

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 519**

51 Int. Cl.:

**A61B 10/00** (2006.01)

**A61F 13/00** (2006.01)

**B01L 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2013 PCT/EP2013/077734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.07.2014 WO2014106595**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2013 E 13811243 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2941195**

54 Título: **Dispositivo para medir analitos en la piel**

30 Prioridad:

**02.01.2013 EP 13150018**

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

**19.06.2017**

73 Titular/es:

**FIBROTX OÜ (100.0%)  
Mäealuse 4  
12618 Tallinn, EE**

72 Inventor/es:

**NEUMAN, TOOMAS y  
KAZARJAN, ARAM**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 617 519 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Dispositivo para medir analitos en la piel.

**5 Campo de la invención**

La presente invención se refiere a parches dérmicos para retener selectivamente uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto, métodos para medir la concentración de uno o analitos de un cuerpo de un sujeto, así como kits que comprenden tales parches.

10

**Antecedentes de la invención**

El rápido desarrollo de la genómica, transcriptómica, proteómica y regulómica ha hecho posible analizar mecanismos moleculares y celulares a gran escala. Uno de los resultados importantes de estos estudios ha sido el desarrollo de genómica funcional y el entendimiento de que las células de diferentes individuos tienen diferencias significativas en la estructura del genoma, perfiles de expresión de genes y proteínas y mecanismos reguladores que controlan funciones celulares específicas. Esto ha producido un interés en evaluar cómo son de eficaces los tratamientos a un nivel personal, en el campo de la medicina personalizada y el cuidado de la piel personalizado.

15

20

En relación al cuidado de la piel personalizado los efectos reivindicados de efectos antiarrugas y antiedad de productos cosméticos típicamente se basan en la asunción de que estos productos tienen efecto similar en todos los individuos. Sin embargo, este no es el caso. Diferentes personas y diferentes tipos de piel reaccionan de forma diferente a productos cosméticos, de ahí la necesidad para el cuidado de la piel personalizado.

25

En el cuidado de la piel personalizado y la medicina personalizada, una manera de obtener muestras de sujetos para análisis es mediante el uso de parches transdérmicos, que bien activa o pasivamente muestrea analitos a través de la piel, donde el analito se transporta al parche, por ejemplo, a través de la transpiración o sudor como el medio portador. La muestra se puede analizar después por métodos convencionales para determinar los niveles de concentración de diferentes analitos de interés, que se puede usar para determinar que tratamientos son los más eficaces para cada persona individual.

30

El documento WO 96/39923 A1 (a los socios Sudor) describe un parche dérmico para acumular humedad extraída mediante presión de la piel. El foco es parches de cribado de drogadicción seguros. El parche dérmico puede contener anticuerpos para unir específicamente analitos de interés al material absorbente del parche. La figura 7 del documento WO 96/39923 A1 muestra un parche dérmico con zonas de prueba.

35

El documento WO 96/39923 A1 no aborda el problema de obtener de forma fiable y rápida un resultado que se pueda usar en medicina personalizada y/o cuidado de la piel personalizado.

40

El documento US 2011/0172507 A1 (a Lademann et al.) describe un material compuesto textil que comprende nanofibra no tejida.

Consecuentemente, todavía hay una necesidad en la técnica para métodos y parches adicionales que puedan determinar de forma fiable el nivel de diferentes analitos, así como una necesidad para reducir el tiempo de muestreo necesario para obtener un resultado fiable.

45

Además, hay una necesidad para métodos fiables y/o mejorados para determinar y/o confirmar los efectos beneficiosos en el usuario de, por ejemplo, cualquier ingrediente activo determinado en un producto de cuidado de la piel o medicamento de la piel para enfermedades de la piel.

50

**Compendio de la invención**

La presente invención se hizo en vista del estado de la técnica descrito anteriormente, y el objeto de la presente invención es proporcionar un modo fiable y/o mejorado de determinar el nivel de diferentes analitos mientras se reduce el tiempo de muestreo necesario.

55

La invención se refiere a un parche dérmico según la reivindicación 1 y un método según la reivindicación 13.

Para resolver el problema, la presente invención proporciona un parche dérmico para retener selectivamente uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto que comprende, por ejemplo, en secuencia: una capa de membrana (101) para retener uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto, con un primer y un segundo lado, en donde el primer lado está adaptado para estar en comunicación fluida con la piel del sujeto; opcionalmente medios de sujeción para asegurar la capa de membrana en su sitio; una capa adhesiva (104); y una capa de refuerzo; en donde entre la capa de refuerzo y la capa de membrana (101) hay una capa expandible (103) para aplicar presión a la capa de membrana.

65

Es decir, los inventores de la presente invención en un primer aspecto de la invención encontraron que el muestreo de analitos se podría obtener más rápido y de forma más fiable aplicando presión a la capa de membrana después de haber sido asegurada de forma extraíble a la piel del sujeto, asegurando de esta manera una conexión fluida mejorada entre la piel y la membrana.

5 En algunas formas de realización de la presente invención, el medio de sujeción (102) está hecho del mismo material que la capa de membrana (101), y donde el medio de sujeción no está unido a la capa expandible (103).

10 En algunas formas de realización de la presente invención, la capa expandible (103) es para aplicar presión y humedad a la capa de membrana.

15 En algunas formas de realización de la presente invención, hay una capa de humedad para aplicar humedad a la capa de membrana en comunicación fluida con la capa de membrana (101). En algunas formas de realización de la presente invención, la capa de humedad también funciona como una capa protectora, y se coloca entre la capa expandible y la capa de membrana, y preferiblemente donde la capa protectora se coloca adyacente al segundo lado de la capa de membrana.

20 En algunas formas de realización de la presente invención, la capa de humedad en comunicación fluida con la capa de membrana (101) es la misma capa que la capa expandible (103).

En algunas formas de realización de la presente invención, la capa expandible (103) contiene celulosa comprimida.

25 En algunas formas de realización de la presente invención, la capa de refuerzo tiene una apertura que permite que el líquido añadido a través de la apertura esté en comunicación fluida con la capa expandible y/o la capa de humedad.

30 En algunas formas de realización de la presente invención, el área de la capa expandible (103) abarca completamente la capa de membrana (101) y donde el área de la capa expandible (103) es igual a o mayor que el área de la capa de membrana (101).

En algunas formas de realización de la presente invención, el área de la capa de membrana (101) es  $1 \text{ cm}^2$  o menor.

35 En algunas formas de realización de la presente invención, la capa de membrana (101) comprende una o más sección(es) de captura diferentes con molécula(s) de afinidad para retener selectivamente uno o más analito(s), y en algunas formas de realización el área de la sección de captura es menor de  $0,01 \text{ cm}^2$ , preferiblemente menor de  $0,003 \text{ cm}^2$ .

40 En algunas formas de realización de la presente invención, la capa de membrana (101) comprende al menos cuatro secciones de captura diferentes para retener selectivamente el analito donde en cada una de las al menos cuatro secciones de captura distintas, y en formas de realización adicionales al menos cuatro moléculas de afinidad diferentes se han inmovilizado.

En algunas formas de realización de la presente invención, el parche dérmico es para uso en medicina.

45 Otro aspecto de la presente invención proporciona un método para medir la concentración de uno o más analitos en una muestra que comprende los siguientes pasos:

- 50
- a) seleccionar uno o más analitos que se van a medir;
  - b) inmovilizar en una membrana en un parche según la presente invención, una o más zonas de moléculas de afinidad específicas para el uno o más analitos seleccionados, y uno o más controles positivos y/o negativos;
  - c) asegurar de forma extraíble el parche del paso b) sobre la piel de un sujeto y activar el medio de presión;
  - d) dejar el parche en la piel durante la duración del periodo de muestreo;
  - e) retirar el parche de la piel y analizar la membrana para determinar la(s) concentración(es) del uno o más analitos seleccionados, y uno o más controles positivos y/o negativos analizando las una o más zonas.

