

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 971 214**

(51) Int. Cl.:

H01J 49/04 (2006.01)
A61B 10/00 (2006.01)
G01N 1/02 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
B01L 3/02 (2006.01)
G01N 1/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2017 PCT/US2017/049689**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **08.03.2018 WO18045208**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2017 E 17847571 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2024 EP 3496859**

(54) Título: **Sonda de recolección y métodos para su uso**

(30) Prioridad:

**02.09.2016 US 201662383234 P
21.10.2016 US 201662411321 P
23.02.2017 US 201762462524 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.06.2024

(73) Titular/es:

**BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM (100.0%)
210 West 7th Street
Austin, TX 78701, US**

(72) Inventor/es:

**EBERLIN, LIVIA, SCHIAVINATO;
MILNER, THOMAS;
ZHANG, JIALING;
LIN, JOHN;
RECTOR, JOHN;
KATTA, NITESH y
ZAHEDIVASH, AYDIN**

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 971 214 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

Sonda de recolección y métodos para su uso

Esta solicitud reivindica el beneficio de las Solicitudes de Patente Provisionales de Estados Unidos Núm. 62/383.234, presentada el 2 de septiembre de 2016; 62/411.321, presentada el 21 de octubre de 2016; y 62/462,524, presentada el 23 de febrero de 2017.

5 Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo la Subvención Núm. R00 CA190783 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

Antecedentes de la invención

1. Campo de la invención

10 La presente invención se refiere en general al campo de la medicina, la biología molecular y la bioquímica. Más particularmente, tiene que ver con métodos y dispositivos para la evaluación de muestras de tejido mediante espectrometría de masas.

2. Descripción de la técnica relacionada

15 El diagnóstico clínico se realiza comúnmente mediante la evaluación de muestras de tejido de manera preoperatoria, intraoperatoria y posoperatoriamente, en varias fases diferentes del proceso de tratamiento del paciente. La evaluación de tejidos es muy crítica en el diagnóstico y gestión de pacientes con cáncer. La evaluación patológica intraoperatoria de tejidos extirpados, por ejemplo, se realiza de forma rutinaria para el diagnóstico y la evaluación de los márgenes quirúrgicos en una variedad de cirugías oncológicas. Las muestras de tejido resecado se envían a una sala cercana, a menudo llamada "sala congelada", para la preparación, tinción y evaluación del tejido. El espécimen de tejido es 20 congelado, seccionado, teñido e interrogado mediante microscopía óptica por un patólogo experto que evalúa cuidadosamente si los márgenes quirúrgicos contienen células cancerosas (margen positivo) o no (margen negativo). Si bien el análisis de secciones congeladas intraoperatorias se ha realizado en la práctica clínica durante décadas, presenta muchos desafíos. Los artefactos de congelación aparecen durante el procesamiento del tejido e interfieren 25 en la estructura del tejido y la morfología celular, complicando así la interpretación patológica. Por otra parte, ciertas células tumorales son muy difíciles de reconocer debido a su patrón atípico de crecimiento y forma. Los enfoques moleculares podrían proporcionar evaluaciones muy precisas y potencialmente en tiempo real de muestras de tejido. Sin embargo, hasta la fecha no se han desarrollado dispositivos o metodologías adecuados que proporcionen una evaluación molecular eficaz de muestras de tejido.

30 La Patente de Estados Unidos US 6 803 566 B2 describe una sonda de unión líquida multiaxial que hace contacto con un punto en una superficie mediante un puente líquido. Se hace fluir un disolvente eluyente a través del punto. El disolvente dirige al menos una parte del analito lejos del lugar para la ionización y el análisis de masas. La sonda puede comprender tres conductos para el flujo de fluidos tales como reactivos, disolventes de lavado y disolventes de elución. Se puede utilizar presión positiva de gas para impulsar los fluidos.

Compendio de la invención

35 En una primera realización, se proporciona un método para obtener un perfil de espectrometría de masas según la reivindicación 1.

Otra realización más proporciona un aparato para producir muestras (p. ej., de tejidos) para análisis por espectrometría de masas según la reivindicación 12. En aspectos adicionales, el espectrómetro de masas está en comunicación con 40 un ordenador que proporciona un análisis de muestra. En ciertos aspectos, los resultados de cada análisis de muestra se proporcionan mediante una salida visual o auditiva del ordenador. Por ejemplo, los resultados de cada análisis de muestra realizado por el ordenador pueden indicarse mediante una luz de diferente color que se ilumina o mediante una frecuencia diferente de sonido producido. En algunos aspectos, el espectrómetro de masas es un espectrómetro de masas móvil. En aspectos adicionales, el espectrómetro de masas puede comprender una fuente de alimentación ininterrumpida (p. ej., una fuente de alimentación de batería). En otros aspectos adicionales, el espectrómetro de masas comprende una entrada que puede cerrarse para mantener el vacío del aparato. En otros aspectos adicionales, 45 el espectrómetro de masas está separado de la sonda por un filtro de malla (p. ej., para bloquear la contaminación).

En algunos aspectos, el depósito está configurado para formar una gotita del disolvente. En ciertos aspectos, el suministro de gas presurizado proporciona un gas a la sonda a una presión entre 0,069 bar y 0,34 bar. En aspectos adicionales, el suministro de gas presurizado proporciona un gas a la sonda a una presión entre 0,034 bar y 0,17 bar. 50 En varios aspectos, el suministro de gas presurizado proporciona aire a la sonda. En otros aspectos, el suministro de gas presurizado proporciona un gas inerte tal como nitrógeno o dióxido de carbono a la sonda.

En aspectos adicionales, el aparato comprende adicionalmente una bomba configurada para transferir el disolvente desde la cámara al primer conducto. En aspectos adicionales, el aparato puede comprender una primera válvula configurada para controlar un flujo desde el tercer conducto hasta el espectrómetro de masas. En algunos aspectos,

el tercer conducto está bajo vacío cuando la primera válvula está en la posición abierta. En otros aspectos, el aparato puede comprender una segunda válvula configurada para controlar un flujo de gas presurizado a través del segundo conducto.

5 En ciertos aspectos, el disolvente puede comprender agua y/o etanol. En varios aspectos, la sonda está formada a partir de polidimetilsiloxano (PDMS) y/o politetrafluoroetileno (PTFE). En algunos aspectos, la sonda es desechable. En aspectos particulares, la sonda puede incluir una punta de recolección que sea eyectable (p. ej., susceptible de ser eyectada de la sonda). En aspectos adicionales, la sonda comprende un dispositivo de seguimiento configurado para rastrear una ubicación de la sonda. En algunos aspectos, el depósito tiene un volumen entre 1 microlitro y 500 microlitros, entre aproximadamente 1 microlitro y 100 microlitros o entre aproximadamente 2 microlitros y 50 microlitros. En aspectos adicionales, el depósito tiene un volumen entre 5,0 microlitros y 20 microlitros.

