

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 309**

51 Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2014 PCT/EP2014/059676**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14184151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2014 E 14723092 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019 EP 2996808**

54 Título: **Dispositivo de ensayo de flujo lateral**

30 Prioridad:

14.05.2013 EP 13167722

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

20.07.2020

73 Titular/es:

FIBROTX OÜ (100.0%)

Mäealuse 4

12618 Tallinn, EE

72 Inventor/es:

NEUMAN, TOOMAS

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 774 309 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 de ensayo de flujo lateral

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a kits de diagnóstico y a métodos basados en dispositivos de ensayo de flujo lateral para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba dentro de una muestra de prueba tomada de una superficie de piel de un mamífero; así como piezas de inserción para dispositivos de ensayo de flujo lateral.

Antecedentes de la invención

10 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 la genómica funcional y la comprensión de que las células de diferentes individuos presentan diferencias significativas en la estructura del genoma, los perfiles de expresión de genes y proteínas y los mecanismos reguladores que controlan funciones celulares específicas. Esto ha dado lugar a un interés en detectar y/o cuantificar biomarcadores para evaluar el estado actual de un mamífero por medio de la presencia, ausencia y/o concentración de uno o más biomarcadores.

15 Además, existe la necesidad de evaluar cómo de eficaces son los tratamientos a nivel personal, tal como en los campos de medicina personalizada y cuidado de la piel personalizado.

20 Con respecto a la medicina personalizada, existe la necesidad de dispositivos de diagnóstico inmediato que son útiles en el diagnóstico o pronóstico de un trastorno, tal como un trastorno de la piel, o en la predicción de la susceptibilidad, aparición o gravedad probable de un trastorno, tal como un trastorno de la piel en un individuo; o en la predicción del grado de respuesta de un individuo a la terapia; o en la predicción y/o monitorización de la recaída después del tratamiento de un trastorno particular, tal como un trastorno de la piel.

25 Con respecto al cuidado de la piel personalizado, los efectos reivindicados de efectos antiarrugas y antienvjecimiento de los productos cosméticos se basan normalmente en el supuesto de que estos productos presentan un efecto similar sobre todos los individuos. Sin embargo, este no es el caso. Las diferentes personas y los diferentes tipos de piel reaccionan de manera distinta a los productos cosméticos, de ahí la necesidad de dispositivos de diagnóstico inmediato que pueden determinar los efectos o el grado de respuesta de un individuo a un tipo particular de producto para el cuidado de la piel.

Un método de ensayo rápido que se ha usado para pruebas de diagnóstico de diagnóstico inmediato, tal como una prueba de embarazo en el hogar, es el método de ensayo de flujo lateral.

30 Uno de los desafíos a los que se enfrentan los métodos de ensayo de flujo lateral es el suministro de una muestra para someter a prueba, en particular el suministro de una forma de muestra en la piel, y en particular para proporcionar muestras de la piel de una manera reproducible y/o uniforme.

En el caso de pruebas de embarazo en el hogar, la muestra es en la mayoría de casos orina.

35 La solicitud de patente estadounidense 2004/184954 (Huiyan *et al.*) da a conocer un dispositivo para recoger y someter a prueba una muestra líquida, por ejemplo una muestra viscosa, tal como un líquido oral o saliva. La muestra recogida puede almacenarse y usarse más adelante para la confirmación de los resultados de la prueba. El reservorio de la muestra almacenada puede retirarse del dispositivo antes del almacenamiento.

40 La solicitud de patente estadounidense 2005/0175992 de Aberl *et al.* describe un método para el diagnóstico rápido de dianas en líquidos corporales humanos. En particular, se emplea un método de ensayo de flujo lateral, en el que se recoge una muestra de manera no invasiva del líquido ocular usando un elemento de hisopo.

El elemento de hisopo del documento US 2005/0175992 no es particularmente muy adecuado para obtener analitos de la piel, en particular cuando existe el deseo de proporcionar una muestra de una manera reproducible y/o uniforme, o si existe el deseo de comparar el nivel de uno o más analitos de prueba dentro de la muestra con una muestra de control tomada de la piel en un sitio diferente.

45 Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de kits y métodos para obtener y analizar analitos de la piel, en particular dispositivos de diagnóstico inmediato que permitan la detección rápida. También existe la necesidad en la técnica de métodos de muestreo para dispositivos de diagnóstico inmediato que puedan proporcionar una muestra de una manera reproducible y/o uniforme en comparación con la técnica anterior.

Sumario de la invención

50 La presente invención se realizó en vista de la técnica anterior descrita anteriormente, y el objeto de la presente invención es proporcionar dispositivos de diagnóstico inmediato que sean particularmente muy adecuados para obtener analitos de, por ejemplo, la superficie de piel humana, de una manera reproducible y/o uniforme en

comparación con la técnica anterior, o al menos proporcionar dispositivos de diagnóstico inmediato con modos alternativos de obtener un analito de la piel.

5 Para resolver el problema, la presente invención proporciona un kit de diagnóstico para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba dentro de una muestra de prueba tomada de una superficie de piel de un mamífero, tal como la superficie de piel de un mamífero, comprendiendo el kit de diagnóstico: una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201), teniendo la membrana un grosor, una anchura y una longitud, opcionalmente fijada a un soporte rígido (202), estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba; un dispositivo de ensayo de flujo lateral configurado (300, 400) para aceptar la pieza de inserción independiente (200, 411); y un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción independiente a una superficie de piel de un mamífero (213).

15 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de flujo lateral se construye para formar un lecho capilar, cuando se acopla con la pieza de inserción independiente, en el que el dispositivo de flujo lateral (100, 500) acoplado con la pieza de inserción independiente comprende una zona de elución (101, 501) y un área de detección (DA), así como uno o más de los siguientes: una almohadilla de conjugado (102, 502) y una almohadilla absorbente (104, 504).

20 En algunas realizaciones de la presente invención, la membrana tiene un grosor igual a 4 mm o menos, y una anchura y una longitud, ambas mayores que el grosor, en la que el dispositivo de flujo lateral está configurado para tener un sentido de flujo lateral (L) sustancialmente en dirección a un plano creado por la anchura y la longitud de la membrana.

En algunas realizaciones de la presente invención, el elemento de sujeción (210) comprende una capa expansible (212) configurada para aplicar presión a la pieza de inserción independiente (200, 411) presionando de ese modo la pieza de inserción independiente (200, 411) contra la superficie de piel del mamífero (213).

25 Es decir, los inventores de la presente invención, en un primer aspecto de la invención, encontraron que la división del dispositivo de ensayo de flujo lateral tradicional en una pieza de inserción independiente configurada para obtener una muestra de prueba de, por ejemplo, la superficie de piel humana y un dispositivo de ensayo de flujo lateral configurado para aceptar la pieza de inserción independiente, es útil para obtener muestras de la superficie de piel de un mamífero, tal como la superficie de piel de un ser humano, en particular cuando se combina con un elemento de sujeción que asegura de manera liberable la pieza de inserción independiente a la superficie de una piel.

30 En realizaciones preferidas, el elemento de sujeción puede aplicar presión adicional a la pieza de inserción independiente mediante las acciones de una capa expansible que presiona la pieza de inserción independiente de manera más firme a la piel. Cuando la técnica anterior descrita anteriormente (documento US 2005/0175992) sugiere que un movimiento giratorio de un elemento de hisopo es suficiente para obtener una muestra, los presentes inventores se han dado cuenta de que un modo alternativo de obtener una muestra, y en muchos casos un método de muestreo superior para obtener muestras de la piel, es mediante sujeción de manera liberable una pieza de inserción independiente a la piel, y aplicando presión adicional desde una capa expansible.

35 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es la zona de elución (101). Es decir, que la pieza de inserción independiente está adaptada para ajustarse en la zona de elución o el área de muestra. Por consiguiente, la pieza de inserción independiente no es el área de detección (DA).

40 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende una zona de elución (501) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es el área de detección (DA). Es decir, que la pieza de inserción independiente está adaptada para ajustarse en el área de detección, que puede comprender una zona de detección (505) que tiene inmovilizadas una o más moléculas de afinidad. Por consiguiente, la pieza de inserción independiente no es la zona de elución o el área de muestra. Esto es un modo modificado de proporcionar un ensayo de flujo lateral, en el que el uno o más analitos de prueba ya estarán unidos a las moléculas de afinidad inmovilizadas una vez que la pieza de inserción independiente se coloque en el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

45 En algunas realizaciones de la presente invención, la pieza de inserción independiente comprende una membrana (201) fijada a un marco de soporte rígido (202).

En algunas realizaciones de la presente invención, el marco de soporte rígido (202) cubre el perímetro de la membrana (201).

50 En algunas realizaciones de la presente invención, la capa expansible del elemento de sujeción contiene celulosa comprimida, y en la que la capa expansible no está en comunicación de fluido con la pieza de inserción independiente (200, 411).

En algunas realizaciones de la presente invención, el área de detección (DA) comprende una zona de detección (105, 505) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva uno o más analito(s) de prueba y opcionalmente una zona indicadora (106, 506) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva una o más molécula(s) de afinidad indicadoras.

- 5 En algunas realizaciones de la presente invención, en las que el uno o más analito(s) de prueba se seleccionan de la lista que consiste en: quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas y otras moléculas presentes en la piel de un mamífero, tales como las seleccionadas de la lista que consiste en: IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-8, CCL-2, CCL-5, CCL-27, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-9, trapina2/elafina, hBD-1, hBD-2, VEGF y TSLP.

- 10 Se da a conocer en el presente documento una pieza de inserción para un dispositivo de ensayo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201) fijada a un marco de soporte rígido (202), estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba de una superficie de piel de un mamífero (213).

En algunas realizaciones de la presente invención, la membrana tiene un grosor igual a o menor de 4 mm, y una anchura y una longitud ambas mayores que el grosor.

En algunas realizaciones de la presente invención, el marco de soporte rígido cubre el perímetro de la membrana.

- 15 En algunas realizaciones de la presente invención, la pieza de inserción que comprende adicionalmente un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción a una superficie de piel de un mamífero (213).

- 20 En algunas realizaciones de la presente invención, la pieza de inserción es el área de detección (DA) del dispositivo de ensayo de flujo lateral que comprende una zona de detección (105, 505) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva uno o más analito(s) de prueba.

En algunas realizaciones de la presente invención, la membrana es permeable al agua desde el lado hacia afuera (es decir, el lado opuesto) de la superficie de piel a la que está configurada la membrana para unirse.

