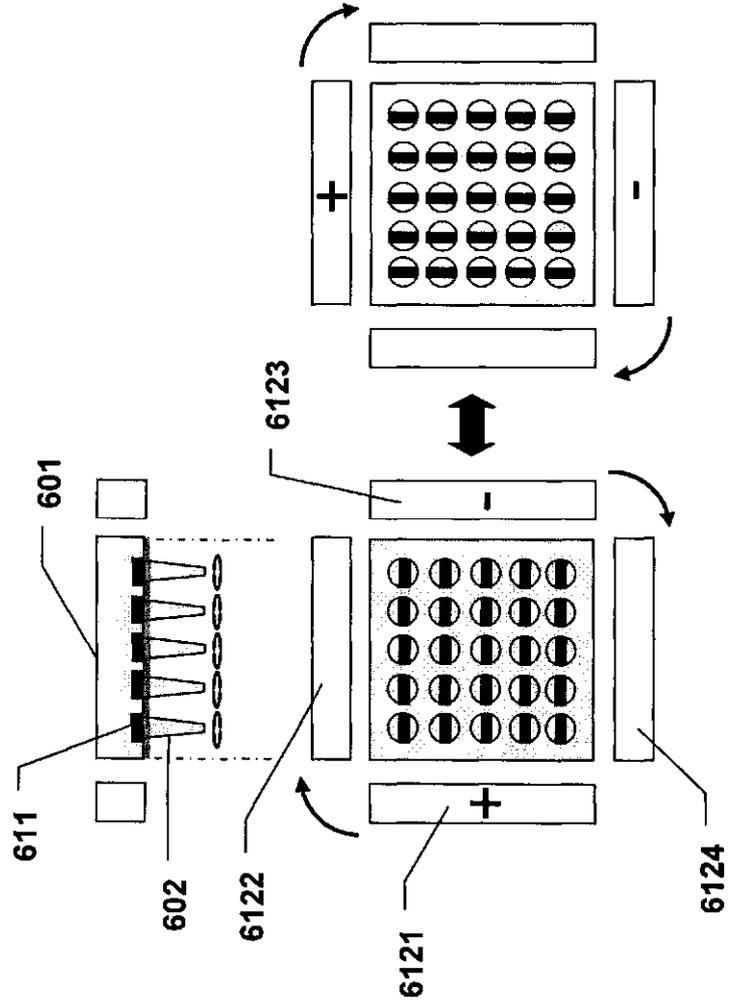


Figure 6g

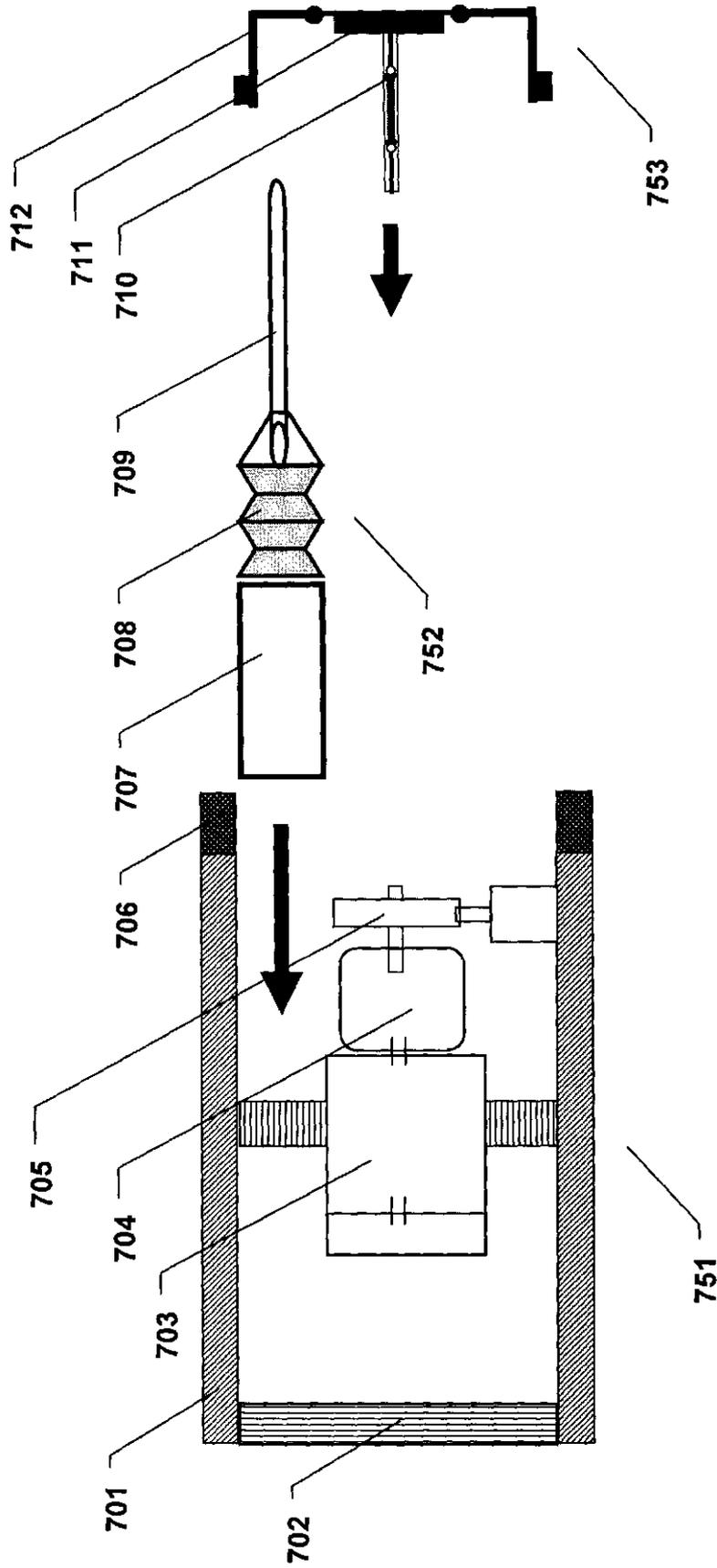


Figura 7a

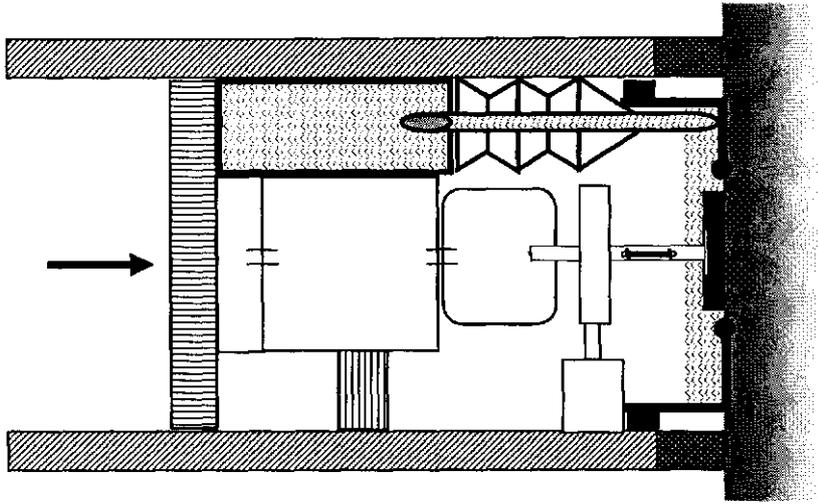