10 En otros aspectos adicionales, el aparato puede comprender adicionalmente un sistema de control configurado para controlar: un flujo de disolvente (p. ej., flujo de un volumen fijo o discreto de disolvente) desde la cámara a través del primer conducto hasta el depósito; un flujo de gas presurizado desde el suministro de gas presurizado a través del segundo conducto hasta el depósito; y un flujo de muestra desde el depósito a través del tercer conducto hasta el 15 espectrómetro de masas. En algunos aspectos, el sistema de control está configurado para: controlar el flujo de disolvente a un caudal de entre 100 y 5000 microlitros por minuto (p. ej., entre 200 y 400 microlitros por minuto) durante un periodo de tiempo entre 1 y 3 segundos; controlar el flujo de gas presurizado a un caudal entre 0,069 y 0,69 bar durante un periodo de tiempo entre 10 y 15 segundos; y controlar el flujo de muestra durante un periodo de tiempo entre 10 y 15 segundos. Por ejemplo, en algunos aspectos, el sistema de control comprende un disparador o botón 20 para iniciar el flujo de disolvente. En aspectos adicionales, el sistema de control comprende un pedal (es decir, que puede ser manejado con la acción del pie) para iniciar el flujo de disolvente. Un experto en la técnica reconocerá que las longitudes del primer y/o segundo conductos pueden ajustarse para adaptarse al uso particular del sistema. En otros aspectos adicionales, el sistema de control está configurado para controlar: un flujo de disolvente (p. ej., caudal durante un periodo de tiempo fijo) desde la cámara a través del primer conducto hasta el depósito. En aspectos 25 adicionales, un aparato de las realizaciones no incluye un dispositivo para producir energía ultrasónica o vibratoria (p. ej., en cantidades suficientes para alterar los tejidos).

30 En algunos aspectos, se proporciona un método para evaluar muestras de tejido de un sujeto que comprende aplicar un disolvente a un sitio de tejido en el sujeto, recoger el disolvente aplicado para obtener una muestra líquida y someter la muestra a análisis de espectrometría de masas. En ciertos aspectos, el disolvente puede ser estéril. En algunos aspectos, el disolvente es una formulación farmacéuticamente aceptable. En aspectos específicos, el disolvente es una solución acuosa. Por ejemplo, el disolvente puede ser agua estéril o consistir esencialmente en agua. En otros aspectos, el disolvente puede comprender de aproximadamente 1% a 5%, 10%, 15%, 20%, 25% o 30% de un alcohol. En algunos aspectos, el disolvente comprende de 0,1% a 20% de un alcohol, de 1% a 10% de un alcohol o de 1% a 5%, de 1% a 10% de un alcohol (p. ej., etanol). En algunos casos, el alcohol puede ser etanol.

35 La aplicación del disolvente al tejido comprende aplicar un volumen discreto de disolvente al sitio del tejido. En algún aspecto, el disolvente se aplica en una sola gota. En un aspecto adicional, el disolvente se aplica en un número discreto de gotas de 1 a 10. En algunas realizaciones, el disolvente se aplica a la muestra desde el depósito a través de un canal independiente del gas presurizado. En realizaciones adicionales, el disolvente se aplica a la muestra a baja presión. Por ejemplo, en algunos aspectos, el disolvente se aplica mediante una bomba mecánica de modo que el disolvente se aplica al sitio del tejido (p. ej., movido a un depósito donde está en contacto con el sitio del tejido) con una fuerza mínima, ejerciendo así una presión mínima (y produciendo un daño mínimo) en un sitio del tejido. La baja presión es inferior a 6,89 bar y puede ser inferior a 6,21 bar, inferior a 5,52 bar, inferior a 4,83 bar, inferior a 4,14 bar, inferior a 0,34 bar o inferior a 1,72 bar. En algunas realizaciones, la baja presión es de aproximadamente 0,069 bar a aproximadamente 6,89 bar, de aproximadamente 0,034 bar a aproximadamente 3,45 bar, de aproximadamente 0,034 bar a aproximadamente 1,72 bar, o de aproximadamente 0,069 bar a aproximadamente 0,69 bar. En aspectos particulares, el volumen discreto de disolvente está entre aproximadamente 0,1 y 100 µl, o entre aproximadamente 1 y 50 µl. En aspectos adicionales, la recolección del disolvente aplicado se realiza entre 0,1 y 30 segundos después de la etapa de aplicación. En un aspecto específico, la recolección del disolvente aplicado se realiza entre 1 y 10 segundos después de la etapa de aplicación (p. ej., al menos 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 segundos). En aspectos adicionales, un 40 método de las realizaciones no implica la aplicación de energía ultrasónica o vibratoria a una muestra o tejido. En algunos aspectos, el sitio del tejido es un sitio del tejido interno que se está evaluando quirúrgicamente.

45 En un aspecto adicional, un método de las realizaciones comprende aplicar un volumen fijo o discreto de un disolvente (p. ej., utilizando una bomba mecánica) a un sitio de tejido a través de un conducto de disolvente. En algunos aspectos, el volumen fijo o discreto de un disolvente se mueve a través de un conducto de disolvente hacia un depósito donde 50 está en contacto directo con un sitio de tejido (p. ej., durante 0,5-5,0 segundos). En aspectos adicionales, la recolección del disolvente aplicado comprende aplicar una presión negativa para arrastrar la muestra hacia un conducto de recolección y/o aplicar una presión de gas para empujar la muestra hacia un conducto de recolección. En algunos aspectos, el disolvente se aplica a través de un conducto de disolvente que está separado del conducto de recolección. En aspectos adicionales, en donde se aplica una presión de gas para empujar la muestra hacia el conducto de recolección, la presión del gas se aplica a través de un conducto de gas que está separado del conducto de disolvente y del conducto de recolección. En ciertos aspectos, en donde se aplica una presión de gas para empujar la muestra hacia el conducto de recolección, la presión de gas aplicada es inferior a 6,89 bar. Por ejemplo, la presión del gas es

preferiblemente inferior a 0,69 bar, tal como de 0,0069 a 0,34 bar. En otros aspectos adicionales, un método de las realizaciones se define por no producir un daño físico detectable en el tejido que se está evaluando.