- 25 En algunas realizaciones de la presente invención, en las que el uno o más analito(s) de prueba se seleccionan de la lista que consiste en: quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas y otras moléculas presentes en la piel de un mamífero, tales como las seleccionadas de la lista que consiste en: IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-8, CCL-2, CCL-5, CCL-27, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-9, trapina2/elafina, hBD-1, hBD-2, VEGF y TSLP.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas:

- 30 unir de manera liberable a una superficie de piel de un mamífero una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201) fijada a un soporte rígido (202) y, estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba;

dejar la pieza de inserción independiente (200) en la superficie de piel del mamífero (213) durante al menos 5 minutos;

- 35 sujetar la pieza de inserción independiente que contiene la muestra de prueba en un dispositivo de ensayo de flujo lateral adaptado para recibir la pieza de inserción independiente (300, 400);

desarrollar el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

- 40 En algunas realizaciones de la presente invención, la pieza de inserción independiente (200, 411) se une de manera liberable a la superficie de piel mediante un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción independiente a una superficie de piel de un mamífero (213), y en la que el elemento de sujeción comprende una capa expansible (212) que se activa entre las etapas a) y b) generando de ese modo una fuerza que presiona la pieza de inserción independiente contra la superficie de piel.

En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es la zona de elución (101).

- 45 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es el área de detección (DA).

En algunas realizaciones de la presente invención, la superficie de piel del mamífero es la piel de un ser humano.

- 50 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de ensayo de flujo lateral se construye para formar un lecho capilar, cuando se acopla con la pieza de inserción independiente, en el que el dispositivo de flujo lateral (100, 500) acoplado con la pieza de inserción independiente comprende una zona de elución (101, 501) y un área de

detección (DA), así como uno o más de los siguientes: una almohadilla de conjugado (102, 502) y una almohadilla absorbente (104, 504).

En algunas realizaciones de la presente invención, la membrana tiene grosor igual a 4 mm o menos, y una anchura y una longitud, ambas mayores que el grosor, en la que el dispositivo de flujo lateral está configurado para tener un sentido de flujo lateral (L) sustancialmente en dirección a un plano creado por la anchura y la longitud de la membrana.

Breve descripción de los dibujos

Se describen determinadas realizaciones ilustrativas en más detalle a continuación con referencia a las figuras adjuntas en las que:

La figura 1 muestra vistas en perspectiva de diferentes realizaciones, de la presente invención, de una tira de ensayo de flujo lateral (100). En la figura 1a, se muestra una tira de flujo lateral (100) con una almohadilla de muestra (101), una almohadilla de conjugado (102), una zona de detección (105) y una zona indicadora (106), ambas zonas inmovilizadas sobre un soporte poroso (107), una almohadilla absorbente (104) y un material de respaldo (108). "L" muestra el sentido del flujo lateral y el área "DA" define el área de detección. La figura 1b ilustra la tira de flujo lateral, en la que la almohadilla de muestra (101) se separa del resto de la tira de flujo lateral. La figura 1c muestra una realización alternativa de la figura 1a, en la que la almohadilla de muestra (101); almohadilla de conjugado (102); zona de detección (105) y zona indicadora (106) sobre el soporte poroso (107); y almohadilla absorbente (104) están contiguos o superpuestos, y se colocan en un material de respaldo (108). La figura 1d ilustra la tira de flujo lateral de la figura 1c, en la que la almohadilla de muestra (101) se separa del resto de la tira de flujo lateral.

La figura 2 muestra en una realización de la presente invención diferentes vistas de una pieza de inserción independiente (200), un elemento de sujeción (210), y el elemento de sujeción que sostiene la pieza de inserción independiente en la piel de un mamífero. En la figura 2a, se muestra una pieza de inserción independiente (200) para un dispositivo de ensayo de flujo lateral con una membrana (201) fijada a un soporte rígido (202). La figura 2b muestra una realización de la misma pieza de inserción independiente (200), en la que se muestra la parte inferior de la membrana (201) que se pone en contacto con la superficie corporal del mamífero. La figura 2c muestra un elemento de sujeción (210) configurado para unirse de manera liberable (211) a la superficie corporal de un mamífero con una capa expansible (212). La figura 2d muestra una realización en la que una pieza de inserción independiente se une de manera liberable a la superficie corporal de un mamífero (213) mediante un elemento de sujeción (210), y en la que se muestra el lado superior de la capa expansible (212).

La figura 3 muestra una realización según la presente invención. En la figura 3a, se muestra un dispositivo de ensayo de flujo lateral (300) con armazón (310) con una pieza de inserción independiente (200), y una cubierta de almohadilla de muestra (312) en una posición abierta que muestra un puerto de muestra (313) que permite la adición de líquido para el desarrollo del dispositivo de flujo lateral, y una ventana de reacción (311) que permite la detección visual de reacciones en la zona de detección y la zona indicadora. La figura 3b muestra una vista en sección transversal de una realización de la presente invención, en la que el armazón de ensayo de flujo lateral (310) contiene una pieza de inserción independiente (200) en su lugar en la posición de una almohadilla de muestra (101) con una cubierta de almohadilla de muestra (312) en posición cerrada que muestra el puerto de muestra (313). La pieza de inserción independiente está en comunicación de fluido con un soporte poroso (309), que de nuevo está en comunicación de fluido con una almohadilla de conjugado (302), de nuevo en comunicación de fluido con una membrana porosa (307) que tiene una zona de detección y una zona indicadora inmovilizada (105, 106, no mostradas), y una almohadilla absorbente (304). Finalmente, una ventana de reacción (311) permite la inspección visual del área de detección ("DA").

La figura 4 muestra una realización según la presente invención. En la figura 4a, se muestra un dispositivo de ensayo de flujo lateral (400) con armazón (410) con una pieza de inserción independiente (411) y un puerto de muestra (413) que permite la adición de líquido para el desarrollo del dispositivo de flujo lateral. La figura 4b muestra una vista en sección transversal de un dispositivo de ensayo de flujo lateral (400) según una realización de la presente invención, en el que un armazón de ensayo de flujo lateral (410) contiene una pieza de inserción independiente (411) que se inserta en la posición de un área de detección ("DA"). Se muestra una almohadilla de muestra (401), puerto de muestra (413) y almohadilla absorbente (404), y una vez que la pieza de inserción independiente (411) se inserta completamente, pondrá la almohadilla de muestra en conexión de fluido con la almohadilla absorbente (404) a través de la pieza de inserción independiente (411). La figura 4c muestra un dispositivo de ensayo de flujo lateral (400) en el que una pieza de inserción independiente se inserta completamente. Se muestran una zona de detección (405) y una zona indicadora (406). La figura 4d muestra una vista en sección transversal de un dispositivo de ensayo de flujo lateral (400) según una realización de la presente invención, en el que se inserta completamente una pieza de inserción independiente (411) y en el que la almohadilla de muestra (401), pieza de inserción independiente (411) con una zona de detección (405) y una zona indicadora (406) están en comunicación de fluido con una almohadilla absorbente (404).

La figura 5 muestra vistas en perspectiva de diferentes realizaciones, de la presente invención, de una tira de

5 ensayo de flujo lateral (500). En la figura 5a, se muestra una tira de flujo lateral (500) con una almohadilla de muestra (501), una almohadilla de conjugado (502), una zona de detección (505) y una zona indicadora (506), ambas zonas inmovilizadas sobre un soporte poroso (507), una almohadilla absorbente (504) y opcionalmente un material de respaldo (508). "L" muestra el sentido del flujo lateral y el área "DA" define el área de detección. La figura 5b ilustra la tira de flujo lateral, en la que la zona de detección (505) y la zona indicadora (506) inmovilizadas sobre un soporte poroso (507) se separan del resto de la tira de flujo lateral.

10 La figura 6 muestra la sensibilidad de un dispositivo de ensayo de flujo lateral según el ejemplo 1, en la que en la figura 6a se analizaron diferentes concentraciones de analitos añadidos directamente a las almohadillas de muestra. Controles (izquierda) y analitos (derecha) muestran que un nivel de detección visual de detección de IL-8 es de alrededor de 1 ng/ml y que el nivel de detección visual de hBD-1 es de alrededor de 0,25 ng/ml. La figura 6b muestra que usando una almohadilla de muestra colocada sobre la piel, IL-8 y hBD-1 pueden detectarse de la superficie de piel.

15 La figura 7 muestra la sensibilidad de un dispositivo de ensayo de flujo lateral según el ejemplo 2, en la que en la figura 7a se analizaron diferentes concentraciones de analitos añadidos directamente al área de detección (DA). Controles (izquierda) y analitos (derecha) muestran que un nivel de detección visual de detección de IL-8 es de alrededor de 1 ng/ml y que el nivel de detección visual de hBD-1 es de alrededor de 0,25 ng/ml. La figura 7b muestra que usando un área de detección (DA) como el "área de muestreo", los analitos hBD-1 y IL-8 pueden detectarse de la superficie de piel.

20 El experto habitual en la técnica reconocerá, dado el beneficio de esta divulgación, que determinados rasgos distintivos mostrados en las figuras 1-5 no están necesariamente dibujados a escala. Las dimensiones y características de algunos rasgos distintivos en las figuras pueden haberse agrandado, distorsionado o alterado con respecto a otros rasgos distintivos en las figuras para facilitar una mejor comprensión de los ejemplos ilustrativos dados a conocer en el presente documento.

Descripción detallada de la invención

25 En la descripción de las realizaciones de la invención se recurrirá a una terminología específica en aras de claridad. Sin embargo, la invención no pretende limitarse a los términos específicos así seleccionados, y se entiende que cada término específico incluye todos los equivalentes técnicos que funcionan de una manera similar para lograr un propósito similar.

30 Pueden emplearse ensayos de flujo lateral en dispositivos de diagnóstico inmediato para detectar la presencia o ausencia de uno o más analitos de prueba dentro de una muestra de prueba. La lectura puede realizarse de manera visual, es decir presencia o ausencia de una una o más líneas de prueba coloreadas denominadas también tiras de prueba en una zona de detección (105), y la confirmación/validación de la prueba puede realizarse mediante la presencia y/o ausencia de una o más líneas/tiras indicadoras coloreadas en una zona indicadora (106). La prueba puede ser cualitativa (presencia o ausencia) así como cuantitativa, y la detección/cuantificación puede asistirse por un equipo de lectura, o puede ser una detección puramente visual por el ojo del usuario del ensayo de flujo lateral.

35 Si se desea, puede usarse un equipo de lectura, tal como un lector óptico, en algunas realizaciones para medir la intensidad de las sondas. La configuración y estructura reales del lector óptico pueden variar generalmente en función de las sondas que van a medirse. Por ejemplo, las técnicas de detección óptica que pueden utilizarse incluyen, pero no se limitan a, luminiscencia (por ejemplo, fluorescencia, fosforescencia, etc.), absorbancia (por ejemplo, fluorescente o no fluorescente), difracción, etc. La determinación cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa de la presencia o concentración de un analito puede lograrse según la presente invención. Por ejemplo, la cantidad del analito puede determinarse de manera cuantitativa o semicuantitativa usando las intensidades de las señales producidas por las sondas de detección unidas en la zona de detección (105) y la zona indicadora (106).