Figura 7d

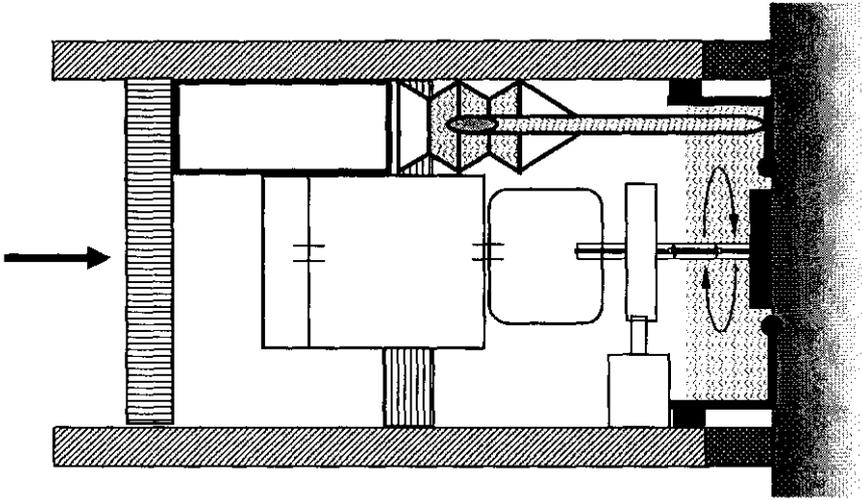


Figura 7c

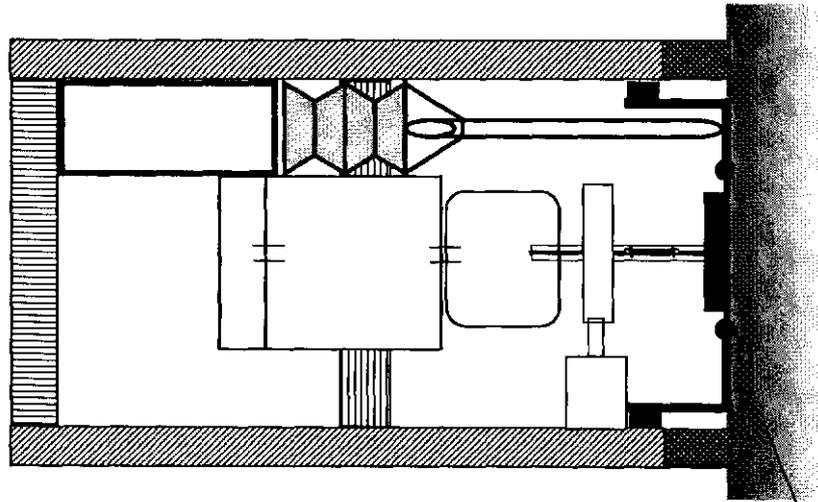


Figura 7b

713

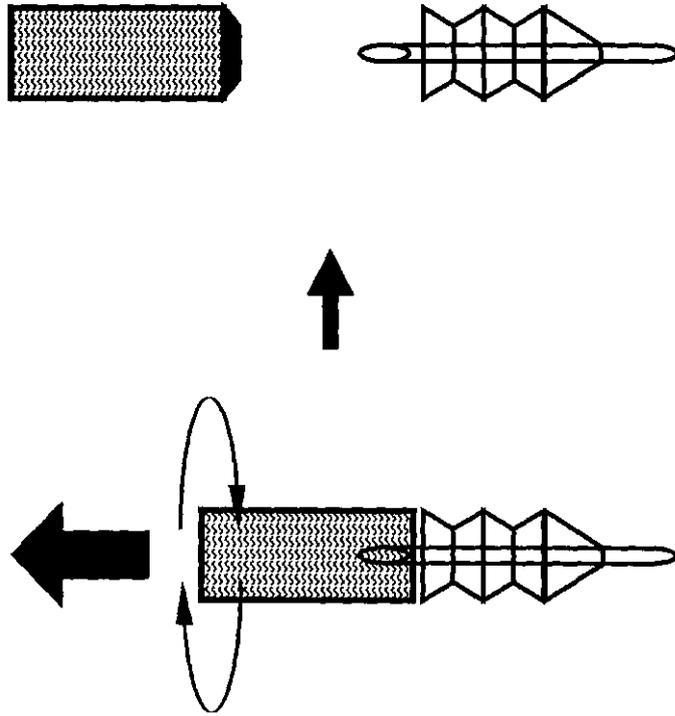