- En otros aspectos adicionales, el método puede comprender adicionalmente recolectar una pluralidad de muestras líquidas de una pluralidad de sitios de tejido. En algunos casos, el dispositivo (p. ej., la sonda) utilizado para recolectar las muestras se lava entre cada recolección de muestras. En otros aspectos, un dispositivo utilizado para recolectar las muestras incluye una punta de recolección desechable (sonda) que se puede cambiar entre cada recolección de muestra. En aspectos particulares, la punta de recolección puede ser eyectable (p. ej., susceptible de ser eyectada del dispositivo). En ciertos aspectos, la pluralidad de sitios de tejido comprende 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más sitios de tejido *in vivo*. En algunos aspectos, el método puede definirse como un método intraoperatorio.
- En otros aspectos adicionales, se proporciona un método para identificar un sitio de tejido muestreado y un método para comunicar la ubicación del sitio al operario del dispositivo (sonda). La identificación de un sitio de tejido de la muestra permite al operario acceder a la información molecular registrada en el sitio de tejido de la muestra en un momento posterior a la toma de muestras de las moléculas recolectadas del tejido. Se reconocen al menos tres tipos de enfoques de identificación. En el primer enfoque, se adjunta un material exógeno al sitio del tejido muestreado que identifica la información molecular muestreada. En un segundo enfoque, el dispositivo (sonda) está equipado con un sensor/emisor de seguimiento que permite registrar la ubicación de la sonda (dispositivo) y la comunicación con un dispositivo de imágenes cuando se muestrea la información molecular. En un tercer enfoque, la región del tejido se modifica para que el sitio pueda identificarse fácilmente después de recolectar moléculas de tejido. En el primer enfoque, los materiales que se pueden adjuntar al sitio del tejido muestreado incluyen, por ejemplo, una sutura, un clip quirúrgico, un polímero biocompatible que se adhiere al tejido o un chip RFID que se adjunta a una cuenta magnética que permite una fácil lectura y eliminación. En el segundo tipo de enfoque, la sonda puede contener un emisor de RF que forma parte de un sistema de seguimiento quirúrgico de RF, un emisor o reflector de ultrasonido que forma parte de un sistema de imágenes por US intraoperatorio. En este segundo enfoque, cuando el operario inicia la recolección de moléculas de tejido, el sistema de seguimiento registra la ubicación de la sonda en el sistema de imágenes asociado (p. ej., RF, US, CT, MRI) que puede estar en comunicación con el dispositivo. A continuación, el operario puede identificar cualquiera de los sitios de tejido de los que se tomaron muestras en un momento posterior consultando las imágenes grabadas que pueden indicar al operario la ubicación de los sitios de los que se tomaron muestras. En el tercer enfoque, se modifica el tejido. En este tercer enfoque, se puede utilizar una fuente láser en comunicación con la sonda para extirpar o coagular un patrón en el tejido que identifica el sitio de la muestra. Cualquiera de estos tres enfoques puede combinarse. Por ejemplo, se podrían combinar los enfoques 1, 2 y 3, en donde se adjunta un material exógeno al sitio del tejido después de recolectar moléculas de tejido y un láser modela el tejido exógeno mientras un sensor de RF registra la ubicación de la ubicación de recolección y se comunica con el dispositivo de generación de imágenes.
- En otros aspectos adicionales más, la espectrometría de masas comprende MS con ionización ambiental. En varios aspectos, someter la muestra a análisis de espectrometría de masas puede comprender determinar un perfil correspondiente al sitio del tejido. En otro aspecto, el método puede comprender adicionalmente comparar el perfil con un perfil de referencia para identificar sitios de tejido que incluyen tejido enfermo. En otros aspectos, el método también comprende resear sitios de tejido que se identifican por incluir tejido enfermo. En algunos aspectos, el método se realiza utilizando un aparato según cualquiera de las realizaciones y aspectos descritos anteriormente.
- En algunos aspectos de las realizaciones, los sitios de tejido enfermo para la evaluación mediante métodos y dispositivos de las realizaciones comprenden (o se sospecha que comprenden) células cancerosas. Las células cancerosas que pueden evaluarse según las realizaciones incluyen, pero sin limitarse a, células o tejidos tumorales de tiroides, ganglios linfáticos, vejiga, sangre, huesos, médula ósea, cerebro, mama, colon, esófago, intestino, encías, cabeza, riñón, hígado, pulmón, nasofaringe, cuello, ovario, próstata, piel, estómago, testículos, lengua o útero (o tejidos que rodean tales tumores). En algunos aspectos, el cáncer puede ser una neoplasia, maligna; carcinoma; carcinoma indiferenciado; carcinoma de células gigantes y fusiformes; carcinoma de células pequeñas; carcinoma papilar; carcinoma de células escamosas; carcinoma linfoepitelial; carcinoma de células basales; carcinoma pilomatriz; carcinoma de células de transición; carcinoma papilar de células de transición; adenocarcinoma; gastrinoma, maligno; colangiocarcinoma; carcinoma hepatocelular; carcinoma hepatocelular y colangiocarcinoma combinados; adenocarcinoma trabecular; carcinoma adenoide quístico; adenocarcinoma en pólipo adenomatoso; adenocarcinoma, poliposis coli familiar; carcinoma sólido; tumor carcinoide, maligno; adenocarcinoma branquiolo-alveolar; adenocarcinoma papilar; carcinoma cromófobo; carcinoma acidófilo; adenocarcinoma oxífilo; carcinoma basófilo; adenocarcinoma de células claras; carcinoma de células granulares; adenocarcinoma folicular; adenocarcinoma papilar y folicular; carcinoma esclerosante no encapsulante; carcinoma cortical suprarrenal; carcinoma endometrioide; carcinoma de apéndice cutáneo; adenocarcinoma apocrino; adenocarcinoma sebáceo; adenocarcinoma ceruminoso; carcinoma mucoepidermoide; cistadenocarcinoma; cistadenocarcinoma papilar; cistoadenocarcinoma seroso papilar; cistadenocarcinoma mucinoso; adenocarcinoma mucinoso; carcinoma de células en anillo de sella; carcinoma de conducto infiltrante; carcinoma medular; carcinoma lobulillar; carcinoma inflamatorio; enfermedad de Paget, mamaria; carcinoma de células acinares; carcinoma adenoescamoso; adenocarcinoma con metaplasia escamosa; timoma, maligno; tumor del estroma ovárico, maligno; tecoma, maligno; tumor de células de la granulosa, maligno; androblastoma, maligno; carcinoma de células de Sertoli; tumor de células de Leydig, maligno; tumor de células lipídicas, maligno; paraganglioma, maligno; paraganglioma extramamario, maligno; feocromocitoma; glomangiosarcoma; melanoma maligno; melanoma amelanótico; melanoma de extensión superficial; melanoma

maligno en nevo pigmentado gigante; melanoma de células epiteloides; nevo azul, maligno; sarcoma; fibrosarcoma; histiocitoma fibroso, maligno; mixosarcoma; liposarcoma; leiomiosarcoma; rabdomiosarcoma; rabdomiosarcoma embrionario; rabdomiosarcoma alveolar; sarcoma estromal; tumor mixto, maligno; tumor mixto mulleriano; nefroblastoma; hepatoblastoma; carcinosarcoma; mesenquimoma maligno; tumor de Brenner, maligno; tumor filoides, maligno; sarcoma sinovial; mesotelioma maligno; disgerminoma; carcinoma embrionario; teratoma maligno; struma ovarii, maligno; coriocarcinoma; mesonefroma, maligno; hemangiosarcoma; hemangioendotelioma, maligno; sarcoma de Kaposi; hemangiopericitoma, maligno; linfangiosarcoma; osteosarcoma; osteosarcoma yuxtacortical; condrosarcoma; condroblastoma, maligno; condrosarcoma mesenquimatoso; tumor óseo de células gigantes; sarcoma de Ewing; tumor odontogénico, maligno; odontosarcoma ameloblástico; ameloblastoma, maligno; fibrosarcoma ameloblástico; pinealoma, maligno; cordoma; glioma, maligno; ependimoma; astrocitoma; astrocitoma protoplásmico; astrocitoma fibrilar; astroblastoma; glioblastoma; oligodendroglioma; oligodendroblastoma; neuroectodérmico primitivo; sarcoma cerebeloso; ganglioneuroblastoma; neuroblastoma; retinoblastoma; tumor neurogénico olfatorio; meningioma maligno; neurofibrosarcoma; neurilemoma maligno; tumor de células granulares, maligno; linfoma maligno; enfermedad de Hodgkin; Hodgkin o paragranuloma. En otros aspectos, el cáncer es cáncer de tiroides, cáncer de cerebro (p. ej., un glioma), un cáncer de próstata, un cáncer de mama (p. ej., un cáncer de mama triple negativo), un cáncer de páncreas (p. ej., un adenocarcinoma ductal pancreático), leucemia mieloide aguda (AML), melanoma, cáncer de células renales o un cáncer que ha hecho metástasis en un ganglio linfático.

Como se emplea en el presente documento, "muestra" o "muestras líquidas" pueden referirse a extractos de tejidos u otros especímenes biológicos (p. ej., extractos que comprenden proteínas y metabolitos) obtenidos poniendo en contacto un tejido o espécimen biológico con un disolvente según las realizaciones. En algunos aspectos, una muestra puede ser un extracto de un espécimen no biológico, tal como la superficie de un objeto (p. ej., una muestra forense).