55 En algunas formas de realización de la presente invención, el método comprende además los pasos:

- 60
- f) normalizar la(s) concentración(es) determinadas en el paso e) con la concentración determinada para el uno o más controles positivos;
  - g) comparar la concentración normalizada determinada en el paso f) con concentraciones normalizadas de un grupo de referencia de sujetos.

65 En algunas formas de realización de la presente invención, el uno o más analitos que se van a medir comprende al menos uno o más del siguiente grupo de analitos: proteína de la matriz extracelular (que afecta una característica de la piel), péptidos antimicrobianos (PAM), interleuquinas, factores de crecimiento y quimioquinas.

Otro aspecto de la presente invención proporciona kits para determinar el efecto de un tratamiento tópico que comprenden al menos dos parches según la presente invención. En algunas formas de realización de la presente invención, el kit comprende además un líquido de activación para activar la capa expandible, y mojar la membrana.

**5 Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra un parche según algunas formas de realización de la invención con membrana (101), medio de sujeción para la membrana (102), capa expandible (103) y capa adhesiva (104).

10 La figura 2 muestra una membrana (101) según algunas formas de realización de la invención con 20 zonas, cada una de aproximadamente 0,5 mm de diámetro, y separadas aproximadamente 0,59 mm en una membrana con un diámetro de 6,25 mm y un área de 1,23 cm<sup>2</sup>.

15 La figura 3 muestra una sección transversal de un parche según algunas formas de realización de la invención con una capa adhesiva, una capa expandible, una capa protectora (capa de humedad) y una capa de membrana con moléculas de afinidad tal como anticuerpos, colocado sobre la piel.

20 La figura 4 muestra una diferencia en intensidad cuando se comparan membranas con y sin capas expandibles. La "capa expandible 1" usa una lámina de celulosa comprimida y la "capa expandible 2" usa dos láminas de celulosa comprimida.

La figura 5 muestra una membrana según algunas formas de realización de la invención con 16 zonas, con distribución correspondiente de material diferente para introducir a las zonas y las concentraciones diferentes.

25 La figura 6 muestra un parche según algunas formas de realización de la invención, con membrana (601), medio de sujeción para la membrana (602), capa expandible (603), capa adhesiva (604), capa de humedad (605), capa de refuerzo (606), apertura que permite que el líquido añadido a través de la apertura esté en comunicación fluida con la capa expandible y/o la capa de humedad (610) y una capa desprendible para proteger el adhesivo (611), donde (A) es el lado lejos de la piel; (B) es el lado del parche que se enfrenta a la piel; y (C) es una vista transversal del parche.

30 La figura 7 muestra un ejemplo de un kit. En el paso 1 el kit contiene una toalla de limpieza desechable para limpiar el área donde se van a aplicar los dos parches. El paso 2 puede incluir un envase con un ingrediente activo para aplicación tópica y un anillo adhesivo para marcar el sitio donde se debe aplicar el ingrediente activo sobre la piel. El ingrediente activo se deja funcionar durante algún tiempo, por ejemplo 60 minutos. El paso 3 incluye dos parches: un parche control que se coloca en el área sin tratar limpiada, y un parche de medida que se coloca en la piel tratada con el ingrediente activo del paso 2. El paso 3 también incluye un fluido de activación para la membrana expandible y para humedecer la membrana. Los parches se dejan para recoger muestras de la piel durante algún tiempo, por ejemplo, 15 minutos. El paso 4 implica pegar el parche control y el parche de medida en las áreas designadas y enviar los parches a análisis.

35 El experto en la materia reconocerá, dado el beneficio de esta divulgación que ciertas características mostradas en las figuras 1-7 no están necesariamente dibujadas a escala. Las dimensiones y características de algunos rasgos en las figuras se pueden haber agrandado, distorsionado o alterado relativos a otros rasgos en las figuras para facilitar un mejor entendimiento de los ejemplos ilustrativos divulgados en el presente documento.

40 El experto en la materia reconocerá además que los rasgos individuales de las figuras se pueden intercambiar para obtener formas de realización adicionales, en particular con respecto a la figura 1 y 7.

**50 Descripción detallada de la invención**

Al describir las formas de realización de la invención se recurrirá a terminología específica por claridad. Sin embargo, no se pretende que la invención se limite a los términos específicos así seleccionados, y se entiende que cada término específico incluye todos los equivalentes técnicos que operan de una manera similar para lograr un fin similar.

En lo siguiente, se hace referencia a las figuras acompañantes que muestran a modo de ilustración cómo se puede practicar la invención.

60 Las figuras 1 y 6 muestran un esquema de un parche dérmico según ciertas formas de realización de la invención. El parche dérmico es para retener selectivamente uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto que comprende en secuencia:

- una capa de membrana (101) para retener uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto, con un primer y segundo lado, en donde el primer lado se adapta para estar en comunicación fluida con la piel del sujeto;
- opcionalmente medios de sujeción para asegurar la capa de membrana en su lugar;

- una capa adhesiva (104);
  - una capa de refuerzo,
- en donde entre la capa de refuerzo y la capa de membrana (101) hay
- una capa expandible (103) para aplicar presión a la capa de membrana.

5 Un parche dérmico es un parche que está configurado para estar asegurado de forma liberable a la piel de un sujeto, y que al estar en contacto con la piel retiene uno o más analitos. Típicamente una cubierta desprendible, tal como un revestimiento antiadherente siliconado protege la membrana y adhesivo del parche. La capa de refuerzo y la capa adhesiva podrían ser, por ejemplo, una cinta no tejida elástica porosa con un adhesivo suave. Como parches dérmicos se prevén parches de difusión, parches de ósmosis, parches eléctricos y cualquier otro tipo de parches con difusión forzada que recogerán diferentes analitos presentes en o cerca de la superficie de la piel, tal como fármacos, metabolitos de fármacos, metabolitos, glucosa, péptidos antimicrobianos (PAM), quimioquinas, interleuquinas, factores de crecimiento y/o hormonas. En ciertas formas de realización los analitos se seleccionan de la lista que consiste en: péptidos antimicrobianos (PAM), quimioquinas e interleuquinas. En ciertas formas de realización el parche dérmico es un parche de difusión, donde la difusión no es forzada.

10 Esta retención de analitos puede, en formas de realización preferibles, ser una retención selectiva, tal como que tiene una o más sección(es) de captura distintas con moléculas de afinidad, que se une selectivamente uno o más analito(s) reteniendo de esta manera selectivamente tal(es) analito(s) de interés. Las moléculas de afinidad en general son moléculas que tienen una afinidad mayor por un analito particular o clase de analitos que otros analitos. Los ejemplos más notables de tales moléculas son anticuerpos (policlonales y/o monoclonales, y fragmentos de los mismos), aptámeros, y receptores, así como otros andamiajes proteicos manipulados tales conocidos como AdNectin, Affibody, Anticalin, Knottin, DARPIn y Kunitz, así como andamiajes orgánicos y/o poliméricos.