Figura 7e

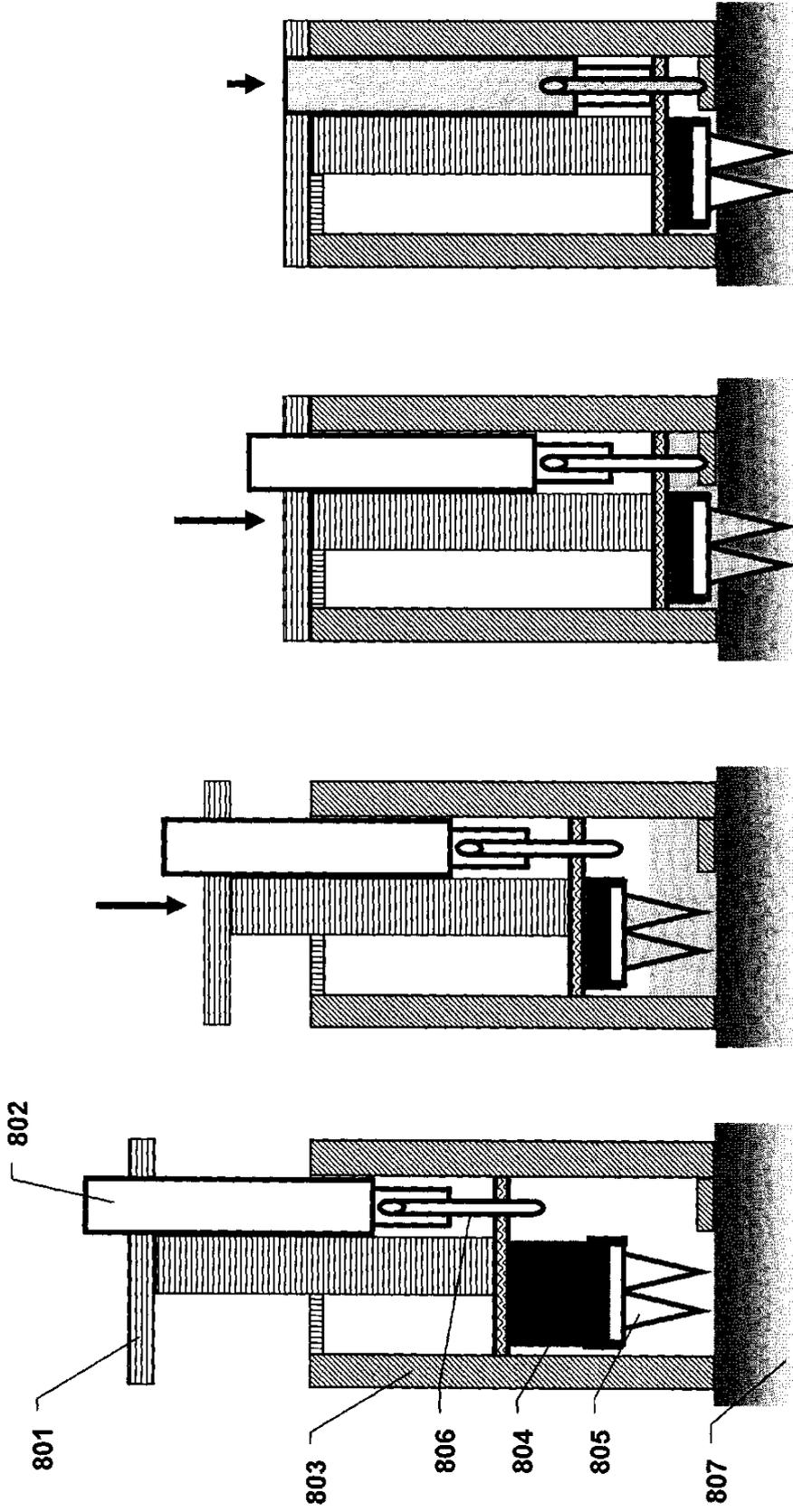


Figura 8d

Figura 8c

Figura 8b

Figura 8a

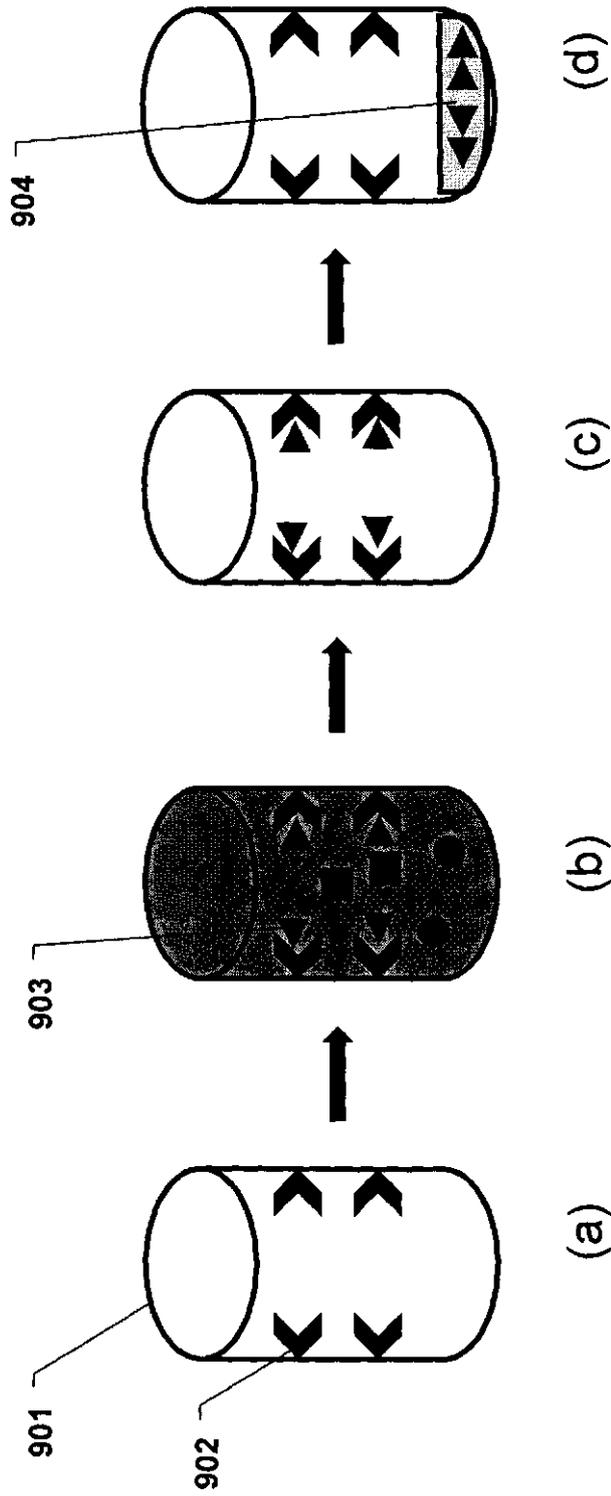


Figura 9