Como se emplea en el presente documento, "esencialmente libre", en términos de un componente especificado, se utiliza en el presente documento para significar que ninguno de los componentes especificados ha sido formulado intencionadamente en una composición y/o está presente solo como un contaminante o en cantidades traza. Por lo tanto, la cantidad total del componente especificado resultante de cualquier contaminación no intencionada de una composición está muy por debajo de 0,01%. Lo más preferido es una composición en donde no se pueda detectar ninguna cantidad del componente especificado con métodos analíticos convencionales.

Como se emplea en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, "un", "uno" o "una" pueden significar uno o más. Como se emplea en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, cuando se utilizan junto con el término "que comprende", los términos "un", "uno" o "una" pueden significar uno o más de uno. Como se emplea en el presente documento, en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, "otro" o "adicional" pueden significar al menos un segundo o más.

Como se emplean en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "conducto" y "tubo" se utilizan indistintamente y se refieren a una estructura que se puede utilizar para dirigir el flujo de un gas o líquido.

Como se emplea en el presente documento en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la variación inherente del error del dispositivo, el método que se emplea para determinar el valor o la variación que existe entre los sujetos del estudio.

Otros objetos, características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan únicamente a modo de ilustración, ya que resultarán evidentes varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la invención para los expertos en la técnica a partir de esta descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor haciendo referencia a uno o más de estos dibujos combinados con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

FIGs. 1A-Q: Representación esquemática del sistema MasSpec Pen y etapas operativas. A) El dispositivo portátil del tamaño de un bolígrafo se integra directamente en la interfaz del espectrómetro de masas construido en el laboratorio a través de un tubo de PTFE (u otro material altamente hidrófobo). La interfaz alberga las válvulas de pellizco, el microcontrolador y los tubos para conectar el sistema a la entrada del espectrómetro de masas. El sistema es activado automáticamente por el usuario a través de un pedal. B) El MassSpec Pen está diseñado con una punta impresa en 3D PDMS y tres conductos de PTFE, que proporcionan agua entrante a la punta, gas y un conducto saliente para la gota de agua. C) La punta entra en contacto con el tejido para su análisis y está diseñada con 3 conductos y un depósito de disolvente. Cuando el sistema se activa ($t=0$ s) mediante el uso a través del pedal, la bomba de jeringa suministra un volumen controlado de agua al depósito. La gota de agua discreta interactúa con el tejido para extraer

moléculas. Después, en este caso, de 3 segundos de extracción, los conductos de vacío y de gas se abren simultáneamente para transportar la gota desde el MasSpec Pen al espectrómetro de masas a través del sistema de tubos para el análisis molecular. D) Muestra un esquema del elemento funcional ilustrativo de un dispositivo MasSpec Pen. E-F) Muestran vistas ampliadas de la punta de un MasSpec Pen ilustrativo. G-Q) Muestran configuraciones alternativas de un sistema de las realizaciones.

FIGs. 2A-2B: Espectros de masas de una sección de tejido cerebral de ratón de MasSpec Pen utilizando el espectrómetro de masas Q Exactive Orbitrap. A) Espectro de masas de la sección del cerebro del ratón, B) Cromatografía iónica total, el espectro del recuadro proviene del fondo del portaobjetos de vidrio limpio (la escala de intensidad del fondo y del tejido cerebral del ratón se configuró para que fuera la misma).

FIGs. 3A-3B: A) Muestra una comparación de espectros de masas de muestras biológicas que se obtuvieron utilizando un disolvente compuesto de etanol:H₂O (1:20) o etanol:H₂O (1:5). B) Espectros de masas MasSpec Pen en modo de iones negativos representativos obtenidos de secciones de tejido cerebral de ratón utilizando mezclas de agua y etanol en diversas proporciones.

FIGs. 4A-4B: Comparación de espectros de masas utilizando MasSpec Pen recopilados de a) secciones de cerebro de ratón y b) tejido reciente de cerebro de ratón.

FIGs. 5A-E: Comparación de espectros de masas en tejido canceroso frente a normal para una variedad de diferentes tipos de cáncer: cáncer de mama (A); cáncer de riñón (B); un ganglio linfático canceroso (C), cáncer de ovario (D) y cáncer de tiroides (E).

FIGs. 6A-6C: Comparación de espectros de masas recopilados de A) MasSpec Pen y B) DESI. C) Comparación entre los espectros de masas en modo de iones negativos MasSpec Pen y DESI obtenidos de una sección de tejido cerebral de ratón.

FIG. 7: El espectro de timosina β-4 que se detectó en tejidos humanos en modo de iones negativos.

FIGs. 8A-8B: A) Comparación de espectros que se obtuvieron de especímenes recientes de tiroides normales y cancerosos. B) Análisis MasSpec Pen de carcinoma papilar de tiroides y secciones de tejido normal (arriba). Se muestran un espectro de masas representativo de MasSpec Pen en modo de iones negativos obtenido de una sección de tejido tiroideo normal y (abajo) una sección de tejido de carcinoma papilar de tiroides. Se proporciona la identificación de los iones moleculares más abundantes. Los recuadros muestran una imagen óptica de la sección de tejido teñido con HE evaluada mediante histopatología.

FIG. 9: PCA de los datos obtenidos para las secciones de tejido humano, incluidas las secciones de tejido mamario y de tiroides normales y tumorales. Como se observa en los gráficos de puntuaciones, PC1 y PC3 explican 46,1% de la varianza total del conjunto de datos de tejido mamario, mientras que PC1 y PC2 explican 47,9% de la varianza total del conjunto de datos de tejido tiroideo. También se incluyen gráficos de carga para cada tipo de tejido analizado.

FIGs. 10A-10B: Resultados del análisis de componentes principales para tejidos humanos recientes. A) Discriminación de tiroides normal y tumoral. B) Discriminación de ganglios linfáticos normales y tumorales.

FIG. 11: La información molecular obtenida de muestras de tejido utilizando MasSpec Pen es diagnóstica de cáncer humano. Se analizaron un total de 253 muestras de tejido de pacientes, incluidos cáncer de mama, tiroides, ovario y pulmón, y muestras de tejido normal. Los gráficos 3D PCA (PC1, PC2 y PC3) muestran la separación entre los espectros de masas de cáncer y normales obtenidos.

FIGs. 12A-12E: Mapeo del Punto de Muestra 1 (FIG. 12A), Punto de Muestra 2 (FIG. 12B), Punto de Muestra 3 (FIG. 12C), Punto de Muestra 4 (FIG. 12D) y Punto de Muestra 5 (FIG. 12E).

FIGs. 13A-13E: Espectro de masas de los Puntos de Muestra 1-5 en el rango de masas completo (FIG. 13A), rango de masas 500-1800 (FIG. 13B), rango de masas 500-1000 (FIG. 13C), rango de masas 785 a 809 (13D) y rango de masas de 870 a 920 (FIG. 13E).

FIGs. 14A-14B: Análisis con MasSpec Pen de una muestra de tejido HGSC con composición histológica mixta. A) La imagen óptica muestra la muestra de tejido que se analizó en los puntos demarcados (1-5) utilizando un MasSpec Pen de 1,5 mm de diámetro. Después del análisis MasSpec Pen, la muestra de tejido se congeló, se seccionó y se tiñó con HE. Se muestra una imagen óptica de una sección de tejido teñido con HE obtenida en el punto 3, que presenta una composición histológica mixta que incluye cáncer y tejido de estroma normal adyacente. B) Los espectros de masas en modo de iones negativos del MasSpec Pen se muestran para el punto 1 (estroma normal), el punto 3 (mezcla de estroma normal y cáncer) y el punto 5 (cáncer). C) Se muestran el diagnóstico patológico de los cinco puntos analizados y los resultados de la predicción de Lasso para este conjunto independiente de datos.