20 El uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto que se va a analizar con el parche cubre todos los tipos de analitos presentes en el cuerpo o sobre el cuerpo. Típicamente los analitos se secretan junto con líquido corporal, y/o el líquido corporal es un medio portador para el analito. En algunas formas de realización los analitos son de la piel del cuerpo, tal como analitos extracelulares presentes en la piel, así como analitos presentes en la superficie de la piel, o sumergidos en la superficie dérmica, así como analitos sintetizados por queratinocitos u otras células en la piel. En otras formas de realización que se refieren, por ejemplo, a pruebas de drogas, los analitos son las drogas mismas o metabolitos de las mismas, que se transportarán con un líquido corporal a la superficie de la piel. El término uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto se pretende que cubra todos los analitos que se puedan transferir de la piel del cuerpo y sobre la capa de membrana según la presente invención. En algunas formas de realización el sudor o transpiración liberados de la piel del sujeto contendrá los analitos descritos anteriormente, que se transportarán a través del sudor o transpiración a la capa de membrana según la presente invención. Los sujetos ejemplares de la presente invención son cualquier criatura viviente, tal como mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

25 La capa de membrana (101) debe ser capaz de adsorber y/o absorber los analitos y en ciertas formas de realización la membrana se selecciona de nitrocelulosa, nailon activado, y/o PVDF, que son adecuados para inmovilización de en particular moléculas de captura, incluyendo anticuerpos. La membrana tiene un primer lado (frontal), que se adapta para estar en comunicación fluida con la piel del sujeto, es decir, que el analito es capaz de ser transportado de la piel del sujeto y sobre o en la membrana a través del primer lado. La membrana también tiene un segundo lado (trasero), que en algunas formas de realización están en contacto fluido con una capa de humedad, que asegura que la membrana entera (tanto el primer como el segundo lado) está húmeda mejorando de esta manera la comunicación fluida con la piel. El segundo lado de la membrana también podría estar solo parcialmente en comunicación fluida con una capa de humedad, y aun obtener el efecto de asegurar que la membrana entera está húmeda. En formas de realización preferida, la capa de membrana es permeable a líquidos acuosos, tal como el líquido corporal y el líquido acuoso en la capa de humedad. En algunas formas de realización la membrana está configurada de modo que no sea expandible.

30 En algunas formas de realización la capa de membrana (101) no está físicamente unida al parche dérmico de la piel, sino que es una parte separada. En otras formas de realización la capa de membrana comprende medios de sujeción que mantienen la membrana en su sitio. En algunas formas de realización los medios de sujeción son adhesivos que cubren parte del segundo lado de la capa de membrana, y en otras formas de realización los medios de sujeción (102) pueden estar unidos a la periferia de la capa de membrana (101).

35 El parche dérmico comprende una capa adhesiva (104) que asegura que el parche se puede sujetar reversiblemente a la piel de un sujeto. La capa adhesiva (104) está reforzada por una capa de refuerzo (606) que puede estar hecha de cualquier capa de refuerzo típica. En algunas formas de realización la capa de refuerzo no absorberá líquido acuoso.

40 La capa expandible (103) está colocada entre la capa de refuerzo y la capa de membrana. Es una capa que se puede expandir de modo que se aplique presión a la capa de membrana (101). Los ejemplos de una capa expandible son un material inflable, tal como una bolsa inflable, un dispositivo operado por muelle o un material hinchable. En algunas formas de realización, la capa expandible no es un desecante, y en algunas formas de

realización el material es celulosa comprimida, que se hincharan tras entrar en contacto con un líquido, tal como una solución acuosa, aplicando de esta manera presión a la capa de membrana, que se comprimirá estrechamente contra la piel del sujeto.

5 En algunas formas de realización, la capa de membrana (101) es menor que la capa expandible (103), y la capa expandible es menor que la capa adhesiva y capa de refuerzo.

10 En algunas formas de realización el medio de sujeción (102) del parche dérmico está hecho del mismo material que la capa de membrana (101), que es un ejemplo del medio de sujeción (102) que está unido a la periferia de la capa de membrana (101). Esto reduce los componentes en el parche y simplifica la fabricación.

15 En algunas formas de realización el medio de sujeción (102) no está unido a la capa expandible (103), sino más bien unido a la capa adhesiva (104). Esto permite que la capa expandible (103), que también está unida a la capa adhesiva (104) se expanda/mueva libremente sobre la superficie de la capa de membrana (101) evitando de esta manera tirar y/o distorsionar la capa de membrana de modo que se comprima uniformemente contra la piel.

20 En algunas formas de realización la capa expandible (103) es para aplicar presión y humedad a la capa de membrana. Un ejemplo de una capa expandible que es adecuada tanto para aplicar presión como humedad a la capa de membrana es celulosa comprimida, que se expande tras entrar en contacto con un líquido, tal como agua, y también liberará el agua de nuevo a componentes, con los que está en contacto fluido, tal como la membrana.

25 La capacidad de la membrana de mantenerse húmeda mejora la comunicación fluida entre la piel y la membrana. En algunas formas de realización del parche dérmico, una capa de humedad está presente para aplicar humedad a la capa de membrana (101). Esto también se muestra en la figura 6. La capa de humedad (605) es una capa entre la capa expandible (103, 603) y la membrana (101, 601). Es beneficioso tener una capa de humedad separada, cuando, por ejemplo, la capa expandible no es capaz de administrar humedad, tal como cuando es una bolsa de plástico inflable. Una capa de humedad también es beneficiosa cuando la capa expandible es capaz de administrar humedad, como, por ejemplo, cuando la capa expandible es una capa de celulosa comprimida, ya que la capa de humedad puede en algunas formas de realización ayudar a homogenizar la dispersión de humedad a la membrana (101) cuando un líquido, tal como un líquido acuoso, por ejemplo, un tampón, solución salina y/o agua, se añade a la capa de humedad. Las formas de realización ejemplares de la capa de humedad pueden ser una tela no tejida, tal como algodón, gasa y/o celulosa. Cuando la capa de humedad está hecha de un material liso también puede funcionar como una capa protectora, protegiendo la membrana de daño potencial de la capa expandible y también para distribuir uniformemente la presión de la capa expandible sobre la membrana entera. Un material liso tal como material absorbente mezcla de celulosa y rayón (por ejemplo, vendido como sumidero absorbente de mezcla de celulosa y rayón PALL, parte no. S70006 y que tiene una velocidad de absorción media de 10 seg/3 cm y una capacidad de absorción de agua de 40 µl/cm<sup>3</sup>) son adecuados tanto como capa de humedad, así como para ser una capa protectora lisa.

40 En algunas formas de realización la capa de humedad en comunicación fluida con la capa de membrana (101) es la misma capa que la capa expandible (103). Esta funcionalidad dual de la capa expandible reduce el número de componentes en el parche y simplifica la fabricación.

45 En algunas formas de realización la capa de refuerzo (606) tiene una apertura (610) que permite que el líquido, tal como agua, que se va a añadir a través de la apertura (610) esté en comunicación fluida con la capa expandible (103, 603) y/o la capa de humedad (605). De esta manera el parche dérmico se puede ajustar de forma liberable a la piel del sujeto y se puede añadir agua a través de la apertura (610) saturando de esta manera la capa de humedad con agua. En las formas de realización donde la capa expandible se expande tras entrar en contacto con agua, el agua añadida a través de la apertura activará la capa expandible y además humedecerá tanto la capa expandible como la capa de humedad, que a su vez servirá como un depósito de agua para mantener la membrana mojada a lo largo del periodo de muestreo. En algunas formas de realización la apertura está conectada a un blíster que comprende una cantidad predeterminada de un líquido, tal como agua, y que, cuando se rompe proporcionará el líquido a la capa expandible a través de la apertura (610).

55 En algunas formas de realización el área de la capa expandible (103, 603) abarca completamente la capa de membrana (101, 601). En algunas formas de realización el área de la capa expandible (103, 603) es igual a o mayor que el área de la capa de membrana (101, 601). En las formas de realización, donde la capa expandible cubre la capa de membrana, y es mayor que la capa de membrana, proporciona una capacidad de depósito adicional para mantener la membrana mojada a lo largo del periodo de muestreo.

60 La figura 2 muestra una capa de membrana, que en algunas formas de realización tiene un área de 1 cm<sup>2</sup> o menos. Esto reduce el área para muestreo y posibles efectos de heterogeneidad de un área de muestreo demasiado grande, así como reduce la vulnerabilidad del parche al movimiento del cuerpo que afecta al área donde se aplica el parche. En algunas formas de realización, la capa de membrana tiene un área de 0,5 cm<sup>2</sup> o menos, tal como menos de 0,2 cm<sup>2</sup>.