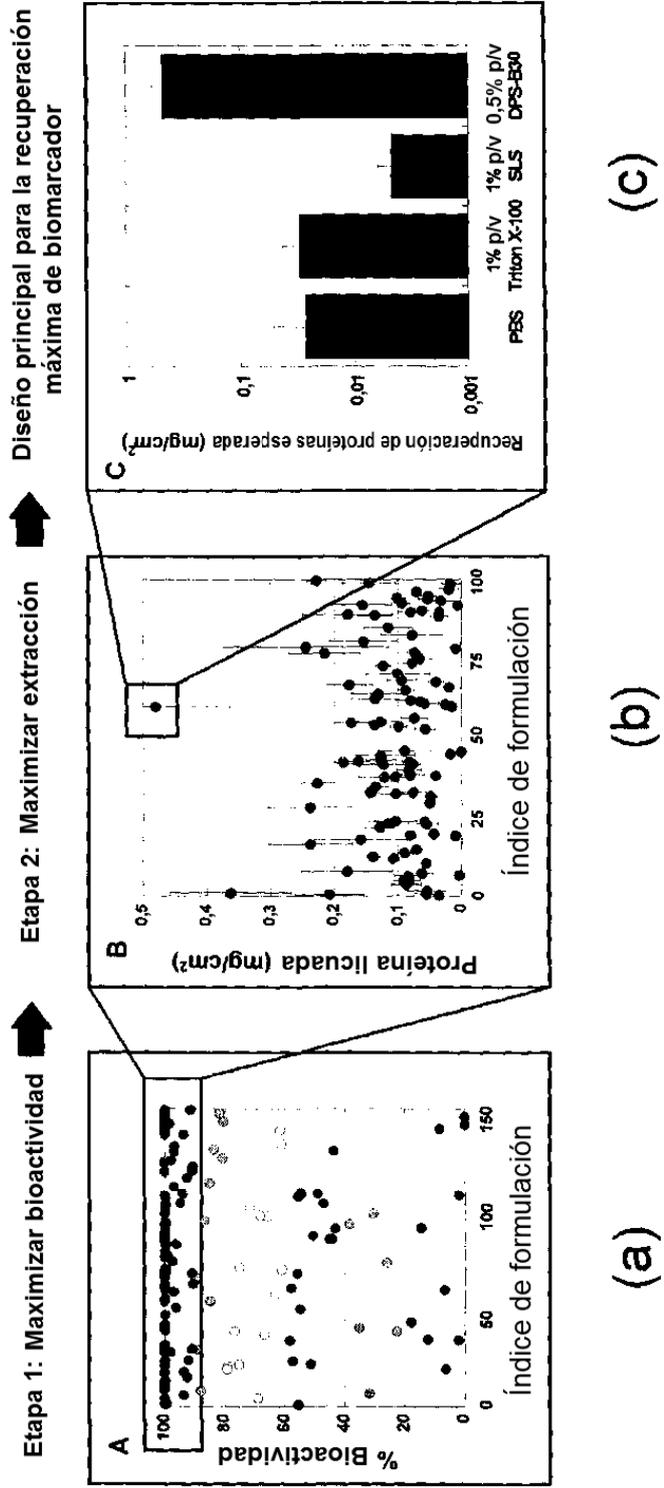
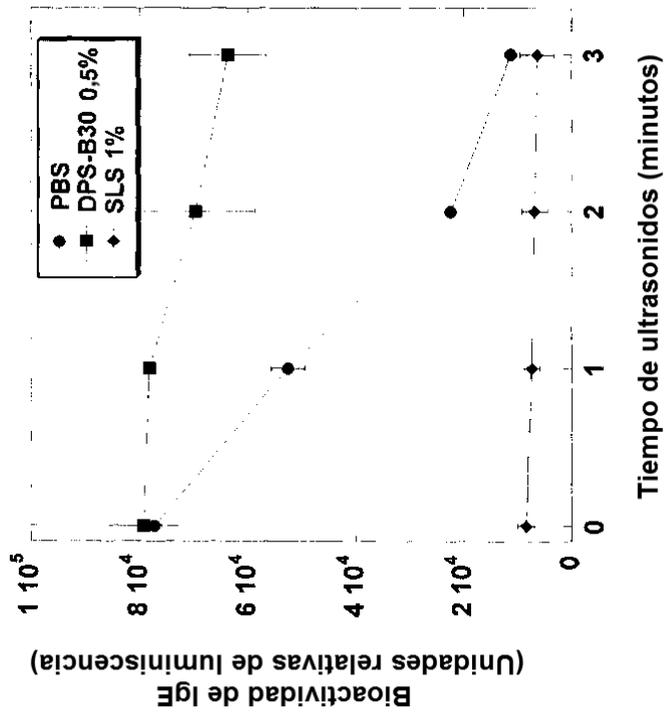
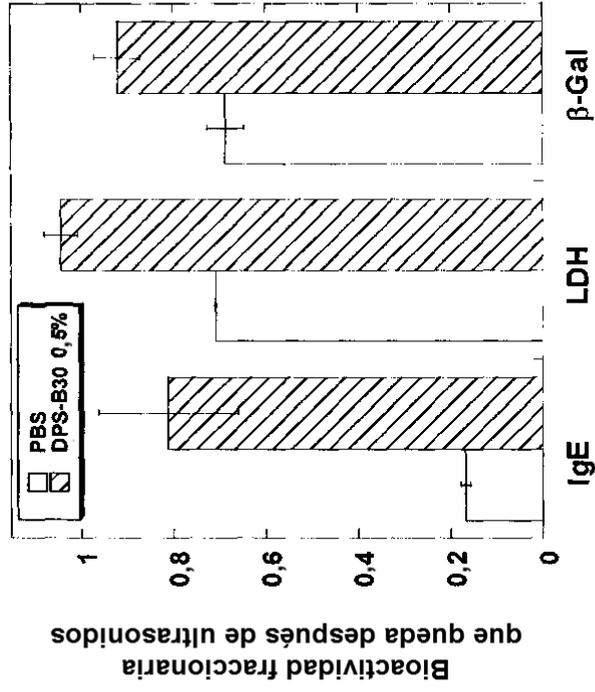


Figura 10



(a)



(b)