FIGs. 15A-15B: MasSpec Pen permite un análisis molecular suave y no destructivo de muestras de tejido. A) Las imágenes ópticas muestran una muestra de tejido de adenocarcinoma de pulmón antes, durante y después del análisis MasSpec Pen. Una ampliación de la muestra de tejido no muestra daños macroscópicos en la región del tejido analizada por el MasSpec Pen. B) Se muestra el espectro de masas en modo de iones negativos obtenido para la región del tejido analizada, incluida la identificación de los iones moleculares más abundantes.

FIGs. 16A-16B: Análisis *in vivo* de tejidos tumorales y normales durante la cirugía en un modelo animal murino. A) Los experimentos se realizaron en ratones bajo anestesia. Las imágenes ópticas muestran al animal *e in vivo* antes, durante y después del análisis MasSpec Pen. B) Los espectros de masas representativos en modo de iones negativos muestran perfiles moleculares distintos de los tejidos normales y tumorales.

FIG. 17: Espectros de masas representativos del MasSpec Pen en modo de iones negativos obtenidos utilizando varios diámetros de muestreo del MasSpec Pen.

FIG. 18: Espectros de masas representativos en modo de iones positivos de tejido cerebral de ratón. Los iones observados en abundancias relativas altas se identificaron mediante espectrometría de masas en tandem como aductos de potasio (K^+) y sodio (Na^+) de glicerofosfocolinas y lípidos diacilglicéridos, como se indica en los espectros de masas.

FIG. 19: Espectros de masas representativos de MasSpec Pen en modo de iones negativos obtenidos de una muestra de tejido HGSC que contiene regiones de tejidos normales y cancerosos.

FIG. 20: Imagen óptica del análisis *in vivo* posterior y la sección de tejido teñida con HE obtenida de la misma región después del análisis MasSpec Pen.

FIG. 21: Comparación entre los espectros de masas en modo de iones negativos de MasSpec Pen obtenidos *in vivo* y *ex vivo* de la misma muestra de tumor del modelo de ratón.

FIG. 22: Espectros de masas representativos en modo de iones negativos obtenidos de secciones de tejido cerebral de ratón con diferentes tiempos de extracción, 5 s, 3 s y 1 s.

Descripción de realizaciones ilustrativas

I. Las realizaciones actuales

En ciertos aspectos, la presente solicitud proporciona métodos y dispositivos para la evaluación molecular de muestras, tales como muestras de tejido. En aspectos particulares, se pueden utilizar los métodos para evaluar múltiples sitios de tejido durante una operación (o biopsia) del tejido. Esta característica permite la identificación precisa de tejidos enfermos (p. ej., sitios de tejido que retienen células cancerosas) en "tiempo real", lo que permite a los cirujanos abordar con mayor precisión solo el tejido enfermo en relación con los tejidos normales circundantes. En aspectos particulares, los métodos aquí descritos pueden implicar la administración de un volumen fijo o discreto de disolvente a un sitio de tejido, seguido de la recolección de una muestra líquida del sitio y el análisis de la muestra líquida mediante espectrometría de masas. Es importante destacar que, en lugar de aplicarse mediante pulverización a alta presión, el disolvente se aplica en forma de gotas discretas y a baja presión. Estos métodos permiten la recolección precisa de muestras de un sitio de tejido distinto y al mismo tiempo evitan daños al tejido que se está evaluando. El perfil de espectrometría de masas resultante de las muestras recolectadas permite diferenciar los sitios de tejido enfermos de los normales. El método se puede repetir en múltiples sitios de interés para mapear con mucha precisión los cambios moleculares (p. ej., en un tejido). Es importante destacar que los perfiles de las muestras podrían diferenciarse incluso sin utilizar una fuente de ionización. Por lo tanto, aunque los métodos de las realizaciones podrían utilizarse junto con una fuente de ionización, no se requiere el uso de dicha fuente. Estas metodologías pueden permitir la evaluación de una pluralidad de sitios de tejido durante un corto período de tiempo, lo que permite una evaluación muy precisa de los límites de los tejidos enfermos frente a los normales.

En algunos aspectos, los métodos detallados en el presente documento se pueden utilizar para recolectar y analizar muestras de una amplia gama de fuentes.

En algunos aspectos, los materiales (PDMS y PTFE) y el disolvente (p. ej., disolventes solo acuosos) utilizados en los dispositivos de las realizaciones son biológicamente compatibles, de modo que se pueden utilizar en cirugía para análisis en tiempo real. Además, debido a que los dispositivos pueden ser muy compactos, pueden ser portátiles o integrarse en un sistema quirúrgico robótico, tal como el sistema quirúrgico Da Vinci (p. ej., en un sistema automatizado). Por lo tanto, se pueden tomar muestras rápidamente de muchas regiones de la cavidad corporal humana durante la cirugía y analizarlas (p. ej., utilizando una base de datos de firmas moleculares y algoritmos de aprendizaje automático). Por lo tanto, los resultados del diagnóstico pueden proporcionarse en tiempo real para cada región muestreada. A continuación, se detallan dispositivos ilustrativos para su uso en estos métodos.

Refiriéndose inicialmente a la **FIG. 1D**, se muestra un aparato 100 para tomar muestras de tejido para análisis de espectrometría de masas. En esta realización, el aparato 100 comprende una sonda 110, una cámara 120 con disolvente, un suministro de gas presurizado 130 y un espectrómetro de masas 140. En algunos aspectos, la sonda está comprendida en un alojamiento (p. ej., para proporcionar un agarre en el caso de un dispositivo portátil). En

5 aspectos adicionales, la carcasa puede comprender una función de clic (p. ej., un gatillo, botón o pedal) que puede utilizarse para controlar el flujo de fluido y/o gas a través de la sonda. En algunos aspectos, la sonda está compuesta de un material que comprende PDMS y/o PTFE. En algunos aspectos, la sonda se produce mediante un procedimiento de impresión 3D.

10 La **FIG. 1E** proporciona una vista en sección transversal más detallada de la sonda 110 e ilustra que la sonda 110 comprende un primer conducto 111, un segundo conducto 112, un tercer conducto 113 y un depósito 115. En la realización ilustrada, el primer conducto 111 está en comunicación de fluido con la cámara 120, el segundo conducto 112 está en comunicación de fluido con el suministro de gas presurizado 130, y el tercer conducto 113 está en comunicación de fluido con el espectrómetro de masas 140. La **FIG. 1F** proporciona una vista en sección transversal adicional de una sonda con dimensiones para una realización particular.

15 Se entiende que, en ciertas realizaciones, cada uno de los conductos 111, 112 y 113 (que pueden tener cualquier longitud deseada) puede comprender componentes separados. Por ejemplo, las partes de cada uno de los conductos dentro de la sonda 110 pueden formarse como canales integrales durante la fabricación de la sonda 110. Además, las partes de cada uno de los conductos entre la sonda 110 y la cámara 120, el suministro de gas presurizado 130 y el espectrómetro de masas 140 pueden ser tubos u otros componentes adecuados para proporcionar flujo de fluido.

20 En esta realización, el aparato 100 puede comprender una bomba 125 configurada para transferir el disolvente desde la cámara 120 al primer conducto 111 y al depósito 115. En la realización mostrada, el aparato 100 también puede comprender una primera válvula 121 configurada para controlar un flujo de muestra desde el depósito 115 a través del tercer conducto 113 al espectrómetro de masas 140. El aparato 100 también puede comprender una segunda válvula 122 configurada para controlar un flujo de gas presurizado a través del segundo conducto 112 al depósito 115.