5 Como se ha descrito previamente, la membrana está, en formas de realización preferibles, adaptada para la retención selectiva de analitos, tal como teniendo una o más sección(es) de captura distintas con moléculas de afinidad, que se unen selectivamente a uno o más analito(s) reteniendo selectivamente de esta manera tal(es) analito(s) de interés. Según esto, en algunas formas de realización la membrana tiene al menos una sección de captura distinta que consiste en una o más moléculas de afinidad, por ejemplo, uno o más anticuerpos.

10 Una sección de captura habitualmente se define inmovilizando (tal como entrecruzando o conjugando) una molécula de afinidad a la membrana. Esto se puede hacer usando química de conjugación convencional, que conoce el experto en la materia. Además, cuando la membrana está hecha de un material tal como nitrocelulosa, nailon activado, PVDF, y las moléculas de afinidad son andamiajes proteicos, tal como anticuerpos, entonces, en algunas formas de realización, la química de entrecruzamiento o conjugación específica no es necesaria, ya que los anticuerpos se inmovilizarán en la membrana. Una manera de hacer una sección de captura definida es dispensando desde, por ejemplo, una aguja, jeringa, válvula o pipeta una cantidad y concentración específicas de la molécula de afinidad en un punto en la membrana. En algunas formas de realización las manchas de moléculas de afinidad se hacen en el primer lado de la membrana para permitir la difusión más rápida y más eficaz de la analitos hacia las moléculas de afinidad.

20 En algunas formas de realización el área de la sección de captura es menor de  $0,01 \text{ cm}^2$ , tal como menor de  $0,003 \text{ cm}^2$ . Se han preparado manchas con un diámetro de  $0,1 \text{ mm}$  con un área correspondiente de aproximadamente  $0,0001 \text{ cm}^2$ . Las manchas pequeñas, como las secciones de captura se llaman también en esta descripción, son ventajosas porque cuanto menores sean las manchas, menor es el área en que los analitos de interés se acumulan, cuando se unen a las manchas que contienen las moléculas de afinidad específicas. Esto permite un área más concentrada, lo que produce un tiempo de muestreo menor y/o mayor fiabilidad en los resultados, cuando se compara con una sección de captura mayor de  $0,01 \text{ cm}^2$ . También la menor área de captura hace posible incluir múltiples áreas de captura con la misma molécula de afinidad en, por ejemplo, con la misma y/o diferente afinidad para permitir redundancia y/o calibración en el sistema.

30 En algunas formas de realización la capa de membrana (101, 601) comprende al menos cuatro secciones de captura distintas para retener selectivamente el analito. En algunas formas de realización el número de secciones de captura distintas son al menos 6, tal como al menos 8, 10, 12, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100.

En algunas formas de realización el número de moléculas de afinidad diferentes es igual al número de secciones de captura diferentes.

35 En algunas formas de realización el número de moléculas de afinidad diferentes es menor que el número de secciones de captura diferentes, tal como cuando se usan diferentes concentraciones de la misma molécula de afinidad en la misma membrana, que se muestra en la figura 5.

40 En algunas formas de realización el número de diferentes moléculas de afinidad diferentes es más que el número de secciones de captura diferentes, tal como cuando el parche se usa para fines de cribado, y se usa una mezcla de diferentes moléculas de afinidad en una única zona de captura. En algunas formas de realización la mezcla de diferentes moléculas de afinidad es al menos 2, tal como al menos 8, 10, 12, 16, 18, 20, 25, 30, 40, 50, 70, 100.

45 En algunas formas de realización el parche dérmico según la presente invención es para uso en medicina, tal como, por ejemplo, en medicina personalizada, donde el efecto de un tratamiento médico se determina usando el parche dérmico según la presente invención.

50 En algunas formas de realización los efectos del tratamiento médico que se van a determinar/seguir usando el parche dérmico según la presente invención es tratamiento médico de enfermedades de la piel, tal como, por ejemplo, enfermedades de la piel inflamatorias e infecciosas tal como psoriasis, dermatitis.

55 En algunas formas de realización el parche dérmico según la presente invención es para uso en determinar/seguir tratamiento cosmético, tal como, por ejemplo, en cuidado de la piel personalizado, cuando el efecto de un tratamiento cosmético se determina usando el parche dérmico según la presente invención.

En algunas formas de realización el tratamiento cosmético que se va a determinar usando el parche dérmico según la presente invención es tratamiento cosmético tal como tratamiento antiarrugas, tratamiento antiedad, cicatrices en la piel, queloides, acné, trastornos de pigmentación, y/o afecciones relacionadas con inflamación de la piel.

60 En algunas formas de realización distintas secciones de captura contienen uno o más de los siguientes: controles positivos, controles negativos, y marcadores de normalización, que son analitos que se secretan a casi el mismo nivel en todos los sujetos que se puede usar para normalizar la concentración para comparación con otros sujetos o grupo de referencia de sujetos.

El control positivo es una o más secciones de captura. Un ejemplo de un control positivo es una inmunoglobulina biotinilada que también se puede usar para normalizar la reacción inmunitaria en el procesamiento de la membrana analítica.

5 El control negativo es una sección de captura sin anticuerpo de captura, que es ilustrativo del “ruido de fondo” de la membrana durante el análisis. Cuando se fabrica la membrana, el área de control negativo se trata de forma similar a otras secciones de captura, pero sin la adición de un anticuerpo de captura.

10 El factor de normalización es una o más secciones de captura que contienen, por ejemplo, un anticuerpo contra un antígeno que se expresa igualmente en tantos sujetos como sea posible. El experto en la materia puede identificar basado en el estado de la técnica uno o más candidatos para un factor de normalización como un factor que se expresa en cantidades próximas a iguales en diferentes sujetos.

15 Otro aspecto de la presente invención es un método para medir la concentración de uno o más analitos en una muestra que comprende los siguientes pasos:

- a) seleccionar uno o más analitos que se van a medir;
- b) inmovilizar en una membrana en un parche según la presente invención, una o más secciones de captura de moléculas de afinidad específicas para el uno o más analitos seleccionados, y uno o más controles positivos y/o negativos;
- 20 c) asegurar de forma extraíble el parche del paso b) sobre la piel de un sujeto y activar el medio de presión;
- d) dejar el parche en la piel durante la duración del periodo de muestreo;
- e) retirar el parche de la piel y analizar la membrana para determinar la(s) concentración(es) del uno o más analitos seleccionados, y uno o más controles positivos y/o negativos analizando las una o más zonas.

25 En algunas formas de realización, el método además comprende:

- f) normalizar la(s) concentración(es) determinadas en el paso e) con la concentración determinada para el uno o más controles positivos;
- 30 g) comparar la(s) concentración(es) normalizadas determinadas en el paso f) con concentración(es) normalizadas de un grupo de referencia de sujetos.

35 En algunas formas de realización el periodo de muestreo desde que el parche se ajusta de forma liberable a la piel y la capa expandible se activa y hasta que se retira de nuevo es menos de 30 minutos. En algunas formas de realización este periodo es más de 1 minuto, tal como más de 5 minutos. En otras formas de realización este periodo es entre 10 y 25 minutos, tal como entre 15 y 25 minutos. Este corto periodo permite al sujeto someterse a la prueba en una clínica, tal como una consulta de cosmólogo o especialista en cuidado de la piel, así como en casa.

40 Después de retirar el parche dérmico se puede enviar a un laboratorio para el procesamiento. También es posible que el parche se pueda procesar en el sitio, por ejemplo, en la consulta del dermatólogo o clínica de belleza con la ayuda de equipo de procesamiento automatizado. En algunas formas de realización la membrana está configurada para proporcionar una lectura directa, o una lectura después de añadir un líquido revelador.

45 En la técnica existen muchas maneras de analizar la membrana para unión del analito a las moléculas de afinidad. En algunas formas de realización el suceso de unión se visualizará usando un inmunoensayo colorimétrico (tal como análisis de ELISA) con o sin amplificación, tal como usando un ensayo de biotina-estreptavidina. La intensidad de las secciones de captura corresponde a la concentración del analito, y tal intensidad se puede determinar cuantitativamente escaneando las membranas y usando software de análisis. Se muestran ejemplos de membranas que se han analizado usando un ensayo colorimétrico en la figura 4. En algunas formas de realización se usarán técnicas de detección basadas en fluorescencia, inmuno-oro o nanopartículas para cuantificar los analitos unidos.