40 Los ensayos de flujo lateral pueden estar basados en un lecho capilar (tal como papel poroso o polímero sinterizado), o en la mayoría de casos pueden estar basados en una serie de lechos capilares en comunicación de fluido entre sí. Los lechos capilares tienen la capacidad de transportar líquido mediante la acción de fuerzas capilares. En algunas realizaciones de la presente invención, el ensayo de flujo lateral se construye para formar un lecho capilar.

45 El primer elemento, la almohadilla de muestra (101) actúa como una esponja y contiene la muestra de prueba. Una vez que se empapa, la muestra de prueba, que contiene uno o más analitos de prueba, migrará a una almohadilla de conjugado (102), que contiene una o más molécula(s) de afinidad indicadoras, tal como moléculas de afinidad marcadas con sonda de detección diseñada para unirse al uno o más analitos de prueba dentro de la muestra de prueba. La muestra de prueba y una o más moléculas de afinidad se mezclan y la una o más moléculas de afinidad que tienen afinidad por uno o más analitos de prueba dentro de la muestra de prueba se unirán entre sí mientras migran además a un área de detección (DA) que puede contener una zona de detección (105), y puede contener una zona indicadora (106), ambas con una o más tiras, en la que otro conjunto de una o más moléculas de afinidad se ha inmovilizado. Para cuando la muestra de prueba mezclada con la(s) molécula(s) de afinidad de la almohadilla de conjugado alcance el área de detección (DA), el uno o más analitos en la muestra de prueba se habrán unido a

la(s) molécula(s) de afinidad de la almohadilla de conjugado. Entonces, este complejo se unirá a su vez por la(s) molécula(s) de afinidad en la(s) tira(s) en la zona de detección (105). Después de un tiempo, cuando más y más líquido haya pasado la zona de detección, las sondas de detección se acumulan y la tira cambia de color. Las sondas de detección pueden ser, por ejemplo, partículas de oro o látex conjugadas a la(s) molécula(s) de afinidad para preparar moléculas de afinidad marcadas con sondas de detección. El área de detección (DA) también puede comprender una zona indicadora (106) que puede funcionar como control para verificar que el ensayo de flujo lateral se haya llevado a cabo de manera apropiada. Tal zona indicadora (106) también puede comprender una o más tiras con moléculas de afinidad inmovilizadas que sólo se unen a la(s) molécula(s) de afinidad marcada(s) con sondas de detección de la almohadilla de conjugado, mientras que la(s) molécula(s) de afinidad en la zona de detección (105) se une(n) al complejo entre el/los analito(s) y la(s) molécula(s) de afinidad indicadoras, tal como la(s) molécula(s) de afinidad marcada(s) con sondas de detección de la almohadilla de conjugado. Después de pasar el área de detección (DA), el líquido entra en la almohadilla absorbente (104), que generalmente recibe líquido que ha migrado a través de todo el lecho capilar (101, 102, DA, 104 (también representado por 107)). La almohadilla absorbente puede ayudar en la promoción de la acción capilar y el flujo de líquido de la almohadilla de muestra (101), almohadilla de conjugado (102) a través del área de detección (DA).

La tira de ensayo de flujo lateral puede comprender opcionalmente una capa de respaldo (108) y/o un armazón (310, 410), que es impermeable a líquidos de manera que el líquido que fluye a través de la tira de ensayo de flujo lateral no se filtra a través de la capa de respaldo (108). Los ejemplos de materiales adecuados para el soporte incluyen, pero no se limitan a, vidrio; materiales poliméricos, tales como poliestireno, polipropileno, poliéster, polibutadieno, poli(cloruro de vinilo), poliamida, policarbonato, epóxidos, metacrilatos y polimelamina.

La zona de detección (105) puede ubicarse aguas arriba o aguas abajo de la zona indicadora (106). Las líneas o tiras en la zona detectora o zona indicadora pueden disponerse en una dirección que es sustancialmente perpendicular al flujo de la muestra de prueba. En algunas realizaciones, las líneas pueden ser en una dirección que es sustancialmente paralela al flujo de la muestra de prueba. Las líneas o tiras en la zona de detección (105) o zona indicadora (106) no necesitan ser líneas o tiras, y también pueden ser otras formas, tales como por ejemplo puntos o patrones.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un kit de diagnóstico para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba dentro de una muestra de prueba tomada de una superficie de piel de un mamífero, comprendiendo el kit de diagnóstico: una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201), que puede fijarse a un soporte rígido (202), estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba; un dispositivo de ensayo de flujo lateral configurado (300, 400) para aceptar la pieza de inserción independiente (200, 411); y un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción independiente a una superficie de piel de un mamífero (213).

En general, la presente invención se refiere a un kit de diagnóstico que proporciona un sistema integrado para detectar la presencia o ausencia de uno o más analitos de prueba dentro de una muestra de prueba, a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones posibles del uno o más analitos de prueba. En algunas realizaciones, la cantidad del uno o más analitos de prueba también se detecta en un ensayo cuantitativo. El kit de diagnóstico emplea un dispositivo de ensayo de flujo lateral (300, 400) y una pieza de inserción independiente (200, 411) y uno o más reactivos de ensayo para detectar el uno o más analitos de prueba dentro de la muestra de prueba. Los reactivos de ensayo incluyen molécula(s) de afinidad marcada(s) con sondas de detección que pueden producir una señal de detección que representa la presencia o cantidad del uno o más analito(s) de prueba en la muestra de prueba. Un modo de cuantificar uno o más del/de los analito(s) de prueba es preparando curvas de calibración adecuadas usando concentraciones conocidas del uno o más analito(s) de prueba.

En algunas realizaciones de la presente invención, el uno o más analito(s) de prueba se seleccionan de la lista que consiste en: quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas y otras moléculas presentes en una superficie de piel de un mamífero, tales como la piel de un mamífero. Los analitos de prueba específicos pueden incluir uno o más seleccionados de la lista que consiste en: IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-8, CCL-2, CCL-5, CCL-27, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-9, trapina2/elafina, hBD-1, hBD-2, VEGF y TSLP.

La presente invención es adecuada para la detección de cualquier molécula que esté presente en la piel de un mamífero, que puede ser quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento, hormonas o enzimas. Asimismo, la presente invención también es adecuada para la detección de fármacos así como metabolitos de los mismos, en la medida en que se excretan en la piel de un mamífero. Esta detección de fármacos cubre tanto los fármacos tomados con fines medicinales y/o cosméticos así como los fármacos tomados con fines recreativos.

La muestra de prueba se toma de una superficie de piel de un mamífero usando una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral. La pieza de inserción independiente comprende una membrana (201), que puede fijarse a un soporte rígido (202).

El soporte rígido (202) puede usarse para estabilizar la membrana (201) de manera que no se doble ni se pliegue, y puede usarse para facilitar la manipulación de la pieza de inserción independiente permitiendo que se ajuste o

encaje en su lugar en el dispositivo de ensayo de flujo lateral (300), tal como, por ejemplo, atornillar en su lugar. En algunas realizaciones, el soporte rígido cubre el perímetro de la membrana, tal como se describe, por ejemplo, en la figura 2.

5 La membrana está configurada para obtener la muestra de prueba, lo que significa que la membrana debe poder absorber la muestra de prueba, y cualquier material que puede hacerlo puede ser adecuado. Los materiales usados para la membrana pueden incluir, pero no se limitan a, materiales naturales, sintéticos o que se producen de manera natural que se modifican sintéticamente, tal como polisacáridos (por ejemplo, materiales de celulosa tales como papel y derivados de celulosa tales como acetato de celulosa y nitrocelulosa), poliéter sulfona, polietileno, nailon
10 poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF), poliéster, polipropileno, algodón o tela. En algunas realizaciones, la membrana es no adhesiva, lo que minimizará la cantidad de células de la piel transferidas a la membrana. Los materiales usados para el soporte rígido pueden incluir, pero no se limitan a, materiales plásticos, materiales compuestos, metales o aleaciones de metales.

15 La membrana puede ser similar a una lámina. La membrana puede tener un grosor igual a o menor de 4 mm (tal como menos de 4, 3, 2, 1 mm), y una anchura y una longitud ambas mayores que el grosor. En algunas realizaciones, la anchura y la longitud de la membrana son ambas mayores (por ejemplo 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50 veces mayores o hasta 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 50 veces mayores) que el grosor. En algunas realizaciones, la membrana es un cuadrado, tal como un rectángulo, y en algunas realizaciones la membrana es circular. Si la membrana tiene una forma irregular, es decir, diferente de un cuadrado o rectángulo, entonces la anchura, la longitud y el grosor se refieren a los valores máximos para una forma irregular de este tipo. Por ejemplo, la anchura de un círculo será el
20 diámetro. Ejemplos de anchuras y longitudes pueden ser 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40 mm, tal como, por ejemplo, el intervalo de anchuras y longitudes desde 5-30 mm.

25 La muestra de prueba se toma de una superficie de piel de un mamífero, y comprende el uno o más analito(s) de prueba. La muestra de prueba se obtiene mediante difusión de la muestra desde la superficie de piel de un mamífero hasta la membrana. Puede ayudarse al muestreo humedeciendo la membrana con un volumen fijo de líquido, o bien mientras se une al sitio de muestreo sobre la superficie de piel o bien antes de unirse al sitio de muestreo sobre la superficie de piel.

30 En algunas realizaciones, la membrana es permeable al agua desde el lado hacia afuera de la superficie de piel a la que está configurada la membrana para unirse. Esto puede permitir la humectación de la membrana con un volumen fijo de líquido mientras se une, así como permitir la adición de un líquido para el desarrollo del dispositivo de flujo lateral cuando, por ejemplo, la membrana funciona como parte de la zona de elución, tal como se muestra en la figura 3, es decir, permite la humectación de la membrana desde el lado hacia afuera de la superficie de piel a la que está configurada la membrana para unirse.

35 En realizaciones preferidas, la piel es la piel de un cuerpo humano, y en realizaciones preferidas, el mamífero es un cuerpo humano.

Después de haberse transferido la muestra de prueba a la membrana, entonces la pieza de inserción independiente se inserta en un dispositivo de ensayo de flujo lateral configurado (300, 400) para aceptar la pieza de inserción independiente (200, 411).

40 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de flujo lateral se construye para formar un lecho capilar, cuando se acopla con la pieza de inserción independiente, en el que el dispositivo de flujo lateral (100, 500) acoplado con la pieza de inserción independiente comprende una zona de elución (101, 501) y un área de detección (DA), así como uno o más de los siguientes: una almohadilla de conjugado (102, 502) y una almohadilla absorbente (104, 504).