25 Se puede configurar un sistema de control 160 para controlar los parámetros operativos del aparato 100. Por ejemplo, el sistema de control 160 se puede configurar para controlar un flujo de disolvente desde la cámara 120 a través del primer conducto 111 al depósito 115 controlando el funcionamiento de la bomba 125. Además, el sistema de control 160 se puede configurar para controlar el flujo de muestra desde el depósito 115 al espectrómetro de masas 140 controlando la apertura y el cierre de la primera válvula 121. El sistema de control 160 se puede configurar adicionalmente para controlar el flujo de gas presurizado desde el recipiente de gas presurizado 130 al depósito 115 controlando la apertura y el cierre de la segunda válvula 122.

30 Durante el funcionamiento del aparato 100, un usuario puede colocar la sonda 110 de modo que el depósito 115 se coloque en el sitio de muestra 150. El sistema de control 160 puede accionar la bomba 125 durante períodos de tiempo específicos para transferir un volumen deseado del disolvente desde la cámara 120 al depósito 115 a través del primer conducto 111. En realizaciones ilustrativas, el disolvente en la cámara 120 puede ayudar en la extracción eficiente de moléculas de un sitio de muestra 150 para su análisis.

35 Además, el sistema de control 160 puede permitir un período de tiempo particular entre el funcionamiento de la bomba 125 y la apertura de la primera válvula 121. Esto puede permitir que un vacío del espectrómetro de masas 140 (o un sistema de vacío auxiliar separado) extraiga materiales de muestra (p. ej., moléculas del sitio de muestra de tejido 150) desde el depósito 115 al espectrómetro de masas 140 a través del tercer conducto 113.

40 Cuando se abre la primera válvula 121, el sistema de control 160 también puede abrir la segunda válvula 122 para permitir que un gas inerte (p. ej. N₂ o CO₂) sea transferido desde el suministro de gas presurizado 130 al depósito 115 a través del segundo conducto 112. El gas inerte puede ayudar al secado del tejido de la muestra antes del análisis, así como también evitar una brecha de disolvente en el primer conducto 111 (p. ej. como resultado de un vacío generado por el espectrómetro de masas 140 cuando el depósito 115 hace contacto con el sitio de muestra 150). El gas inerte también puede ayudar en el transporte de disolvente desde el sitio de muestra 150 al espectrómetro de masas 140 a través del tercer conducto 113.

45 El sistema de control 160 puede comprender soporte lógico y soporte físico adecuados para operar los diversos componentes del aparato 100. Se proporcionan realizaciones particulares de los diversos componentes mostrados en el esquema de la **FIG. 1** en los ejemplos que se analizan a continuación, incluida la sección titulada Ejemplo 1.

50 La **FIG. 1G** ilustra una realización del aparato 100 que es similar a la realización mostrada en la **FIG. 1D** anterior. En la realización de la **FIG. 1G**, sin embargo, el aparato 100 comprende adicionalmente una bomba 141 en comunicación de fluido con el conducto 113. En ciertas realizaciones, la bomba 141 puede ser una bomba de vacío externa que puede accionarse para aumentar la velocidad de la porción de muestra a través del conducto 113 hasta el espectrómetro de masas. Se entiende que los componentes del aparato 100 descritos en realizaciones anteriores funcionan de manera equivalente en esta realización (y en las realizaciones descritas posteriormente). Para mayor claridad, no todos los componentes están etiquetados con números de referencia en cada una de las figuras. Además,

los aspectos operativos de los componentes que son equivalentes a los componentes en realizaciones descritas anteriormente no se repetirán en la discusión de esta o realizaciones posteriores.

La FIG. 1H ilustra otra realización del aparato 100 que es similar a las realizaciones descritas anteriormente pero que también comprende una válvula 142, un contenedor de desechos 143 y una bomba 144 en comunicación de fluido con el conducto 113. En ciertas realizaciones, la válvula 142 se puede utilizar para desviar un disolvente u otra solución de limpieza desde el conducto 113 al contenedor de residuos 143 durante las etapas de limpieza. El contenedor de residuos 143 se puede vaciar mediante el accionamiento de la bomba 144. En realizaciones ilustrativas, se pueden utilizar etapas de limpieza o lavado utilizando agua, etanol, mezclas de agua y etanol en cualquier proporción, así como otro disolvente en cualquier fase del análisis de la muestra para disminuir efectos de transferencia. En ciertas realizaciones, la sonda 110 también se puede cambiar entre cada uso. Además, la sonda 110 puede insertarse en un vial que contiene disolvente para la etapa de lavado utilizando gas (burbujeo) para ayudar con la limpieza antes o después de la etapa de lavado automático. También se pueden utilizar otros métodos de limpieza, incluida la limpieza con una solución estéril. Por ejemplo, ciertas realizaciones pueden utilizar un protocolo de limpieza de: 1. Reemplazar la sonda; 2. Lavar con solución de etanolagua 50/50; 3. Lavar con etanol del 100%.

La FIG. 1I ilustra otra realización del aparato 100 que es similar a las realizaciones descritas anteriormente pero que también comprende un elemento calefactor 145 en el conducto 113. En ciertas realizaciones, el elemento calefactor 145 está configurado como un alambre calefactor que puede enrollarse alrededor del conducto 113. En otras realizaciones puede comprender diferentes configuraciones de elementos calefactores, incluidos, por ejemplo, calentadores cerámicos. El conducto 113 se puede calentar para mejorar el transporte de agua o disolvente al espectrómetro de masas 140, así como para ayudar a la ionización, en cualquiera de las realizaciones ilustrativas descritas en el presente documento. La calefacción se puede implementar a través de todo el sistema de conductos o en ubicaciones específicas.

La FIG. 1J ilustra una realización del aparato 100 que combina características de realizaciones descritas anteriormente. En particular, la realización mostrada en esta figura incluye el elemento calefactor 145 en el conducto 113 y la bomba 141. Los aspectos operativos del elemento calefactor 145 y la bomba 141 se han discutido previamente en la descripción de las FIGs. 1I y 1G, respectivamente, y no se repetirán aquí por motivos de brevedad.

La FIG. 1K ilustra una realización del aparato 100 que es similar a las realizaciones descritas anteriormente pero también comprende un dispositivo de ionización 146 para formar una pulverización proximal a una entrada para el espectrómetro de masas 140. En ciertas realizaciones, el dispositivo de ionización 146 puede ser, por ejemplo, un dispositivo de ionización por electropulverización (ESI), un dispositivo nano ESI o un dispositivo de ionización química a presión atmosférica (APCI). En realizaciones particulares, el conducto 113 no está conectado directamente al espectrómetro de masas 140 y se puede utilizar un dispositivo Venturi 147 para transportar una gota de muestra 150 al dispositivo de ionización 146 y la interfaz del espectrómetro de masas 140. En la FIG. 1L se muestra un perfil de espectrometría de masas de una realización del aparato 100 que incluye un dispositivo Venturi. Como se muestra en la FIG. 1L, el perfil obtenido es similar a las realizaciones que acoplan directamente el conducto 113 a la entrada del espectrómetro de masas 140.

Refiriéndose ahora a la FIG. 1M, una realización del aparato 100 incluye una bomba externa 141 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1G) y el dispositivo de ionización 146 y el dispositivo Venturi 147 como se muestra (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1K).

Como se muestra en la realización de la FIG. 1N, una realización del aparato 100 incluye un elemento calefactor 145 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1I) y el dispositivo de ionización 146 y el dispositivo Venturi 147 como se muestra (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1K).

Como se muestra en la realización de la FIG. 1O, una realización del aparato 100 incluye un elemento calefactor 145 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1I) y el dispositivo de ionización 146 y el dispositivo Venturi 147 como se muestra (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1K). Además, esta realización también incluye una bomba externa 141 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1G).