50 En algunas formas de realización de la presente invención el uno o más analitos que se van a medir comprenden al menos uno o más del siguiente grupo de analitos: proteína de la matriz extracelular (que afecta una característica de la piel), PAM, interleuquinas, factores de crecimiento y quimioquinas. Las alteraciones en los patrones de estas proteínas reguladoras en la piel del individuo antes y después del/de los tratamiento(s) se pueden comparar y se puede alcanzar una conclusión respecto a la eficacia del tratamiento. En algunas formas de realización parte de la piel se trata con un agente, y se aplican dos parches dérmicos, un encima del área tratada, y un segundo cerca del área tratada, tal como 1, 2, 3 o 4 cm o más del área tratada.

60 En algunas formas de realización de la presente invención se proporciona un kit para determinar el efecto de un tratamiento tópico. Aquí uno o más ingrediente(s) activo(s) se aplicarán por vía tópica a un área de interés en la superficie de la piel. Después de haber aplicado el ingrediente activo, y dejar tiempo suficiente para que funcione, un parche se coloca sobre el área tratada, y otro parche se coloca sobre un área sin tratar. Según esto, en algunas formas de realización de la presente invención el kit comprende al menos dos parches según la presente invención.

65 En algunas formas de realización de la presente invención el kit también proporciona un líquido de activación para humedecer la membrana y/o para activar la capa expandible, por ejemplo, en las formas de realización donde la

capa expandible se hincha tras entrar en contacto con agua, tal como, por ejemplo, celulosa comprimida. El líquido de activación es en algunas formas de realización acuoso, tal como agua, o agua isotónica. En otras formas de realización el líquido de activación es tampón PBS acuoso.

5 La figura 7 muestra un ejemplo de un kit. En el paso 1 el kit contiene una toalla de limpieza desechable para limpiar el área donde se van a aplicar los dos parches. El paso 2 puede incluir un envase con un ingrediente activo (por ejemplo, producto, fármaco en crema, etc.) para aplicación tópica y un anillo adhesivo para marcar el sitio donde se aplicaría el ingrediente activo sobre la piel. El ingrediente activo se deja funcionar durante algún tiempo, por ejemplo 10 60 minutos. El paso 3 incluye dos parches: un parche control que se coloca en el área sin tratar limpiada, y un parche de medida que se coloca en la piel tratada con el ingrediente activo del paso 2. El paso 3 también incluye un líquido de activación para la membrana expandible y para humedecer la membrana. Los parches se dejan para recoger muestras de la piel durante algún tiempo, por ejemplo, 15 minutos. El paso 4 implica pegar el parche control y el parche de medida en las áreas designadas y enviar los parches a análisis.

15 En algunas formas de realización los ingredientes activos aplicados por vía tópica a la piel podrían ser, por ejemplo, ácido retinoico y/o progesterona, y los analitos que se van a detectar son al menos un analito seleccionado de uno o más de los grupos que comprenden:

- 20 a) un primer conjunto de analitos indicativos de que el compuesto o composición afecta a la regeneración de la piel, en donde dicho primer conjunto de analitos es al menos una quimioquina tal como CCL5, CCL27 y CXCL1 y/o al menos un PAM tal como DEFB1, DEFB103A, DEFB4A, CAMP, DCD, S100A7 y RNASE7, y/o al menos una interleuquina tal como IL1.
- 25 b) un segundo conjunto de análisis indicativo de que dicho compuesto o composición afecta a la elasticidad de la piel y/o la resistencia de la piel, en donde dicho segundo conjunto de analitos es al menos un PAM tal como DEFB1, DEFB103A, DEFB4A, CAMP, DCD, S100A7 y RNASE7.

30 El dispositivo de detección de la invención puede detectar uno o más PAM y/o una o más quimioquinas y/o interleuquinas de cada conjunto de biomarcadores. El conjunto específico de biomarcadores que se va a medir puede depender de qué compuesto o composición cosmética se va a evaluar. La razón es que la correlación entre una MEC y un PAM puede variar dependiendo del compuesto o composición aplicada a la piel.

El efecto de la capa expandible se puede ver en el ejemplo 4, que compara la intensidad cuantitativa y desviación estándar de los analitos unidos en un parche según la figura 6 con y sin la capa expandible.

35 La diferencia en intensidad también se puede determinar cualitativamente comparando el parche de la figura 6 con y sin capa expandible, los resultados mostrados en la figura 4, donde se ve claramente que la intensidad es mejor en las membranas con la capa expandible que sin la capa expandible.

40 Cuando se describen las formas de realización de la presente invención, las combinaciones y permutaciones de todas las formas de realización posibles no se han descrito explícitamente. No obstante, el solo hecho de que ciertas medidas se enumeran en reivindicaciones dependiente mutuamente diferentes o se describen en formas de realización diferentes no indica que una combinación de estas medidas no se pueda usar con ventaja. La presente invención prevé todas las posibles combinaciones y permutaciones de las formas de realización descritas.

## 45 Ejemplos

### Materiales y métodos

#### Materiales

- 50
- Plástico de cultivo celular: 48 pocillos (Greiner)
  - Kit de ELISA hBD-1 (PeproTech no. de catálogo 900-K202)
  - Kit de ELISA hBD-2 (PeproTech no. de catálogo 900-K172)
  - Kit de ELISA IL-1a (PeproTech no. de catálogo 900-K11)

55

  - Prototipos de membrana: membrana de nitrocelulosa Hydro-C Extra (Amersham No. de catálogo RPN2020E; material no. 121224) con anticuerpos de captura aplicados en manchas:
  - anticuerpo de captura hBD-1 (PeproTech no. de catálogo 900-K202)
  - anticuerpo de captura hBD-2 (PeproTech no. de catálogo 900-K172)
  - anticuerpo de captura IL-1a (PeproTech no. de catálogo 900-K11)

60

  - Sistema de amplificación de señal catalizada (CSA) (Dako, No de catálogo K-1500)
  - Seroalbúmina bovina (BSA) (PAA No de catálogo K41-001)
  - PBS 1x
  - Tween-20 (AppliChem, no. de catálogo A4974,0500)
  - Agua MilliQ

65

  - Pinzas para el manejo de membranas

- Tampón de lavado – PBS 1 x (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,06 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2,97 mM, NaCl 155,17 mM, pH 7,2)- Tween al 0,1% + BSA al 1%
- Agente bloqueante: BSA al 5% en PBS 1x (filtrar la solución de BSA)
- La proteína estándar (control positivo) y anticuerpo de detección se diluyen en diluyente
- Diluyente – PBS 1x-Tween al 0,05%+BSA al 1%

Ejemplo 1 – Preparación del parche de análisis que contiene anticuerpos de captura hBD1 e IL1a

El parche de análisis se produjo usando anticuerpos de captura de un kit de desarrollo de ELISA IL-1 $\alpha$  humana (no. de catálogo 900-K11 de PeptoTech) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml; y kit de desarrollo de ELISA de HBD 1 humana (no. de catálogo 900-K202 de PeptoTech) a una concentración de 50  $\mu$ g/ml. Como control negativo se usó PBS 1x-glicerol al 20%, y como control positivo se usó anticuerpo de detección de hBD1 a 50  $\mu$ g/ml. Los anticuerpos de captura se aplicaron en manchas en la membrana usando un sistema de dispersión sin contacto (BioDot AD 3400 con sistema de dispersión BioJet plus). En este ejemplo el volumen de mancha dispersado fue 30 nl.