45 En algunas realizaciones de la presente invención, el dispositivo de flujo lateral está configurado para tener un sentido de flujo lateral (L) sustancialmente en dirección a un plano creado por la anchura y la longitud de la membrana. Sustancialmente en dirección al plano abarca tanto la unión contigua así como la superposición, tal como la superposición de manera parcial de la membrana con los otros elementos del dispositivo de flujo lateral, véase, por ejemplo, la figura 1, en la que los elementos (101, 102, 107, 104) del dispositivo de flujo lateral se representan como contiguos. Véase, por ejemplo, la figura 3b, en la que la pieza de inserción independiente (200)
50 está parcialmente superpuesta con un soporte poroso (309), una almohadilla de conjugado (302), membrana porosa (307) y una almohadilla absorbente (304). Si el soporte poroso (309) hubiera estado completamente superpuesto con la pieza de inserción independiente (200), el sentido de flujo lateral (L) de la almohadilla de muestra con respecto al área de detección (DA) todavía habría estado sustancialmente en dirección al plano creado por la anchura y la longitud de la membrana, en lugar de perpendicular a ese plano.

55 Existen muchas posibilidades para acoplar una pieza de inserción independiente con un dispositivo de flujo lateral, y en realizaciones preferidas la parte de membrana de la pieza de inserción se prepara de tal manera que se ajustará en el mismo lugar del dispositivo de ensayo de flujo lateral aumentando de ese modo la reproducibilidad. Un modo de colocar la parte de membrana de la pieza de inserción en la misma posición de una manera reproducible es fijar

la membrana a un soporte rígido.

5 Cuando se desea obtener la muestra de prueba de una manera reproducible y uniforme, de un punto particular en la superficie de piel, la pieza de inserción se une de manera liberable (211) a la superficie de piel usando preferiblemente un elemento de sujeción (210). Uniendo la pieza de inserción a la superficie de piel de una manera liberable, se vuelve posible muestrear un área particular, definida por el tamaño de la membrana de la pieza de inserción, durante una duración de tiempo particular. Esto es ventajoso cuando se quiere comparar los niveles de analitos de prueba particulares en una muestra de prueba tomada de, por ejemplo, un área lesional de la piel con analitos de prueba particulares en una muestra de prueba tomada de, por ejemplo, un área sana o no lesional de la piel de una manera reproducible, en la que el mismo tamaño del área de la piel se muestrea durante la misma duración. Unir de manera liberable la pieza de inserción proporciona ventajas sobre someter a hisopado un área con un elemento de hisopo, ya que el hisopado se realiza sobre un área definida de manera menos precisa, y de una manera no reproducible, cuando se trata de una variación de muestra a muestra, lo que significa que se vuelve difícil preparar una muestra de prueba a partir de, por ejemplo, una piel no lesional usando hisopado con el mismo tamaño de muestra que una muestra de prueba obtenida sometiendo a hisopado un área lesional de la piel. Por consiguiente, la unión de manera liberable excluye el hisopado.

Un ejemplo de piel lesional puede ser piel inflamada, y un ejemplo de piel no lesional puede ser piel no inflamada, por ejemplo piel psoriásica lesional y piel psoriásica no lesional.

En algunas realizaciones, el elemento de sujeción es una tira de material adhesivo.

20 Cuando se desea mejorar la reproducibilidad y uniformidad cuando se obtiene la muestra de prueba, el elemento de sujeción (210) puede comprender una capa expansible (212) configurada para aplicar presión a la pieza de inserción independiente (200, 411) presionando de ese modo la pieza de inserción independiente (200, 411) contra la superficie de piel del mamífero (213). Un modo de configurar la capa expansible para aplicar presión a la pieza de inserción independiente es colocándola entre la pieza de inserción independiente y el elemento de sujeción. La capa expansible (212) es una capa que puede expandirse para aplicar presión a la membrana (201) de la pieza de inserción independiente (200, 411). Ejemplos de una capa expansible son un material inflable, tal como una bolsa inflable, un dispositivo que funciona por muelle o un material hinchable. En algunas realizaciones, el material es celulosa comprimida, que se hinchará tras el contacto con un líquido, tal como una disolución acuosa, aplicando de ese modo presión a la membrana (201), que se presionará fuertemente contra la piel del mamífero. Puede observarse a partir de la tabla en el ejemplo 3 que la desviación estándar de la obtención de una muestra de la piel usando una pieza de inserción independiente con una capa expansible se mejora en comparación con no usar una capa expansible. En algunas realizaciones de la presente invención, la capa expansible no está en comunicación de fluido con la pieza de inserción independiente (200, 411), ya que podría haber algún riesgo de transferir parte de la muestra de prueba a la capa expansible, si la capa expansible está elaborada de, por ejemplo, celulosa comprimida en comunicación de fluido con la membrana. En alguna realización, hay una capa de respaldo inerte entre la capa expansible y la membrana, que no permitirá que la muestra de prueba se difunda en la capa expansible.

35 Se divulga además una pieza de inserción para un dispositivo de ensayo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201) fijada a un marco de soporte rígido (202), estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba de una superficie de piel de un mamífero (213), y en algunas realizaciones de la presente invención, comprendiendo la pieza de inserción adicionalmente un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción a una superficie de piel de un mamífero (213).

40 Las realizaciones descritas hasta ahora se han descrito con referencia a una realización de la presente invención del dispositivo de ensayo de flujo lateral que comprende una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es la zona de elución (101). Es decir, que la pieza de inserción independiente está adaptada para ajustarse en la zona de elución o el área de muestra.

45 Sin embargo, la presente invención también cubre realizaciones del dispositivo de ensayo de flujo lateral que comprende una zona de elución (501) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es el área de detección (DA). Es decir, que la pieza de inserción independiente está adaptada para ajustarse en el área de detección, que puede comprender una zona de detección (505) que tiene inmovilizadas una o más moléculas de afinidad. Este es un modo modificado de proporcionar un ensayo de flujo lateral, en el que el uno o más analitos de prueba ya estarán unidos a las moléculas de afinidad inmovilizadas una vez que la pieza de inserción independiente se coloque en el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

50 En esta realización, en la que la pieza de inserción independiente es el área de detección (DA), el dispositivo de ensayo de flujo lateral funcionará ligeramente diferente, en que el uno o más analitos de prueba ya estarán unidos a las moléculas de afinidad inmovilizadas en la zona de detección (405) cuando la muestra de prueba se obtiene de una superficie de piel de un mamífero. Entonces, el desarrollo del ensayo de flujo lateral añadiendo líquido a la almohadilla de muestra (401) transportará la(s) molécula(s) de afinidad marcada(s) con sondas de detección desde la almohadilla de conjugado sobre el área de detección (DA) y se unirán al uno o más analitos de prueba ya unidos a las moléculas de afinidad inmovilizadas en la zona de detección, detectando de ese modo la presencia o cantidad

del uno o más analitos de prueba en la muestra de prueba.

5 En algunas realizaciones de la presente invención, el área de detección (DA) comprende una zona de detección (105, 505) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva uno o más analito(s) de prueba y opcionalmente una zona indicadora (106, 506) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva una o más molécula(s) de afinidad indicadora(s), tal(es) como molécula(s) de afinidad marcada(s) con sondas de detección de la almohadilla de conjugado.

10 Las moléculas de afinidad son moléculas que se unen predominantemente a uno o más analito(s), reteniendo selectivamente de ese modo tal(es) analito(s) de interés. En general, las moléculas de afinidad son moléculas que tienen una mayor afinidad para un analito o una clase de analitos particular que otros analitos. Los ejemplos más notables de tales moléculas son anticuerpos (policlonales y/o monoclonales, y fragmentos de los mismos), aptómeros y receptores, así como otros armazones proteínicos diseñados por ingeniería genética tales como los conocidos AdNectin, Affibody, Anticalin, Knottin, DARPin y Kunitz, así como armazones orgánicos y/o poliméricos.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas:

15 unir de manera liberable a una superficie de piel de un mamífero una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201) fijada a un soporte rígido (202) y, estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba;

dejar la membrana de la pieza de inserción independiente (200) sobre la superficie de piel del mamífero (213) durante al menos 5 minutos;

20 sujetar la pieza de inserción independiente que contiene la muestra de prueba en un dispositivo de ensayo de flujo lateral adaptado para recibir la pieza de inserción independiente (300, 400);

desarrollar el dispositivo de ensayo de flujo lateral.

25 En algunas realizaciones de la presente invención, la pieza de inserción independiente (200, 411) se une de manera liberable a la superficie de piel mediante un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción independiente a una superficie de piel de un mamífero (213), y en la que el elemento de sujeción comprende una capa expansible (212) que se activa entre las etapas a) y b), generando de ese modo una fuerza que presiona la pieza de inserción independiente contra la superficie de piel.

30 La capa de membrana de la pieza de inserción independiente se unirá a la piel durante la duración del periodo de muestreo, que finaliza cuando se ha obtenido una muestra de prueba de cantidad suficiente. En algunos casos, será suficiente tener la capa de membrana unida a la piel durante al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 40 minutos, al menos 50 minutos, al menos 60 minutos, tal como hasta 5 minutos, hasta 10 minutos, hasta 15 minutos, hasta 20 minutos, hasta 30 minutos, hasta 40 minutos, hasta 50 minutos, hasta 60 minutos, tal como hasta 24 horas. Es deseable mantener el tiempo de muestreo tan corto como sea posible, ya que permitirá una detección más rápida. Se prevé que el presente método de muestreo debe ser lo

35 suficientemente sensible para permitir que un tiempo de muestreo, en el que la membrana se une a la piel, o en comunicación de fluido con la piel, sea de entre 1 y 30 minutos, en particular entre 15 y 30 minutos.

40 Cuando se describen las realizaciones de la presente invención, las combinaciones y permutaciones de todas las posibles realizaciones no se han descrito de manera explícita. No obstante, el simple hecho de que determinadas mediciones se mencionen en reivindicaciones dependientes diferentes de manera mutua o describan en diferentes realizaciones no indica que una combinación de estas mediciones no pueda usarse con ventaja.

Los términos “que comprende”, “comprenden” y “comprende” en el presente documento están destinados por los inventores para que sean opcionalmente sustituibles con los términos “que consiste en”, “consisten en” y “consiste en”, respectivamente, en cada caso.

Ejemplos

45 Ejemplo 1 – Detección de IL-8 y hBD-1 con el dispositivo según la figura 3

Este es un ejemplo que muestra que una pieza de inserción independiente de una almohadilla de muestra (200) independiente del dispositivo de ensayo de flujo lateral (300) puede usarse en un ensayo de flujo lateral (figura 3) para detectar IL-8 y hBD-1 de la piel humana.