Como se muestra en la realización de la FIG. 1P, una realización del aparato 100 incluye una válvula 142, un recipiente de desechos 143 y una bomba 144 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1H). Además, esta realización también incluye un dispositivo de ionización 146 y un dispositivo Venturi 147 como se muestra (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1K).

Como se muestra en la realización de la FIG. 1Q, una realización del aparato 100 incluye una válvula 142, un recipiente de desechos 143 y una bomba 144 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1H). Además, esta realización también incluye un dispositivo de ionización 146 y un dispositivo Venturi 147 como se muestra (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1K). Esta realización incluye adicionalmente un elemento calefactor 145 (como se muestra y describe anteriormente en la FIG. 1I).

II. Metodologías de ensayo

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para determinar la presencia de tejido enfermo (p. ej., tejido tumoral) o detectar una firma molecular de un espécimen biológico mediante la identificación de patrones específicos de un perfil de espectrometría de masas. Los especímenes biológicos para análisis pueden ser de animales, plantas o cualquier material vivo que haya estado en contacto con moléculas u organismos biológicos. Los especímenes biológicos son muestras *in vivo* (p. ej. durante la cirugía).

Un perfil obtenido mediante los métodos de las realizaciones puede corresponder, por ejemplo, a proteínas, metabolitos o lípidos de especímenes biológicos o sitios de tejido analizados. Estos patrones pueden determinarse midiendo la presencia de iones específicos mediante espectrometría de masas. Algunos ejemplos no limitantes de métodos de ionización que se pueden acoplar a este dispositivo incluyen ionización química, ionización láser, ionización química a presión atmosférica, ionización electrónica, bombardeo atómico rápido, ionización por electropulverización, ionización térmica. Los métodos de ionización adicionales incluyen fuentes de plasma acopladas inductivamente, fotoionización, descarga luminosa, desorción de campo, termopulverización, desorción/ionización sobre silicio, análisis directo en tiempo real, espectroscopia de masas de iones secundarios, ionización por chispa e ionización térmica.

En particular, los presentes métodos pueden aplicarse o acoplarse a una fuente de ionización ambiental o a un método para obtener datos espectrales de masas, como una fuente de ionización ambiental de extracción. Las fuentes de ionización ambiental de extracción son métodos con, en este caso, procedimientos de extracción líquida seguidos dinámicamente de ionización. Algunos ejemplos no limitantes de fuentes de ionización ambiental de extracción incluyen ionización por desorción con electropulverización asistida por flujo de aire (AFADESI), análisis directo en tiempo real (DART), ionización por desorción con electropulverización (DESI), ionización por desorción mediante intercambio de carga (DICE), ionización por desorción con electropulverización asistida por electrodos (EADESI), ionización por desorción con láser con electropulverización (ELDI), ionización por pulverización electrostática (ESTASI), ionización por electropulverización con desorción por chorro (JeDI), ionización por desorción con electropulverización asistida por láser (LADESI), ionización por desorción con electropulverización por láser (LDESI), ionización por desorción con electropulverización láser asistida por matriz (MALDESI), ionización por desorción con electropulverización por nanopulverización (nano-DESI) o ionización por desorción con electropulverización en modo de transmisión (TM-DESI).

Como ocurre con muchos métodos de espectrometría de masas, la eficiencia de la ionización se puede optimizar modificando las condiciones de recolección o del disolvente, tales como los componentes del disolvente, el pH, los caudales de gas, el voltaje aplicado y otros aspectos que afectan a la ionización de la solución de muestra. En particular, los presentes métodos contemplan el uso de un disolvente o solución que sea compatible con el problema humano. Algunos ejemplos no limitantes de disolventes que se pueden utilizar como disolvente de ionización incluyen agua, etanol, metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, un ácido o una mezcla de los mismos. En algunas realizaciones, el método contempla una mezcla de acetonitrilo y dimetilformamida. Las cantidades de acetonitrilo y dimetilformamida pueden variarse para mejorar la extracción de los analitos de la muestra, así como para aumentar la ionización y volatilidad de la muestra. En algunas realizaciones, la composición contiene de aproximadamente 5:1 (v/v) de dimetilformamida:acetonitrilo a aproximadamente 1:5 (v/v) de dimetilformamida:acetonitrilo, tal como 1:1 (v/v) de dimetilformamida:acetonitrilo. Sin embargo, en la realización preferida el disolvente para su uso según las realizaciones es un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril o una solución acuosa tamponada.

III. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas de la invención. Los expertos en la técnica deberían apreciar que los mecanismos divulgados en los ejemplos que siguen representan mecanismos descubiertos por el autor de la presente invención que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, pueden considerarse modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían, a la luz de la presente divulgación, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se divultan y aún obtener un resultado similar sin apartarse del alcance de la invención.

Ejemplo 1: Diseño de MasSpec Pen Inteligente

El MasSpec Pen (**FIG. 1A**) se desarrolló como una sonda de muestreo portátil automatizada y biocompatible que permite una extracción suave, controlada en tiempo y volumen de moléculas de una muestra de tejido utilizando una gota de agua discreta. Se construyeron varios prototipos del sistema con el objetivo de minimizar el daño tisular, maximizar la extracción de analitos tisulares y maximizar la transferencia de disolvente al espectrómetro de masas.

El sistema desarrollado consiste en tres partes principales: 1) una bomba de jeringa que está programada para suministrar un volumen de disolvente discreto utilizando un caudal controlado; 2) sistemas de tubos integrados a válvulas de pellizco de dos vías para el transporte controlado de disolventes; 3) una punta de sonda que se utiliza para el muestreo directo de tejidos biológicos. Se exploraron y optimizaron varias iteraciones del sistema con el objetivo final de minimizar el daño tisular, maximizar la extracción de analitos tisulares y maximizar la transmisión de disolvente

al espectrómetro de masas. La **FIG. 1A** muestra una figura esquemática de un ejemplo de un aparato que comprende un dispositivo Diagnostic Pen (MasSpec Pen) para analizar tejido biológico.

El sistema optimizado contiene tres componentes principales: 1) una bomba de jeringa que está programada para suministrar un volumen de agua definido (4-10 μL) a la sonda de muestreo; 2) conductos de tubos de politetrafluoroetileno (PTFE) de diámetro pequeño (DI 800 μm) que están integrados en válvulas de pellizco bidireccionales rápidas (8 ms) para el transporte controlado de disolvente desde la bomba al tejido y desde el tejido al espectrómetro de masas; 3) una sonda portátil del tamaño de un bolígrafo para muestreo directo de tejidos biológicos.