Ejemplo 2 – Exposición del parche de análisis a la piel

Colocar el parche de análisis sobre la piel (control para unión estrecha, la membrana tiene que tener un buen contacto con la piel) y mojar el parche (capa de expansión, membrana de análisis) con 150  $\mu$ l de PBS 1x. Mantener el parche en contacto con la piel durante 15 min. Retirar el parche y separar la membrana del resto del parche. Colocar la membrana en una placa de 48 pocillos con el lado de la proteína hacia arriba.

Ejemplo 3 – Visualización del analito unido a la membrana

Para visualizar el analito unido a la membrana después de la exposición a la piel la membrana se incubó con anticuerpos de detección de la siguiente manera. Lavar las membranas 3x5 min en 200  $\mu$ l de tampón de lavado. Preparar la mezcla de solución de anticuerpo de detección, hBD-1, 1:2000 e IL-1a, 1:1000 en tampón diluyente. Incubar las membranas con la solución del anticuerpo de detección 45 min a temperatura ambiente RT en un agitador. Lavar las membranas 5x5 min con 200  $\mu$ l de tampón de lavado cada vez.

La señal se amplifica usando el sistema de amplificación de señal catalizada (CSA) (Dako) de la siguiente manera. Preparar el complejo estreptavidina-biotina: 1 gota (una gota es ~ 40  $\mu$ l) de reactivo A del complejo estreptavidina biotina, 1 gota de reactivo B del complejo de estreptavidina biotina y hasta 1 ml con solución de reactivo del complejo estreptavidina biotina. Diluir el reactivo del complejo de estreptavidina biotina preparado para 1/9 en PBS 1x-Tween al 0,05%. Pipetear en cada pocillo 150  $\mu$ l de solución e incubar durante 15 min a temperatura ambiente (RT). Lavar las membranas 3x5 min en 200  $\mu$ l de tampón de lavado. Incubar las membranas con la solución de reactivo de amplificación: 1/8 de reactivo de amplificación, 7/8 de PBS 1x-Tween al 0,05%. Pipetear en cada pocillo 150  $\mu$ l de solución. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente (RT) seguido por lavar 3x5 min en 200  $\mu$ l de tampón de lavado. Incubar con solución estreptavidina-HRP diluida: 1/8 de estreptavidina-HRP; 7/8 de PBS 1x-Tween al 0,05%. Pipetear en cada pocillo 150  $\mu$ l de solución e incubar durante 15 min a RT.

Lavar las membranas dos veces con 200  $\mu$ l de tampón de lavado seguido por un lavado con PBS 1x/Tween al 0,05%. Incubar con 100  $\mu$ l de DAB (tetracloruro de 3,3'-diabencidina (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,8% añadido; 20  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,8% para 1 ml de DAB) durante 15 min. Para la reacción con agua MilliQ (~200  $\mu$ l por pocillo): añadir agua MilliQ en los pocillos y aspirar instantáneamente. Lavar las membranas con agua MilliQ 10x2 min (100  $\mu$ l de una vez).

Las membranas se dejan secar al aire y después la intensidad del color, proporcional a la concentración de los analitos se determinó usando software de análisis de imagen (Dige Imager, GE Healthcare) según el protocolo en el software para cuantificar la cantidad de analito unido. Las membranas se escanearon usando un escáner de documentos a 1200 dpi (Canon Scan LiDE 600F). Las imágenes obtenidas se analizaron usando software de análisis de micromatriz y transferencia en mancha/ranura Image Quant TL V2005 (GE Healthcare). La cantidad de analitos unidos a los anticuerpos de captura se calculó usando una curva de calibración estándar. En el procedimiento de calibración se incubaron membranas con anticuerpos de captura en soluciones que contenían diferentes concentraciones de analitos seguido por el procesamiento usando el protocolo estándar. Basado en los resultados obtenidos se construyó la curva de calibración y se usó para determinar la cantidad de analitos unidos al anticuerpo de captura.

Ejemplo 4 – Comparación de los resultados de parches con y sin material expandible

La comparación de resultados de análisis obtenidos usando el análisis de parches de piel con y sin capa expandible muestra que la capa expandible mejora la reproducibilidad y calidad de los resultados del análisis, como es evidente de la figura 6 y la tabla posterior.

La tabla muestra el efecto de la capa expandible en el nivel de detección y variación de los resultados del análisis del parche. Parches con y sin material expandible (en el parche sin material expandible, el material expandible se intercambió con un material no expandible) que tenían dos anticuerpos de captura diferentes, IL-1a y hBD1 (cada

uno de los anticuerpos estaba representado por 6 manchas) se mojaron cada uno con PBS (150 µl) y después de ser ajustados de forma eliminable a 4 individuos. Las membranas se expusieron durante 15 min siguiendo un procesamiento idéntico. Se analizó la intensidad de la inmunotinción de cada mancha usando el analizador de imágenes y se calcularon la intensidad media, desviación estándar y desviación estándar en %.

5

<b>Parche con material expandible</b>	Media de seis manchas de IL1a	Desviación estándar en %
Persona No. 1	105132 ± 9521	9%
Persona No. 2	135358 ± 7835	6%
Persona No. 3	121045 ± 7615	6%
Persona No. 4	150986 ± 7063	5%
<b>Parche sin material expandible</b>		
<b>Parche sin material expandible</b>	Media de seis manchas de IL1a	Desviación estándar en %
Persona No. 1	53332 ± 11085	21%
Persona No. 2	84085 ± 22905	27%
Persona No. 3	86589 ± 20650	24%
Persona No. 4	79966 ± 21615	27%

Se puede ver de las lecturas de los parches que contienen una capa expandible produjo un valor significativamente mayor de analitos y produjo desviación estándar y desviación estándar en % significativamente menores, mientras que los parches sin material expandible produjeron lecturas medias significativamente menores y desviaciones estándar mayores.

10

Esta mayor sensibilidad y menor variación del análisis de los parches con la capa expandible está relacionado a un contacto firme y homogéneo de la membrana con la piel debido a la presión constante creada por la capa expandible.

15

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un parche dérmico para retener selectivamente uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto que comprende:
- una capa de membrana (101, 601) para retener uno o más analito(s) de un cuerpo de un sujeto, con un primer y un segundo lado, en donde el primer lado se adapta para estar en comunicación fluida con la piel del sujeto, en donde la membrana se configura de modo que no sea expandible;
  - opcionalmente medios de sujeción para asegurar la capa de membrana en su sitio;
  - 10 - una capa adhesiva (104);
  - una capa de refuerzo (606);
- y en donde entre la capa de refuerzo (606) y la capa de membrana (101) hay una capa expandible (103) para aplicar presión a la capa de membrana.
- 15 2. El parche dérmico según la reivindicación 1, **caracterizado en que** el medio de sujeción (102, 602) está hecho del mismo material que la capa de membrana (101, 601), y en donde el medio de sujeción no está unido a la capa expandible (103, 603).
- 20 3. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** la capa expandible (103, 603) es para aplicar presión y humedad a la capa de membrana.
4. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** hay una capa de humedad (605) para aplicar humedad a la capa de membrana (101, 601).
- 25 5. El parche dérmico según la reivindicación 4, **caracterizado en que** la capa de humedad en comunicación fluida con la capa de membrana (101, 601) es la misma capa que la capa expandible (103, 603).
- 30 6. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** la capa expandible (103, 603) contiene celulosa comprimida.
7. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** la capa de refuerzo (606) tiene una apertura (610) que permite que el líquido añadido a través de la apertura (610) esté en comunicación fluida con la capa expandible (103, 603) y/o la capa de humedad (605).
- 35 8. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** el área de la capa expandible (103, 603) abarca completamente la capa de membrana (101, 601) y donde el área de la capa expandible (103, 603) es igual a o mayor que el área de la capa de membrana (101, 601).
- 40 9. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** el área de la capa de membrana (101, 601) es  $1 \text{ cm}^2$  o menos.
- 45 10. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** la capa de membrana (101, 601) comprende una o más sección(es) de captura distintas con molécula(s) de afinidad para retener selectivamente uno o más analito(s), preferiblemente donde el área de la sección de captura es menor de  $0,01 \text{ cm}^2$ , preferiblemente menor de  $0,003 \text{ cm}^2$ .
- 50 11. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes **caracterizado en que** la capa de membrana (101, 601) comprende al menos cuatro secciones de captura distintas para retener selectivamente el analito donde en cada una de las al menos cuatro secciones de captura distintas, al menos cuatro moléculas de afinidad diferentes se han inmovilizado.
- 55 12. El parche dérmico según cualquiera de las reivindicaciones precedentes para uso en medicina.
- 60 13. Método para medir la concentración de uno o más analitos en una muestra que comprende los siguientes pasos:
- a) seleccionar uno o más analitos que se van a medir;
  - b) inmovilizar en una membrana en un parche según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 una o más zonas de moléculas de afinidad específicas para el uno o más analitos seleccionados, y uno o más controles positivos y/o negativos;
  - c) asegurar de forma separable el parche del paso b) sobre la piel de un sujeto y activar los medios de presión;
  - d) dejar el parche sobre la piel durante la duración del periodo de muestreo;
  - 65 e) retirar el parche de la piel y analizar la membrana para determinar la(s) concentración(es) del uno o más analitos seleccionados, y uno o más controles positivos y/o negativos analizando la una o más zonas.