Materiales

Anticuerpos de captura:	<i>100 ug/ml en 1xPBS: anti-BD-1 humano de conejo, y anti-CXCL8/IL-8 humano de cabra</i>
Anticuerpos detectores:	<i>Conjugados con oro coloidal de 40 nm a 10 ug/ml:</i>

	anti-BD-1 humano de conejo, y anti-CXCL8/IL-8 humano de ratón
Antígenos:	<i>Diversos niveles 0-50 ng/ml en tampón de transferencia</i> BD-1 humano recombinante, y CXCL8/IL-8 humano recombinante
Tampón de transferencia:	Tris 25 mM, tripolifosfato de pentasodio al 1%, azida de sodio al 0,1%, TritonX-405 al 0,1%, EDTA 2 mM, caseína de sodio al 0,5%, pH 8,0
Membrana de análisis (307):	Sartorius CN140, con anticuerpos de captura, bloqueada con tampón de bloqueo: fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 0,1%, BSA al 0,1%, PVP-40 al 0,2%, pH 7,2
Almohadilla absorbente (304, 104):	Millipore CO95
Almohadilla de conjugado (302, 102):	Millipore G041, tampón de bloqueo: borato 10 mM, BSA al 3%, PVP-40 al 1%, Tritonx-100 al 0,25%, pH 8,0
Almohadilla de muestra (almohadilla de recogida) (200):	Millipore G041

Calibración de sensibilidad de la prueba

5 Se diluyeron los analitos IL-8 y hBD1 en tampón de transferencia hasta las concentraciones 0,25, 1 y 25 ng/ml y se usaron para determinar la sensibilidad para esta configuración particular (figura 6a). Para la prueba, se añadieron los analitos a la almohadilla de muestra (50 µl) tras el ensamblaje del casete de análisis y añadiendo 100 µl de tampón de transferencia.

Las tiras de flujo lateral de la figura 6a muestra que el nivel de detección visual de IL-8 es de alrededor de 1 ng/ml y que el nivel de detección visual de hBD-1 es de alrededor de 0,25 ng/ml.

10 Para analizar IL-8 y hBD-1 de la piel, se humedeció una almohadilla de muestra (200) con 25 µl de agua Milli-Q y se puso en contacto con un área lesional de piel con dermatitis de contacto durante 15 minutos, se insertó en el casete de ensayo de flujo lateral (310) y se desarrolló añadiendo 100 µl de tampón de transferencia.

La tira de flujo lateral se muestra en la figura 6b en la que puede observarse que IL-8 y hBD-1 (derecha) pueden detectarse a partir de una muestra obtenida de la superficie de piel. Se muestran los controles (izquierda).

Ejemplo 2 – Detección de IL-8 y hBD-1 con el dispositivo según la figura 4

15 Este es un ejemplo que muestra que una pieza de inserción independiente de un área de detección (411, 507) independiente del dispositivo de ensayo de flujo lateral (400) puede usarse en el ensayo de flujo lateral para detectar IL-8 y hBD-1 de la piel humana.

Materiales

Anticuerpos de captura:	<i>100 ug/ml en 1xPBS:</i> anti-BD-1 humano de conejo, y anti-CXCL8/IL-8 humano de cabra
Anticuerpos detectores:	<i>Conjugados con oro coloidal de 40 nm a 10 ug/ml:</i> anti-BD-1 humano de conejo, y anti-CXCL8/IL-8 humano de ratón
Antígenos:	<i>Diversos niveles 0-50 ng/ml en tampón de transferencia</i> BD-1 humano recombinante, y CXCL8/IL-8 humano recombinante
Tampón de transferencia:	Tris 25 mM, tripolifosfato de pentasodio al 1%, azida de sodio al 0,1%, TritonX-405 al 0,1%, EDTA 2 mM, caseína de sodio al 0,5%, pH 8,0
Membrana de análisis (411, 507):	Sartorius CN140, con anticuerpos de captura, bloqueada con tampón de bloqueo: fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 0,1%, BSA al 0,1%, PVP-40 al 0,2%, pH 7,2
Almohadilla absorbente (404, 504):	Millipore CO95
Almohadilla de conjugado (502):	Millipore G041, tampón de bloqueo: borato 10 mM, BSA al 3%, PVP-40 al 1%, Tritonx-100 al 0,25%, pH 8,0
Almohadilla de muestra (zona de elución) (401, 501):	Millipore G041

Calibración de sensibilidad de la prueba

20 Se diluyeron los analitos IL-8 y hBD1 en tampón de transferencia hasta las concentraciones 0,25, 1 y 25 ng/ml y se usaron para determinar la sensibilidad para esta configuración particular (figura 7a). Para la prueba, se añadieron los

analitos a la membrana de área de detección (50 µl) tras el ensamblaje del casete de análisis y añadiendo 100 µl de tampón de transferencia.

Las tiras de flujo lateral de la figura 7a muestra que el nivel de detección visual de IL-8 es de alrededor de 1 ng/ml y que el nivel de detección visual de hBD-1 es de alrededor de 0,25 ng/ml.

- 5 Para analizar IL-8 y hBD-1 de la piel, se humedeció un área de detección (411, 507) con 25 µl de agua Milli-Q y se puso en contacto con un área lesional de piel con dermatitis de contacto durante 15 minutos, se insertó en el casete de ensayo de flujo lateral (410) y se desarrolló añadiendo 100 µl de tampón de transferencia.

La tira de flujo lateral se muestra en la figura 7b en la que puede observarse que IL-8 y hBD-1 (izquierda) pueden detectarse a partir de una muestra obtenida de la superficie de piel. Se muestran los controles (derecha).

10 Ejemplo 3 – Ejemplo que muestra el efecto de la capa de expansión (212).

Se somete a prueba el efecto de una capa expansible en la etapa de muestreo. Puede observarse que se obtienen resultados estables y fiables del análisis de la piel usando una configuración de almohadilla de muestra del dispositivo de flujo lateral (figura 1, 2 y 3) para detectar IL-8 y hBD-1 de la piel humana.

Materiales

Anticuerpos de captura:	100 ug/ml en 1xPBS: anti-BD-1 humano de conejo, y anti-CXCL8/IL-8 humano de cabra
Anticuerpos detectores:	Conjugados con oro coloidal de 40 nm a 10 ug/ml: anti-BD-1 humano de conejo, y anti-CXCL8/IL-8 humano de ratón
Antígenos:	Diversos niveles 0-50 ng/ml en tampón de transferencia BD-1 humano recombinante, y CXCL8/IL-8 humano recombinante
Tampón de transferencia:	Tris 25 mM, tripolifosfato de pentasodio al 1%, azida de sodio al 0,1%, TritonX-405 al 0,1%, EDTA 2 mM, caseína de sodio al 0,5%, pH 8,0
Membrana de análisis (307):	Sartorius CN140, con anticuerpos de captura, bloqueada con tampón de bloqueo: fosfato de sodio 10 mM, sacarosa al 0,1%, BSA al 0,1%, PVP-40 al 0,2%, pH 7,2
Almohadilla absorbente (304, 104):	Millipore CO95
Almohadilla de conjugado (302, 102):	Millipore G041, tampón de bloqueo: borato 10 mM, BSA al 3%, PVP-40 al 1%, Tritonx-100 al 0,25%, pH 8,0
Almohadilla de muestra (almohadilla de recogida) (201):	Millipore G041
Lector de tira de flujo lateral:	Lector ESE, ID: ESLF34-MB-4501, SN: P0082 (Qiagen)
Capa/membrana expansible (212)	Esponja de celulosa comprimida de 1/4", Industrial Commercial Supply

- 15 La comparación de los resultados de análisis obtenidos usando la almohadilla de muestra con y sin capa expansible muestra que la capa expansible mejora la reproducibilidad y calidad de los resultados de análisis, tal como se aprecia a partir de la tabla 1 a continuación.

La tabla muestra el efecto de la capa expansible sobre el nivel de detección y la variación de los resultados de análisis de la piel. Las almohadillas de muestra con y sin material expansible (en las almohadillas de muestra sin material expansible, se intercambié el material expansible con un material no expansible) que tenían dos anticuerpos de captura diferentes, IL-8, hBD-1, se humedecieron cada una con agua mQ (150 µl) después de fijarse de forma liberable para 4 individuos, se analizó cada individuo con 3 parches. Se expusieron las almohadillas de muestra durante 15 minutos en el área de la piel de dermatitis de contacto tras un procesamiento idéntico. Se cuantificó el nivel de analitos usando curvas de calibración y un lector de tiras de flujo lateral. Se calcularon la concentración promedio, la desviación estándar y el % de desviación estándar.

- 25

Almohadilla de muestra con material expansible	Promedio de concentración de IL-8 (ng/ml) de 3 almohadillas de muestra	Desviación estándar en %
Persona n.º 1	3,5 ± 0,2	5,7%
Persona n.º 2	8,6 ± 0,5	5,8%
Persona n.º 3	13,0 ± 0,8	6,1%
Persona n.º 4	7,7 ± 0,5	6,4%
	Promedio de concentración de hBD-1 (ng/ml) de 3 almohadillas de muestra	

ES 2 774 309 T3

Persona n.º 1	12,5 ± 0,3	2,4%
Persona n.º 2	15,0 ± 0,5	3,3%
Persona n.º 3	9,8 ± 0,4	4,1%
Persona n.º 4	17,5 ± 0,6	3,4%

Almohadilla de muestra sin material expansible	Promedio de concentración de IL-8 (ng/ml) de 3 almohadillas de muestra	Desviación estándar en %
Persona n.º 1	2,4 ± 0,9	37,5%
Persona n.º 2	3,6 ± 1,4	38,9%
Persona n.º 3	9,6 ± 5,1	53,1%
Persona n.º 4	3,1 ± 1,8	58,1%
	Promedio de concentración de hBD-1 (ng/ml) de 3 almohadillas de muestra	
Persona n.º 1	6,9 ± 0,9	13,0%
Persona n.º 2	3,7 ± 1,9	51,4%
Persona n.º 3	4,1 ± 1,6	39,0%
Persona n.º 4	11,3 ± 5,8	51,3%

5 Puede observarse a partir de las lecturas que los dispositivos con una capa expansible en la almohadilla de muestra dieron como resultado un valor significativamente mayor de analitos, y dieron como resultado una desviación estándar y un % de desviación estándar significativamente menores en comparación con las almohadillas de muestra sin material expansible.

Esta mayor sensibilidad y menor variación del análisis de los dispositivos con la capa expansible se relaciona con un contacto firme y homogéneo del material de la almohadilla de muestra con la piel debido a la presión constante creada por la capa expansible.