Figura 11

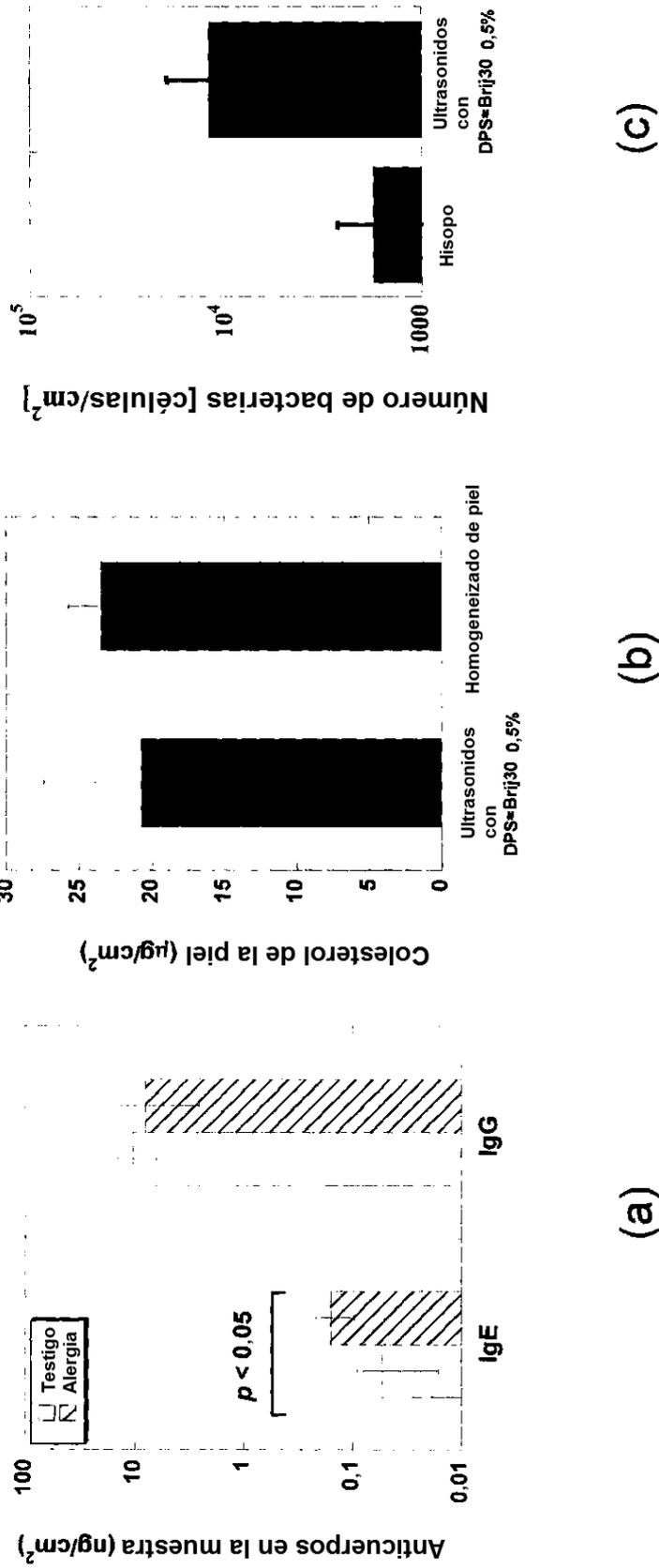


Figura 12

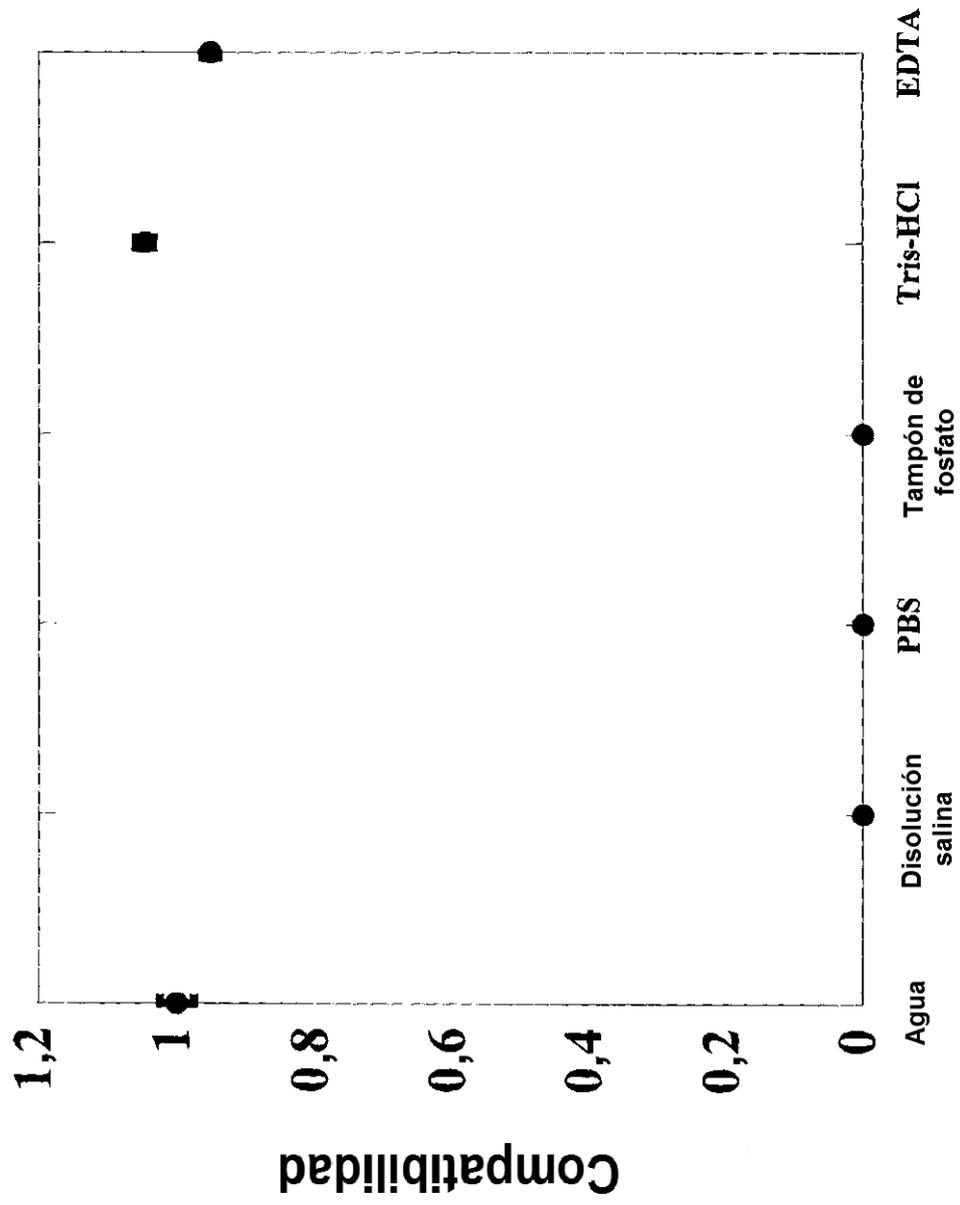


Figura 13