14. Método según la reivindicación 13 que además comprende:
- 5 f) normalizar la(s) concentración(es) determinadas en el paso e) con la concentración determinada para el uno o más controles positivos
- g) comparar la concentración normalizada determinada en el paso f) con concentraciones normalizadas de un grupo de referencia de sujetos.
- 10 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, **caracterizado en que** el uno o más analitos que se van a medir comprenden al menos uno o más del siguiente grupo de analitos: proteína de matriz extracelular (que afecta una característica de la piel), PAM, interleuquinas, factores de crecimiento y quimioquinas.
- 15 16. Kit para determinar el efecto de un tratamiento tópico que comprende al menos dos parches según las reivindicaciones 1-11, y opcionalmente un líquido de activación para activar la capa expandible, y mojar la membrana.

Figura 1 – Parche

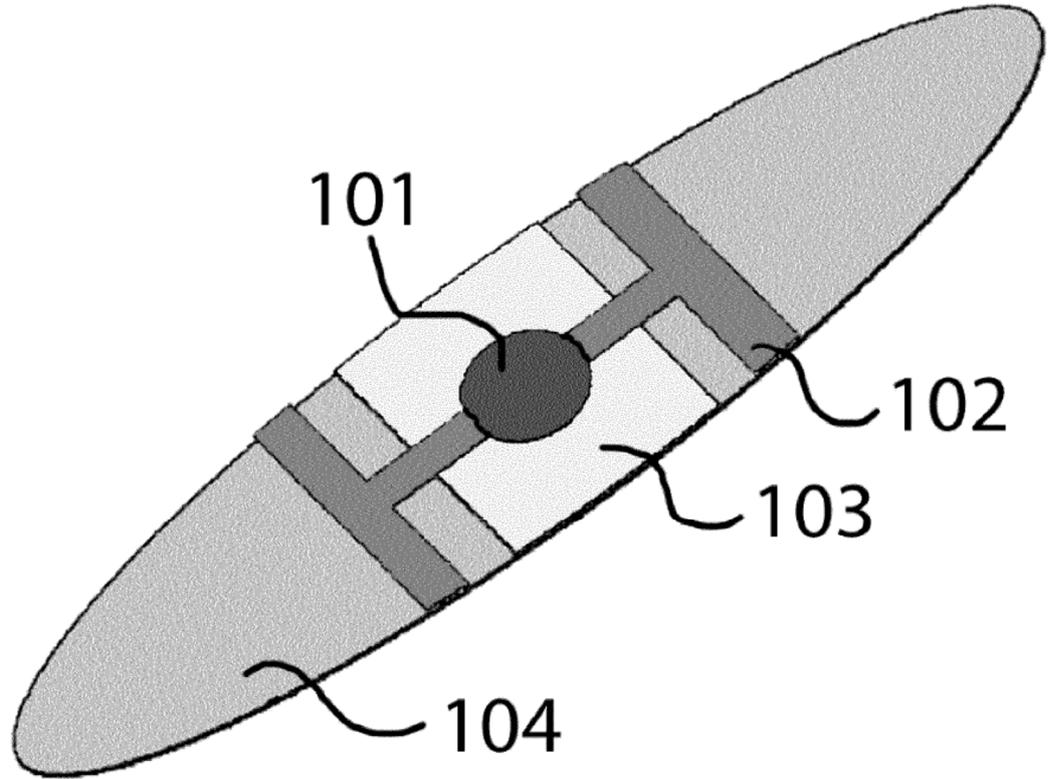


Figura 2 – Una forma de realización de membrana con anticuerpos

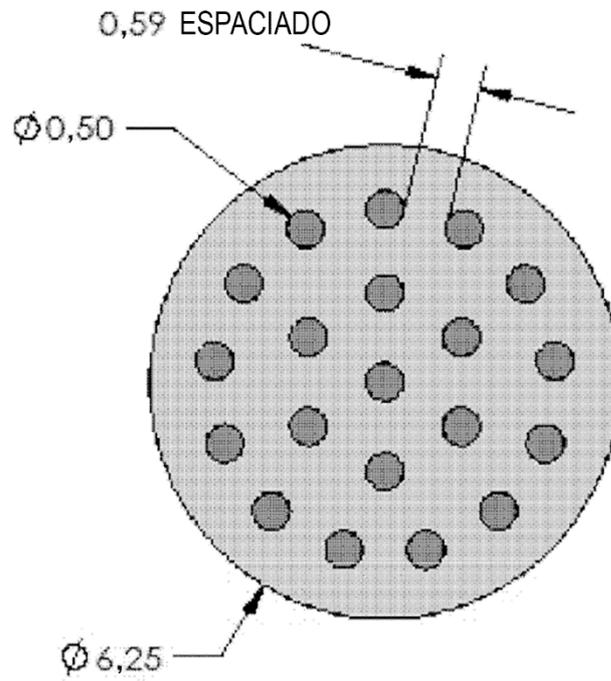
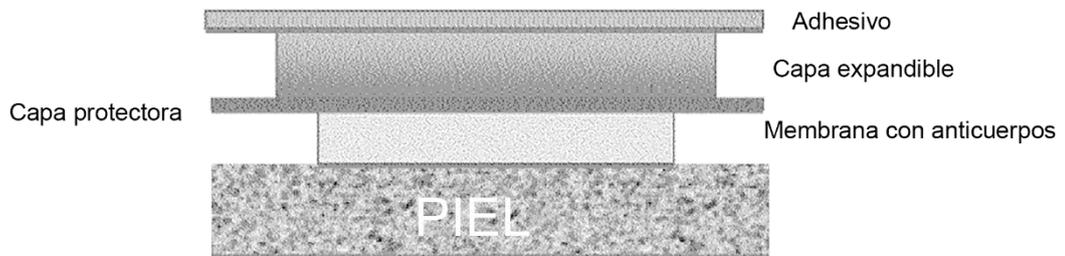