REIVINDICACIONES

1. Kit de diagnóstico para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba dentro de una muestra de prueba tomada de una superficie de piel de un mamífero, caracterizado porque el kit de diagnóstico comprende:
 - 5 a) una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201), teniendo la membrana un grosor, una anchura y una longitud, opcionalmente fijada a un soporte rígido (202) y, estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba,
 - 10 b) un dispositivo de ensayo de flujo lateral configurado (300, 400) para aceptar la pieza de inserción independiente (200, 411), y
 - c) un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción independiente a una superficie de piel de un mamífero (213).
2. Kit de diagnóstico según la reivindicación 1, en el que el dispositivo de flujo lateral se construye para formar un lecho capilar, cuando se acopla con la pieza de inserción independiente, en el que el dispositivo de flujo lateral (100, 500) acoplado con la pieza de inserción independiente comprende una zona de elución (101, 501) y un área de detección (DA), así como uno o más de los siguientes: una almohadilla de conjugado (102, 502) y una almohadilla absorbente (104, 504).
3. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que la membrana tiene un grosor igual a 4 mm o menos, y una anchura y una longitud, ambas mayores que el grosor, en el que el dispositivo de flujo lateral está configurado para tener un sentido de flujo lateral (L) sustancialmente en dirección a un plano creado por la anchura y la longitud de la membrana.
4. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el elemento de sujeción (210) comprende una capa expansible (212) configurada para aplicar presión a la pieza de inserción independiente (200, 411) presionando de ese modo la pieza de inserción independiente (200, 411) contra la superficie de piel del mamífero (213).
5. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo el dispositivo de ensayo de flujo lateral una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es la zona de elución (101), y no el área de detección (DA).
6. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, comprendiendo el dispositivo de ensayo de flujo lateral una zona de elución (501) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es el área de detección (DA) y no la zona de elución.
7. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la pieza de inserción independiente comprende una membrana (201) fijada a un marco de soporte rígido (202).
8. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el marco de soporte rígido (202) cubre el perímetro de la membrana (201).
9. Kit de diagnóstico según la reivindicación 4, en el que la capa expansible del elemento de sujeción contiene celulosa comprimida, y en el que la capa expansible no está en comunicación de fluido con la pieza de inserción independiente (200, 411).
10. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que el área de detección (DA) comprende una zona de detección (105, 505) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva uno o más analito(s) de prueba y opcionalmente una zona indicadora (106, 506) que contiene una o más molécula(s) de afinidad para retener de manera selectiva una o más molécula(s) de afinidad indicadoras.
11. Kit de diagnóstico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el uno o más analito(s) de prueba se seleccionan de la lista que consiste en: quimiocinas, interleucinas, factores de crecimiento, hormonas, enzimas y otras moléculas presentes en la piel de un mamífero, tales como las seleccionadas de la lista que consiste en: IL-1a, IL-1b, IL-1RA, IL-8, CCL-2, CCL-5, CCL-27, CXCL-1, CXCL-2, CXCL-9, trapina2/elafina, hBD-1, hBD-2, VEGF y TSLP.
12. Método para detectar la presencia o cantidad de uno o más analitos de prueba, comprendiendo el método las siguientes etapas:
 - 50 a) unir de manera liberable a una superficie de piel de un mamífero una pieza de inserción independiente para un dispositivo de flujo lateral (200, 411) que comprende una membrana (201) fijada a un soporte rígido (202) y, estando configurada la pieza de inserción independiente para obtener la muestra de prueba;

- b) dejar la pieza de inserción independiente (200) sobre la superficie de piel del mamífero (213) durante al menos 5 minutos;
- c) sujetar la pieza de inserción independiente que contiene la muestra de prueba en un dispositivo de ensayo de flujo lateral adaptado para recibir la pieza de inserción independiente (300, 400);
- 5 d) desarrollar el dispositivo de ensayo de flujo lateral.
13. Método según la reivindicación 12, en el que la pieza de inserción independiente (200, 411) se une de manera liberable a la superficie de piel mediante un elemento de sujeción (210) configurado para unir de manera liberable (211) la pieza de inserción independiente a una superficie de piel de un mamífero (213), y en el que el elemento de sujeción comprende una capa expansible (212) que se activa entre las etapas a) y b), generando de ese modo una fuerza que presiona la pieza de inserción independiente contra la superficie de piel.
- 10 14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es la zona de elución (101).
- 15 15. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-13, en el que el dispositivo de ensayo de flujo lateral comprende una zona de elución (101) y un área de detección (DA), y en el que la pieza de inserción independiente es el área de detección (DA).
16. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que la superficie de piel del mamífero es la piel de un ser humano.
- 20 17. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en el que el dispositivo de ensayo de flujo lateral se construye para formar un lecho capilar, cuando se acopla con la pieza de inserción independiente, en el que el dispositivo de flujo lateral (100, 500) acoplado con la pieza de inserción independiente comprende una zona de elución (101, 501) y un área de detección (DA), así como uno o más de los siguientes: una almohadilla de conjugado (102, 502) y una almohadilla absorbente (104, 504).
- 25 18. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en el que la membrana tiene un grosor igual a 4 mm o menos, y una anchura y una longitud, ambas mayores que el grosor, en el que el dispositivo de flujo lateral está configurado para tener un sentido de flujo lateral (L) sustancialmente en dirección a un plano creado por la anchura y la longitud de la membrana.