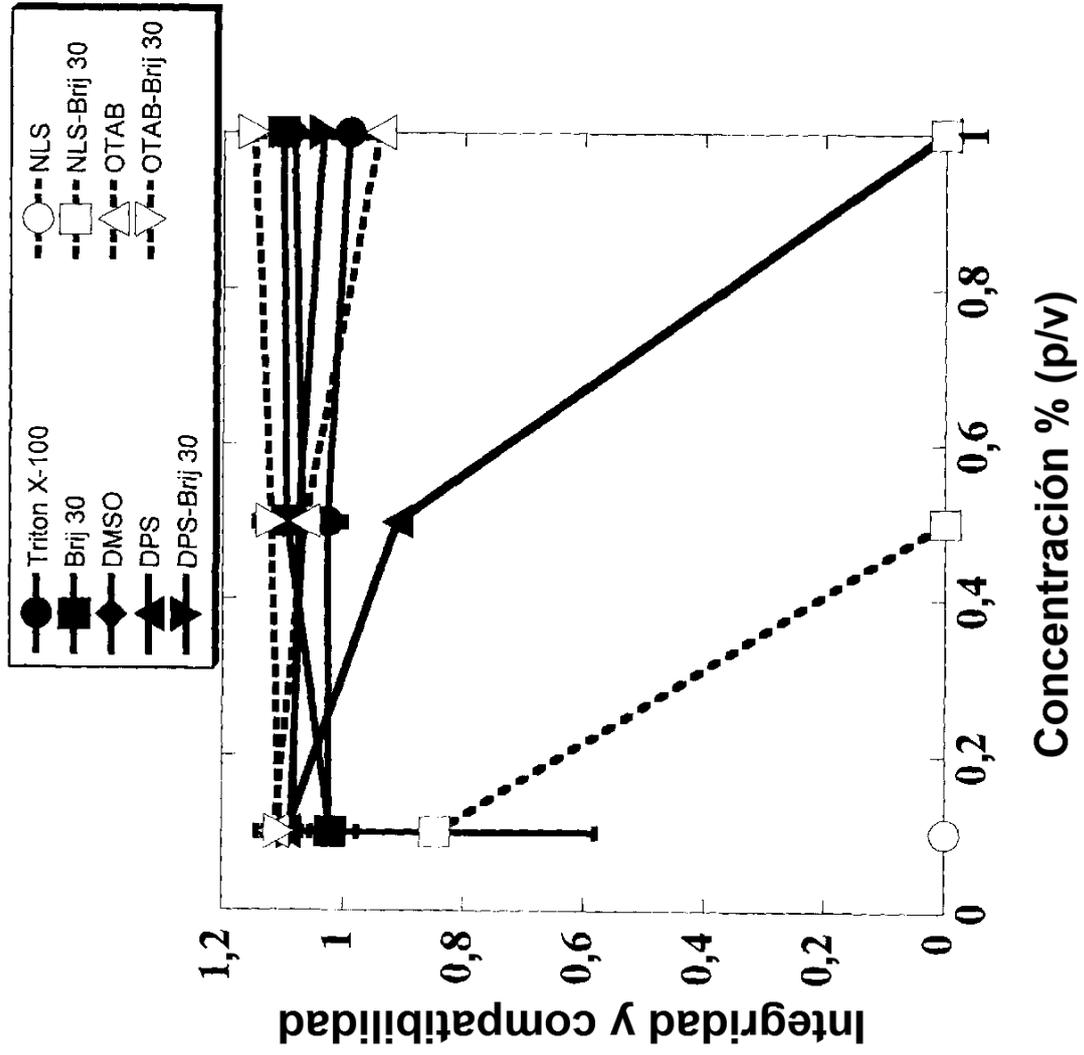


Figura 14

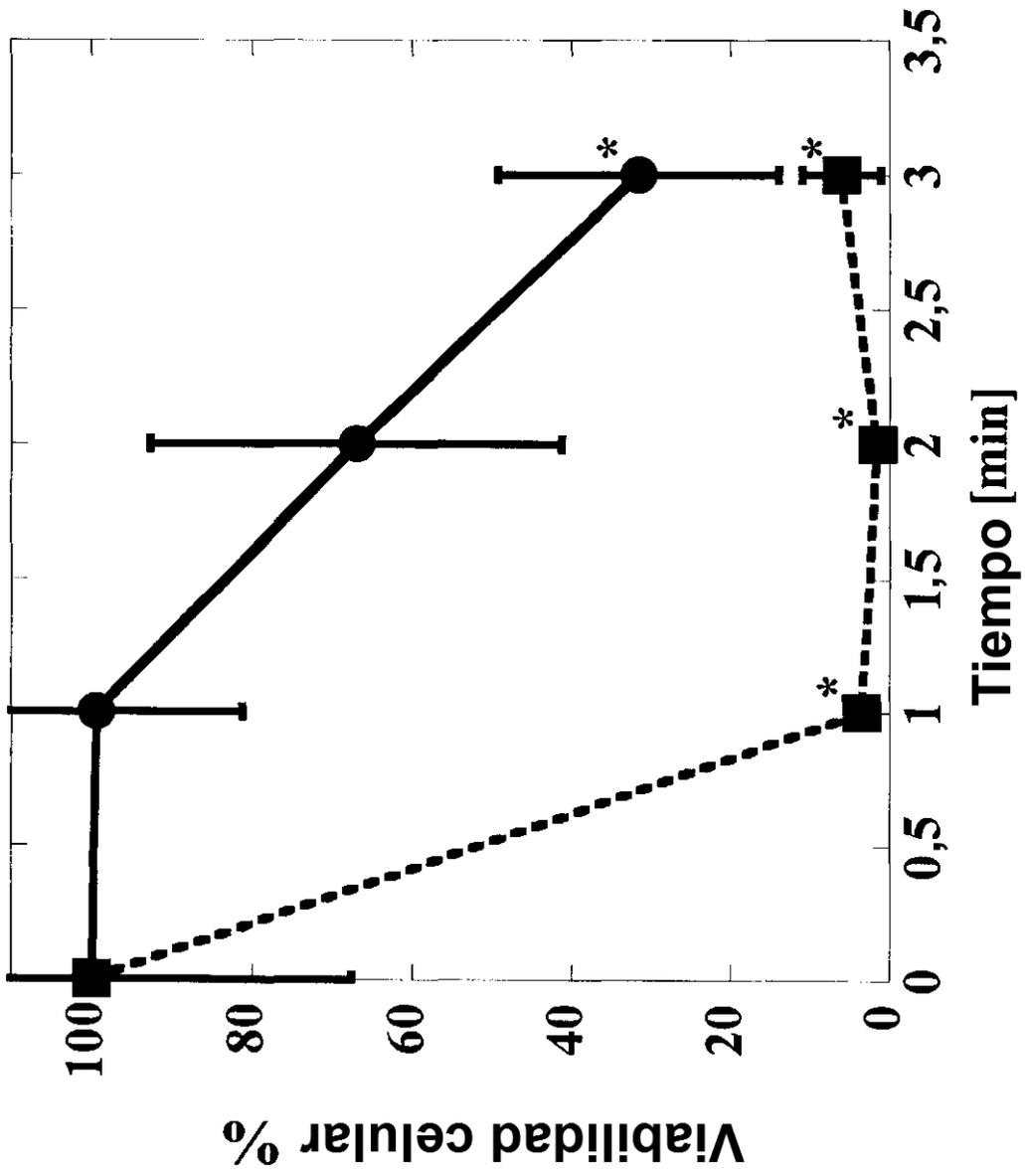


Figura 15

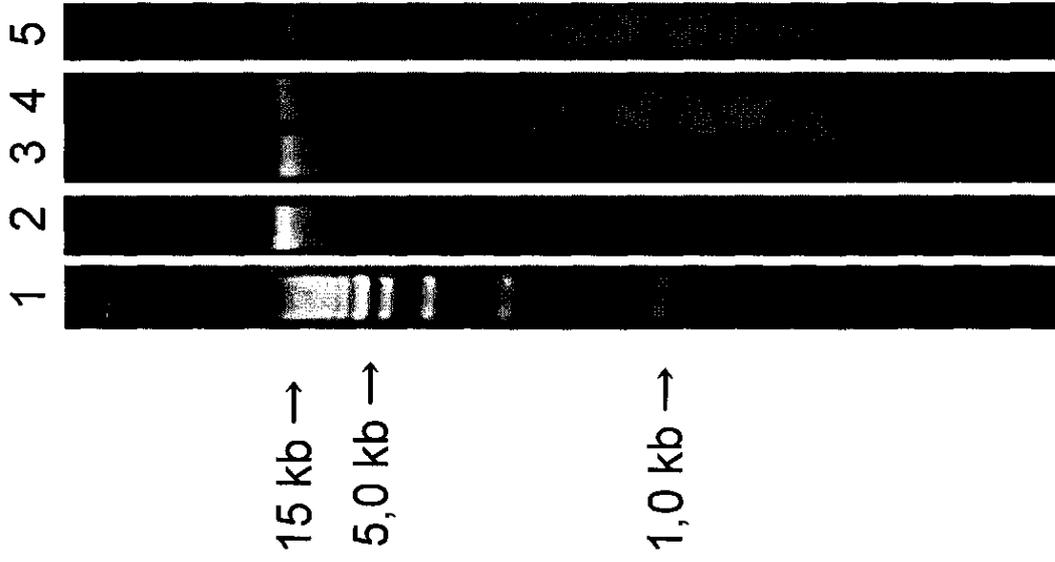


Figura 16