Figura 3 – Sección transversal del parche de análisis



**Figura 4 – Diferencia en intensidad cuando se comparan membranas con y sin capas expandibles**

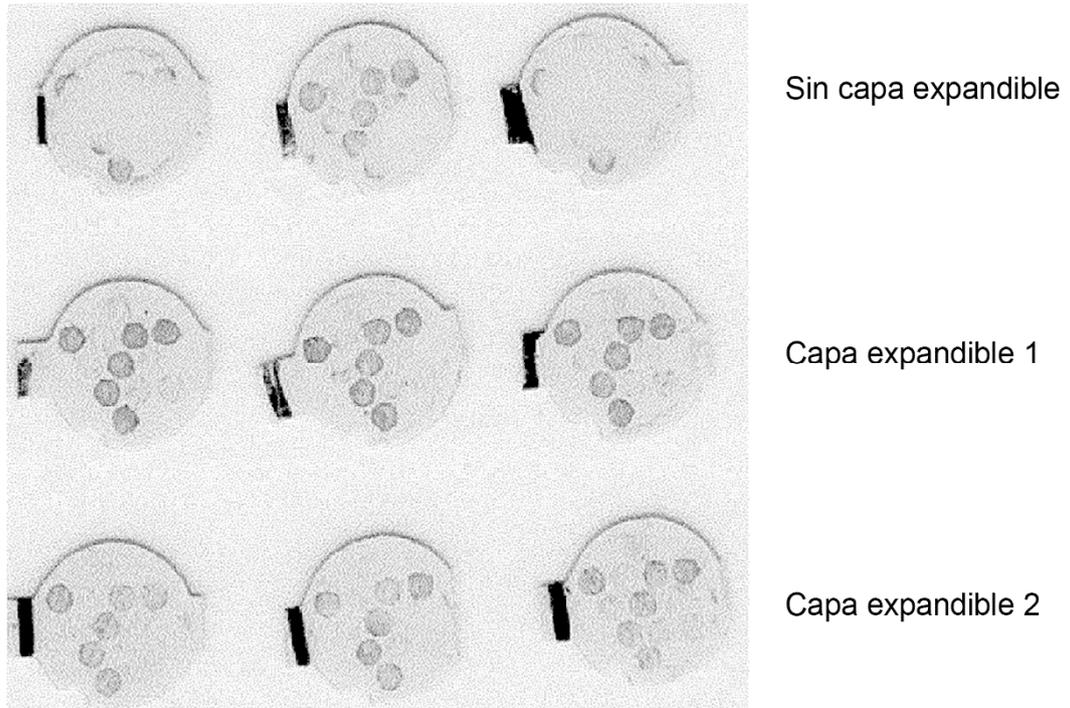
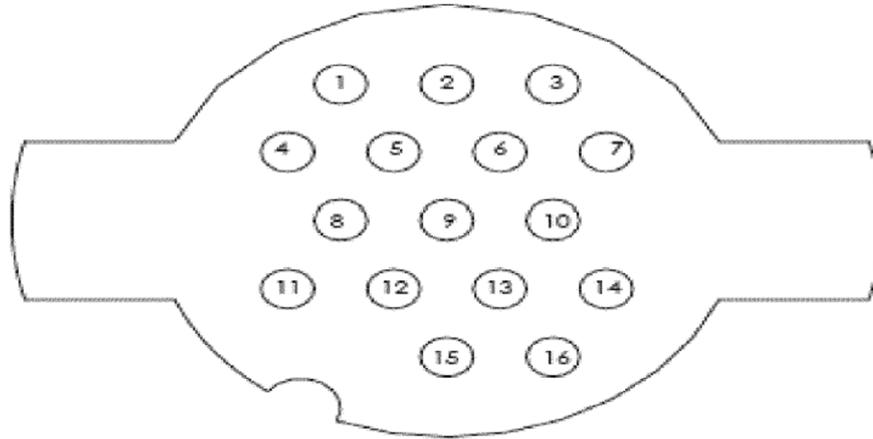


Figura 5 – Membrana de micromatriz con 16 manchas



MANCHA NÚMERO	MATERIAL PARA IMPRIMIR	CONCENTRACIÓN (µg/ml)
1	+ Control Pos	1
2	hBD2	50
3	- Control Neg	(tampón)
4	IL1α	50
5	IL1α	5
6	hBD1	100
7	hBD2	100
8	hBD2	100
9	hBD1	50
10	hBD2	50
11	+ Control Pos	1
12	hBD1	100
13	IL1α	5
14	IL1α	50
15	hBD1	50
16	- Control Neg	(tampón)

Figura 6 – Parche

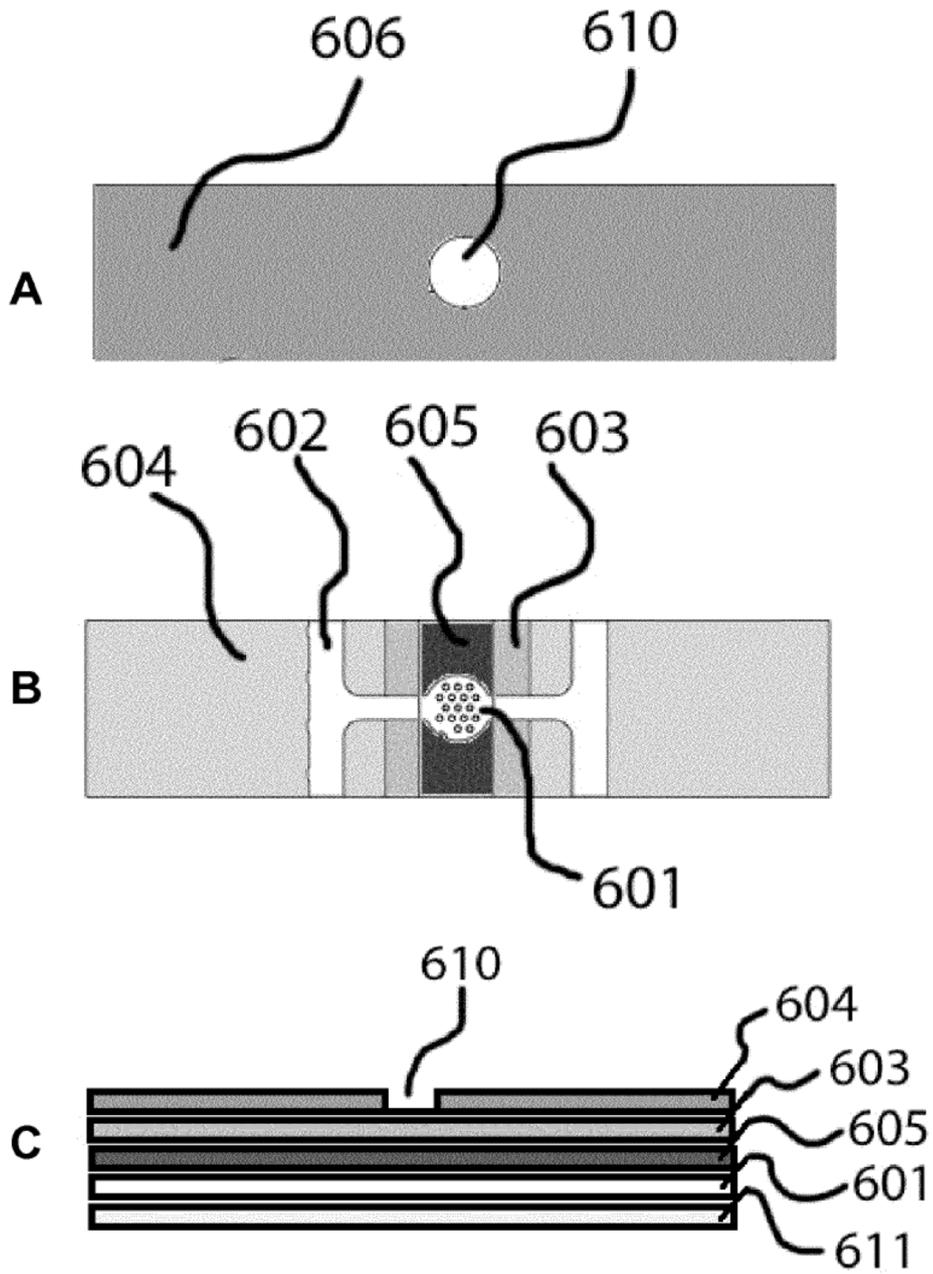


Figura 7 – Kit

1



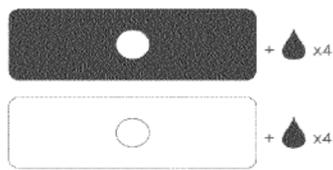
2

60 min



3

15 min



4