Figura 1

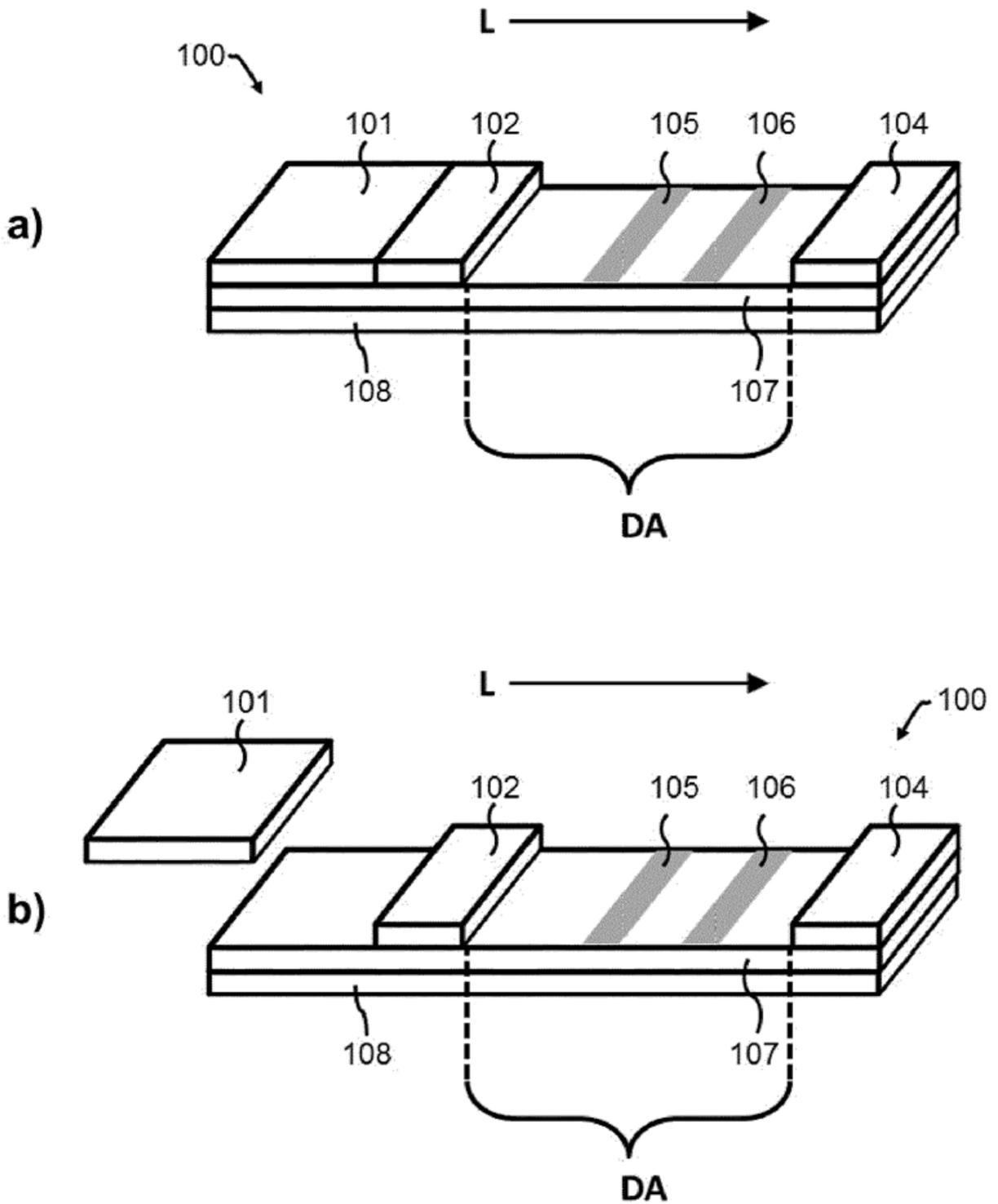


Figura 1 - continuación

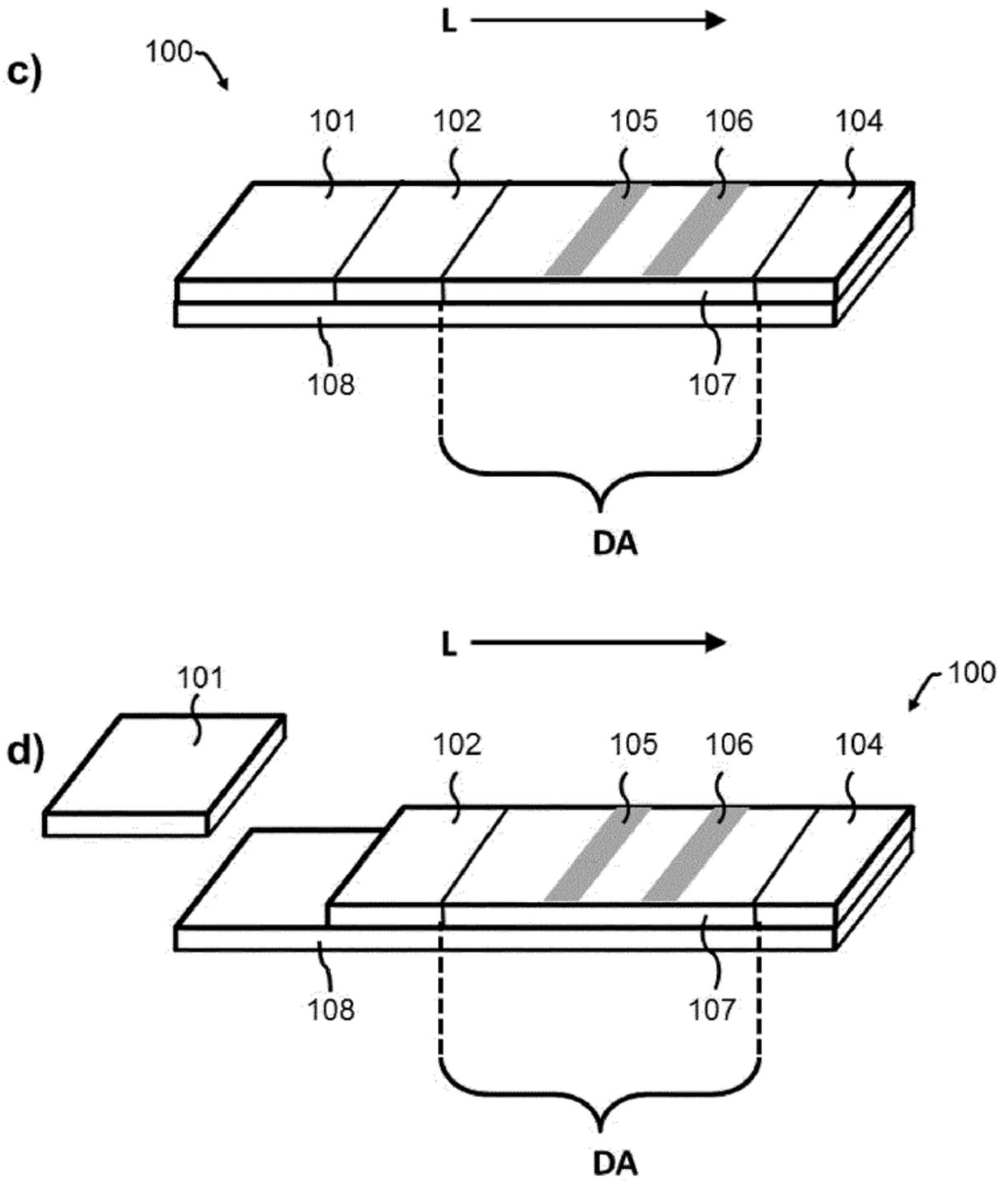


Figura 2

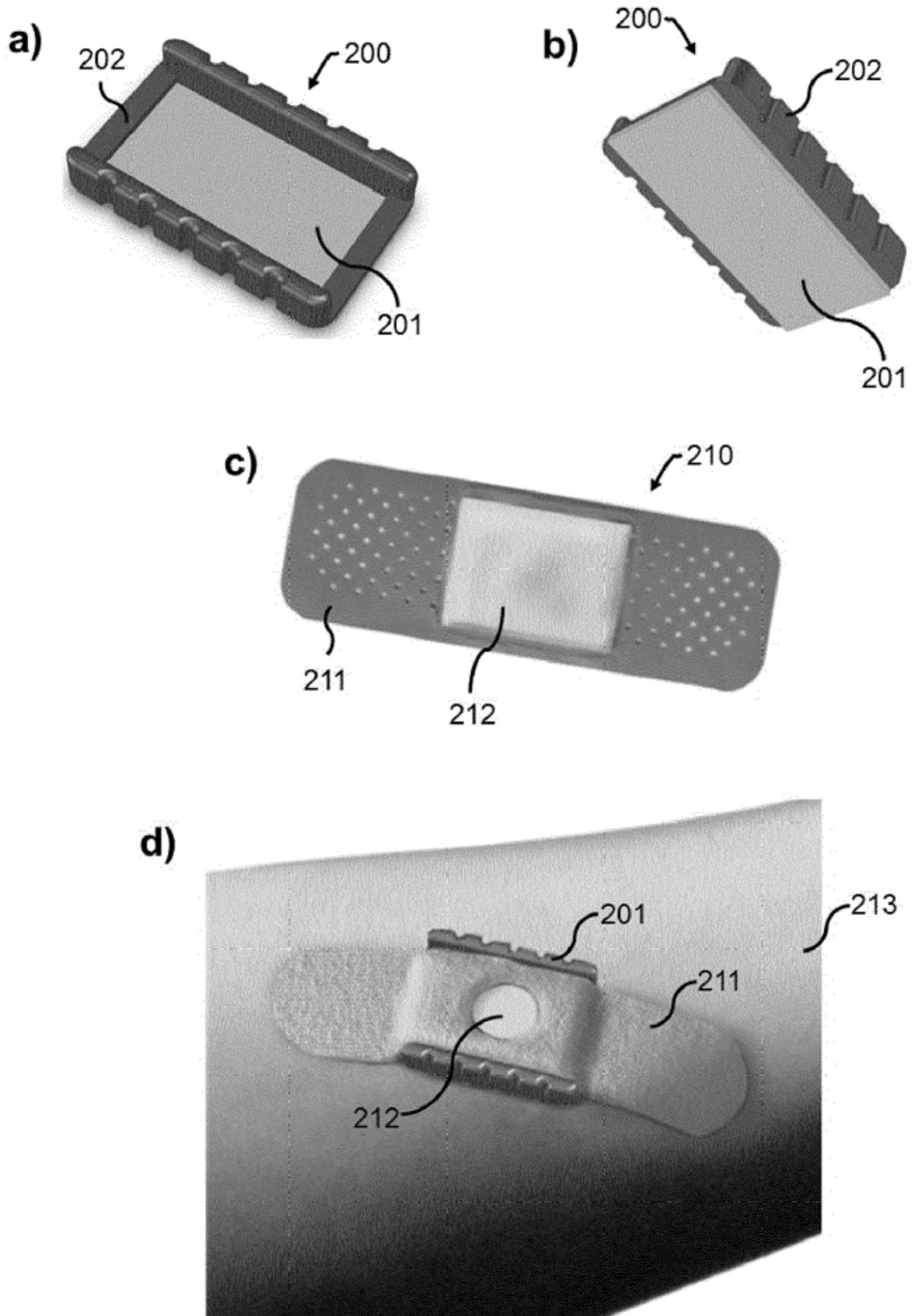


Figura 3