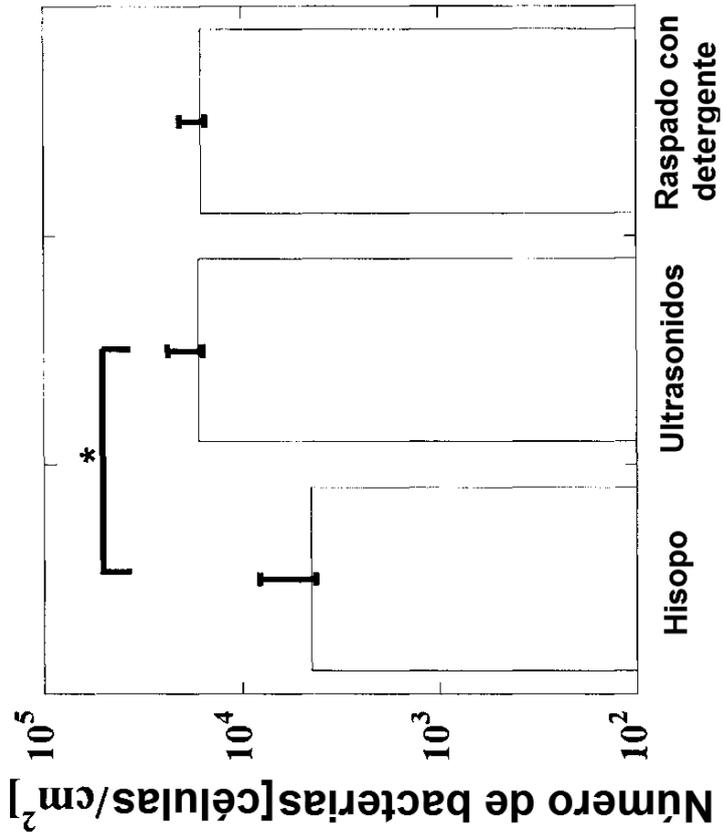


Figure 17b

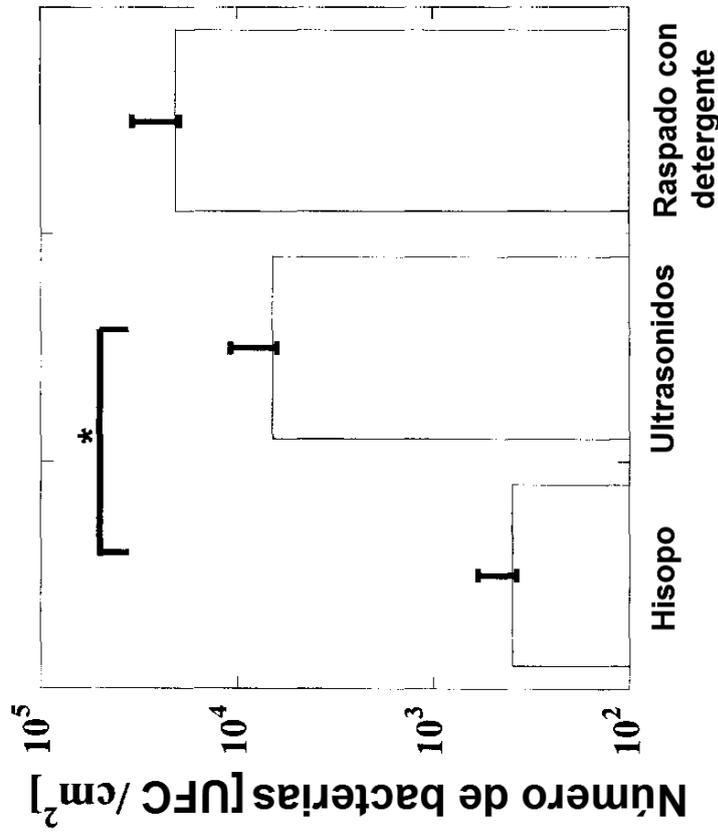


Figura 17a

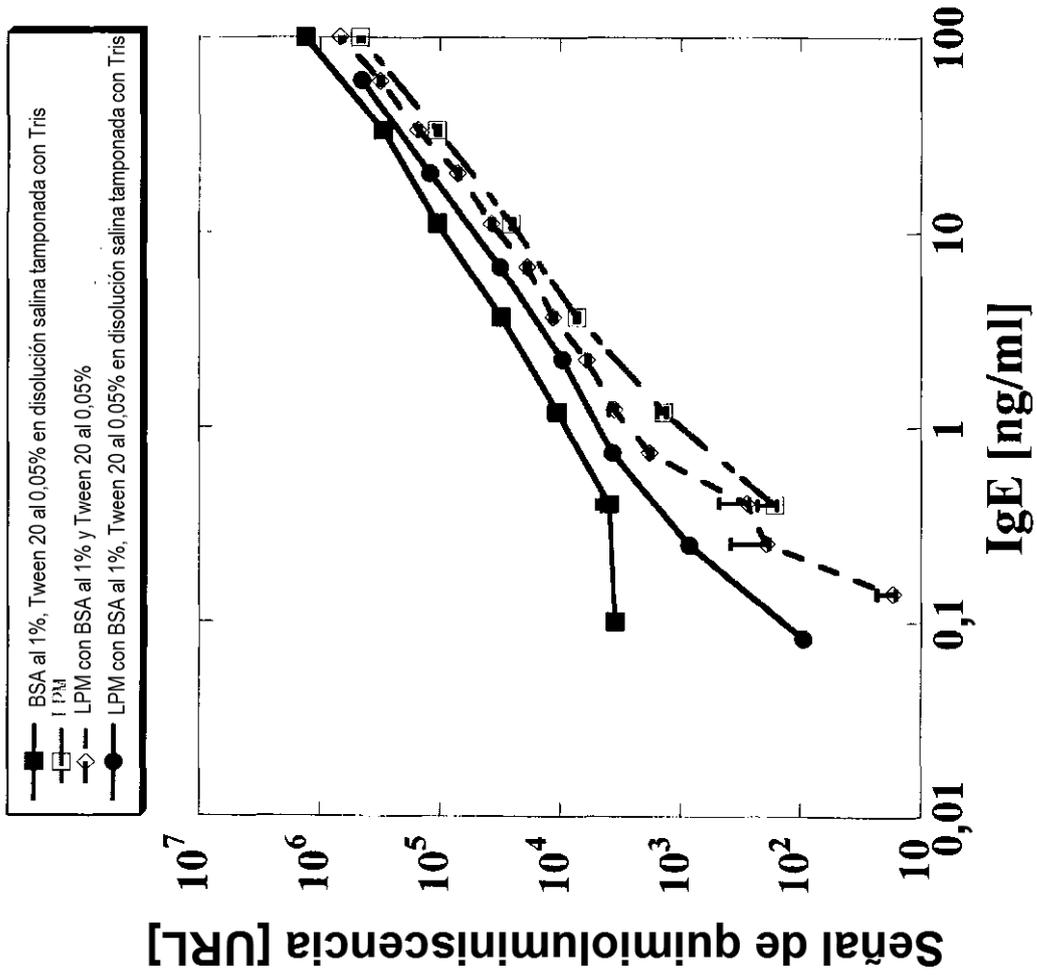


Figura 18

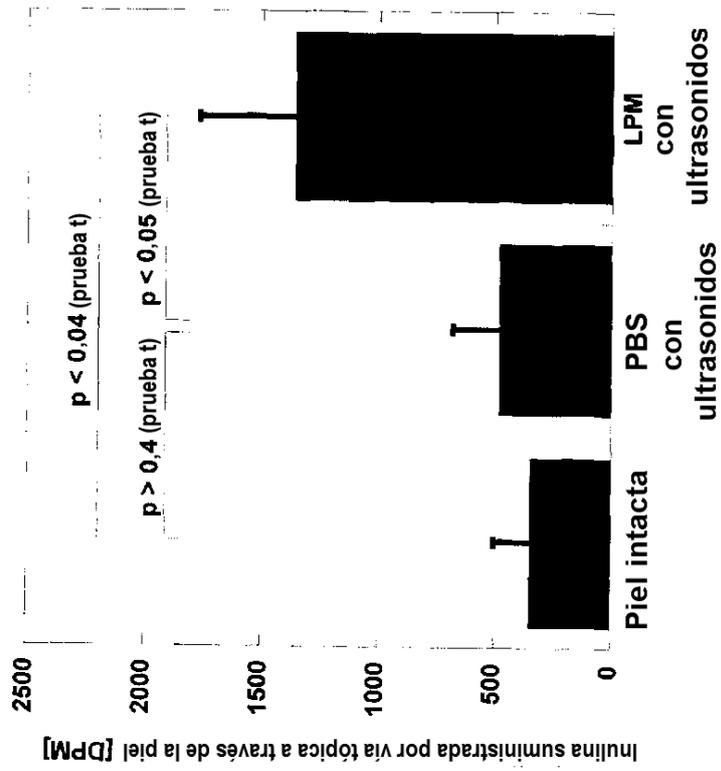


Figura 19a

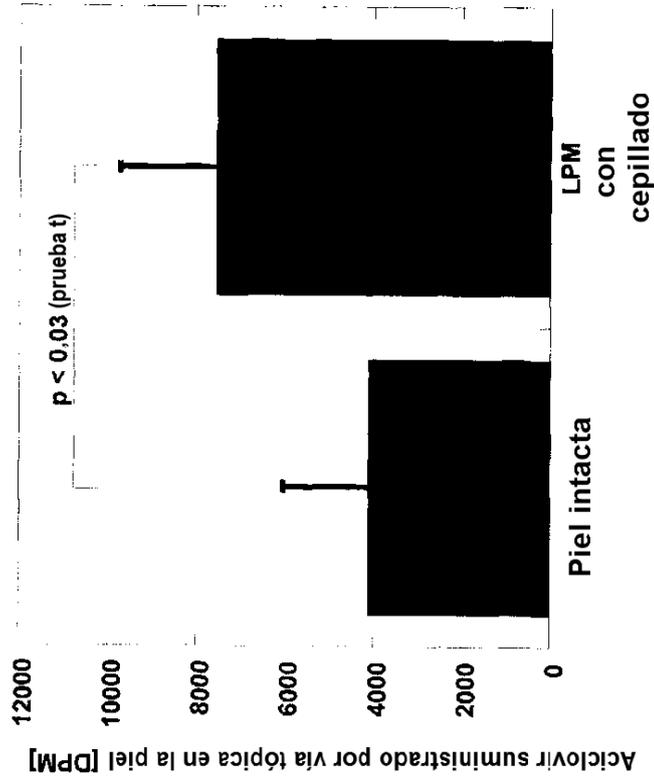


Figura 19b