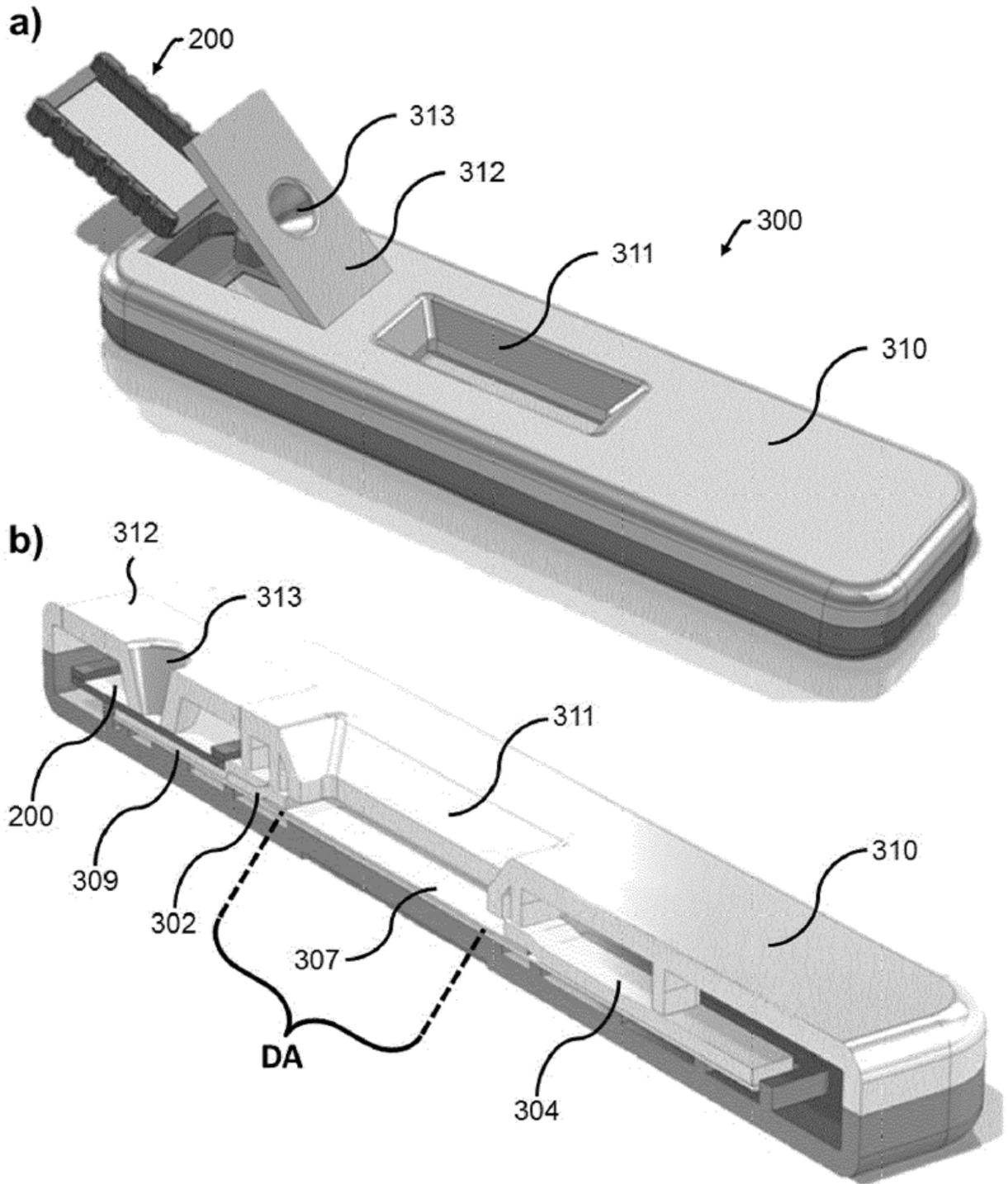


Figura 4

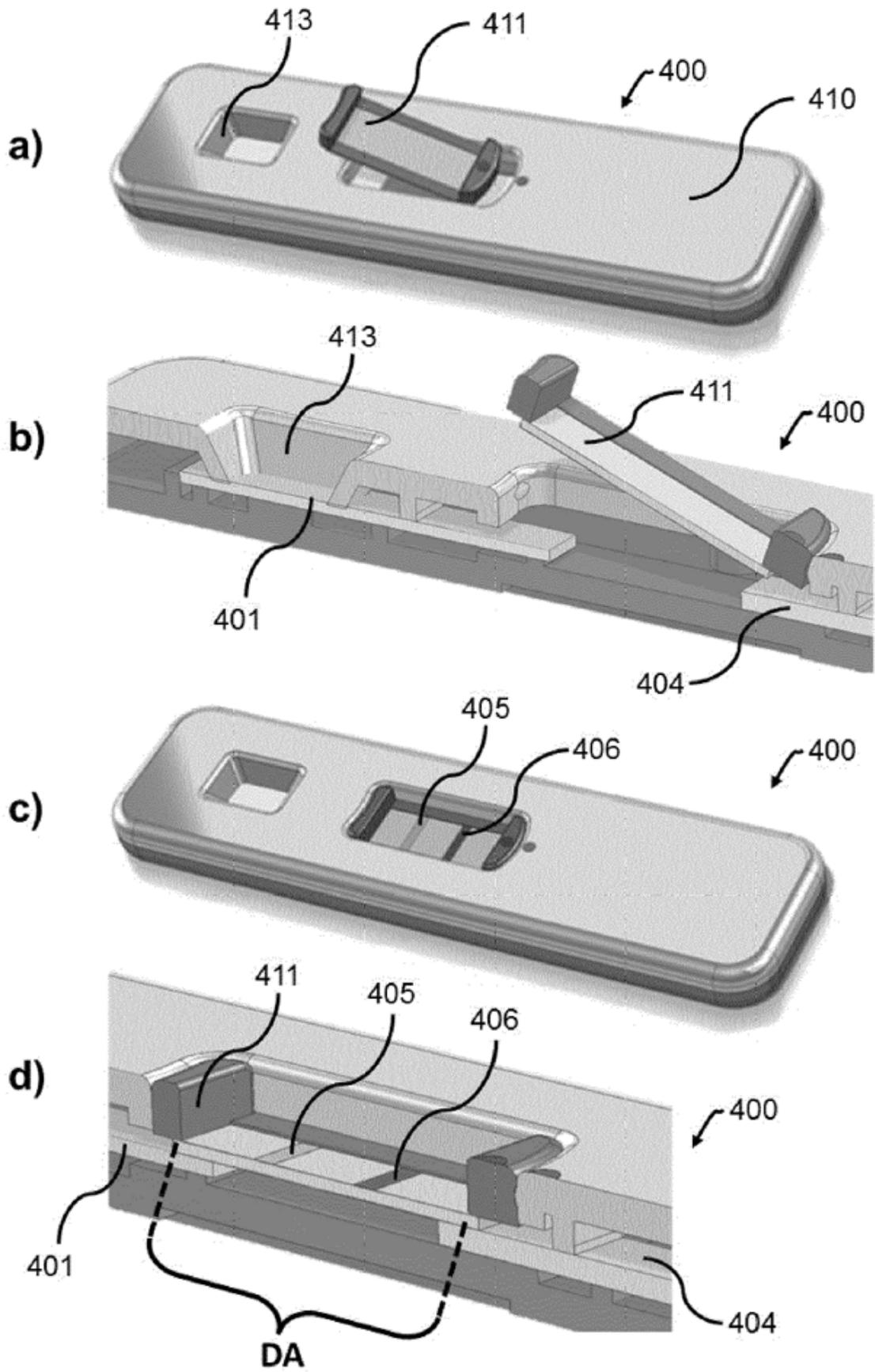


Figura 5

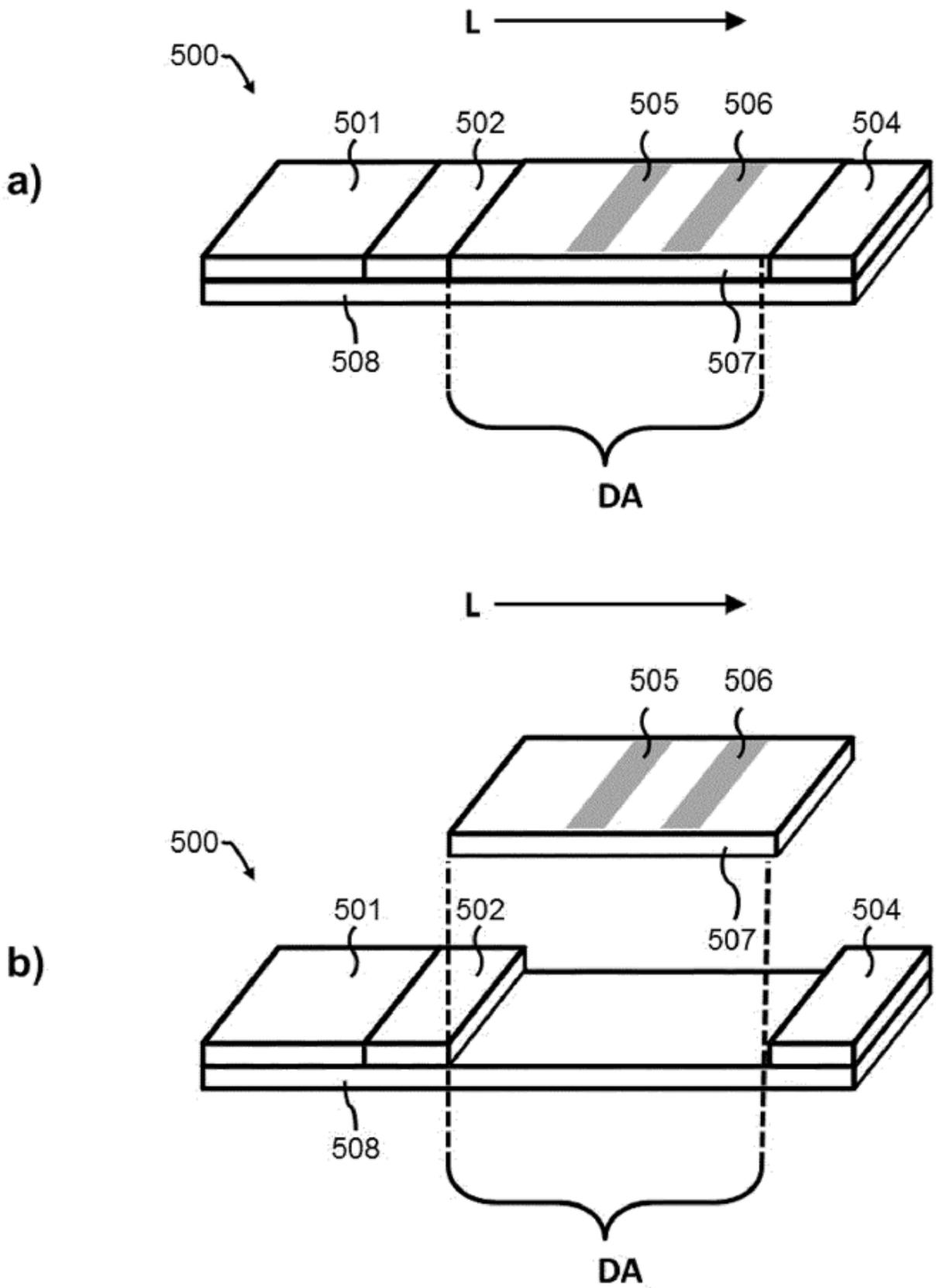


Figura 6

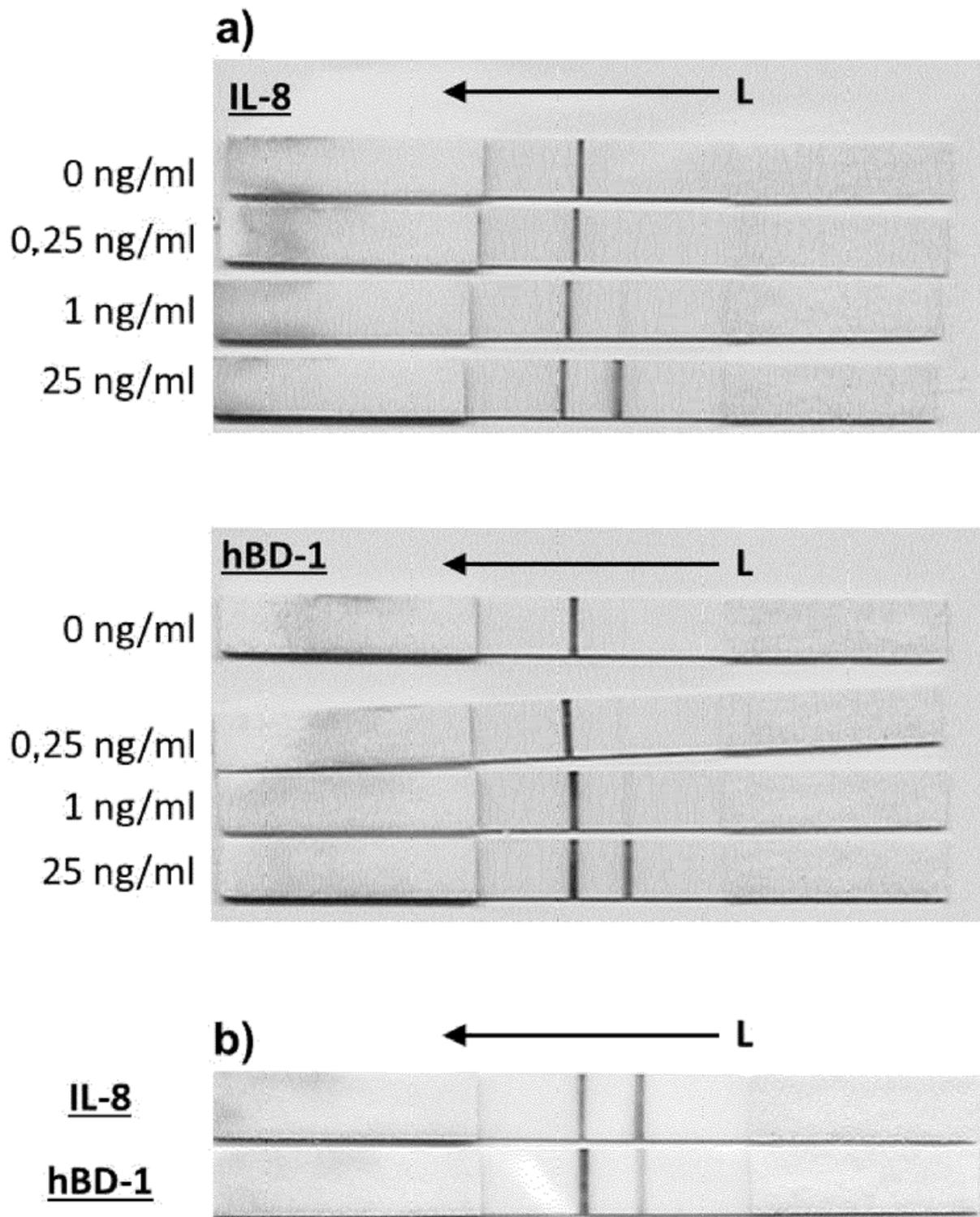


Figura 7