El componente principal de la sonda portátil del tamaño de un bolígrafo es una punta de polidimetilsiloxano (PDMS) impresa en 3D (**FIG. 1B**), en la que el disolvente se retiene durante la interacción con el tejido. La punta se fabricó mediante impresión 3D y está elaborada de polidimetilsiloxano (PDMS) biológicamente compatible. La punta está diseñada con tres puertos principales: uno para el sistema de conductos de entrada (disolvente) (tubo 111 o conducto 1), un puerto central para el suministro de gas (N_2 , CO_2 o aire) (tubo 112 o conducto 2) y un puerto de salida para transportar constituyentes moleculares en la gota de agua desde el tejido al espectrómetro de masas (tubo 113 o conducto 3). En la punta de la sonda, todos los puertos se combinan en un pequeño depósito donde se retiene la única gota y se expone a la muestra de tejido durante un período de tiempo controlado (3 s), lo que permite una extracción eficiente del analito. El diámetro del depósito determina el volumen de disolvente expuesto al tejido, así como la resolución espacial del dispositivo. Utilizando herramientas actuales, las puntas MasSpec Pen se diseñaron con tamaños de muestreo que oscilaban entre 1,5 mm y 5,0 mm, lo que está determinado por el diámetro del depósito. Con un diámetro de depósito de 2,77 mm, se retiene un volumen de disolvente de 10 μl en el depósito y se pone en contacto con la muestra de tejido durante un período de tiempo definido, mientras que se retienen 4,4 μl en un depósito con un diámetro de 1,5 mm. Después del período de extracción de 3 s, se retira el MasSpec Pen del tejido. Al mismo tiempo, se abre el conducto 3, lo que permite la extracción a vacío de la gota al espectrómetro de masas; se proporciona una presión positiva procedente de un suministro de gas a baja presión (<10 psi) a través del conducto 2, seguido de una etapa de lavado para limpiar el sistema. Téngase en cuenta que se evaluaron tiempos de contacto de 1 segundo, 3 segundos y 5 segundos entre la gota y la muestra de tejido (**FIG. 22**). Se seleccionó el tiempo de contacto de 3 segundos para todos los experimentos, ya que permitió un fácil manejo por parte del usuario y produjo espectros de masas con suficiente intensidad iónica total. El gas proporcionado por el segundo tubo no participa en el procedimiento de extracción, sino que se utiliza para evitar el colapso del sistema debido al vacío empleado y para ayudar al transporte del disolvente desde el tejido al espectrómetro de masas. De manera similar, la etapa de lavado no se utiliza para la extracción de biomoléculas de los tejidos ya que no hay contacto con el tejido durante este período. El conducto 3 está conectado directamente al tubo de transferencia de un espectrómetro de masas Orbitrap de alta resolución de masas de modo que la presión negativa del sistema de vacío del espectrómetro de masas impulsa el movimiento de la gota desde el depósito al espectrómetro de masas para la ionización y el análisis de masas. Esta configuración simplifica las etapas operativas e impide el uso de fuentes de ionización, aunque se podrían acoplar al sistema de los autores de la presente invención varios métodos de conexión e ionización. Se empleó una longitud de tubo de 1,5 metros para todos los conductos para permitir el uso manual del dispositivo por parte de un operario sin restricciones geométricas o espaciales.

Los tres tubos conductores utilizados están elaborados de politetrafluoroetileno (PTFE), que también es biológicamente compatible. El tubo 111 se utiliza para suministrar disolvente desde la bomba de jeringa hasta la punta de la sonda. El tubo 112 se utiliza, en algunos casos, para suministrar un gas inerte (N_2 o CO_2) a la punta de la sonda. El gas tiene tres propósitos principales: 1) secar el tejido antes del análisis; 2) impedir la separación de disolvente en el tubo 111 debido al vacío del espectrómetro de masas cuando se cierra el depósito al entrar en contacto con el espécimen de tejido; 2) ayudar al transporte de disolvente desde el tejido al espectrómetro de masas a través del tubo 113. Sin embargo, en algunas circunstancias no hay necesidad de utilizar un gas. El tubo 113 está conectado directamente a la entrada del espectrómetro de masas de modo que la presión positiva del sistema de vacío del espectrómetro de masas se utiliza para impulsar la gota desde el depósito hasta la entrada del espectrómetro de masas para su ionización.

Los eventos de tiempo involucrados en el manejo del dispositivo están automatizados y controlados con precisión mediante un soporte lógico que se comunica con un sistema Arduino y dos válvulas de pellizco de dos vías. Todas las válvulas de pellizco se cierran hasta que se inicia el procedimiento cuando: 1. Se envía un pulso a la bomba por debajo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$, para infundir el disolvente durante dos segundos y se detiene, generando una gota de 10 μL que llena el depósito de MasSpec Pen; 2. Se cierran los tubos 112 y 113, permitiendo que el disolvente del depósito interactúe con el tejido durante tres segundos para extraer las moléculas; 3. Las válvulas de pellizco que controlan los tubos 112 y 113 se abren simultáneamente, permitiendo que la gota se transfiera al espectrómetro de masas para su ionización y análisis molecular. 4. Se envía un pulso a la bomba para infundir el disolvente durante otros 12 segundos y se detiene, para conducir completamente todas las moléculas extraídas al espectrómetro de masas. 5. Se dejan abiertos los tubos 112 y 113 durante otros 20 segundos para permitir que todo el disolvente del tubo 113 entre en la espectrometría de masas. El tiempo total de análisis es de 37 segundos.

El diseño de la punta que utiliza tres tubos de conducción y válvulas de pellizco accionadas por alta velocidad permitió un control preciso del movimiento de las gotas y mostró un rendimiento y una robustez excelentes. Todo el procedimiento, desde el muestreo hasta la adquisición del espectro de masas, se completa en 10 segundos o menos y está completamente automatizado mediante un microcontrolador Arduino, de modo que cada adquisición y análisis

se activa individualmente mediante un clic de una sola etapa con un pedal. La automatización del sistema garantiza que cada gota de disolvente llegue por separado a la entrada, lo que produce varios espectros de masas que se promedian para obtener un perfil molecular final de la muestra. Adicionalmente, el suministro controlado de gotas permitió que el espectrómetro de masas funcionara sin ninguna degradación evidente del rendimiento. Después de cada uso, el MasSpec Pen se puede limpiar si se observan residuos mediante un lavado de limpieza rápido y automatizado o reemplazando la punta desecharable.

Ejemplo 2: Perfiles y análisis moleculares

El sistema descrito en el presente documento funciona conectando directamente el conducto de recolección a la entrada del espectrómetro de masas para transportar los disolventes que contienen analitos al espectrómetro de masas para el análisis molecular. Esta configuración simplifica enormemente los detalles operativos e impide el uso de fuentes de ionización. Después de que la sonda interactúa con el tejido, el disolvente se transporta al espectrómetro de masas y se infunde directamente sin necesidad de una fuente de ionización adicional. Dado que el sistema está completamente automatizado de modo que cada gota de disolvente de 10 µl se suministra por separado a la entrada, el espectrómetro de masas funciona sin ningún impacto en su rendimiento. De esta manera se obtiene rica información molecular, similar a lo que se observa en otras técnicas de ionización ambiental con extracción con disolventes, tales como la ionización por desorción con electropulverización. El mecanismo de ionización puede ser similar a la ionización de entrada. Para los métodos de ionización de entrada, la ionización se produce en la región de caída de presión de entrada entre la atmósfera y el vacío. En el dispositivo se pueden utilizar varios sistemas de disolventes. En este ejemplo, para garantizar la total compatibilidad biológica del dispositivo, se utilizó agua como único disolvente, aunque también se exploraron mezclas de etanol y agua en diferentes proporciones que arrojaron resultados similares. Para demostrarlo, estas muestras se analizaron después de la extracción con un disolvente compuesto por 5:1 y 20:1 (H_2O :EtOH) y se descubrió que el EtOH ayudará a extraer más lípidos PE, como PE (40:6) (m/z 790.539) y PE (38:4) (m/z 766.540) (véanse los resultados en la FIG. 3).

La eficacia del MasSpec Pen para obtener información molecular se probó analizando secciones finas de tejido y fragmentos de muestras de tejido. En primer lugar, se analizaron secciones de tejido de 16 µm de espesor en portaobjetos de vidrio histológico convencionales siguiendo las etapas operativas automatizadas descritas anteriormente para MasSpec Pen, utilizando agua pura como disolvente. Se probaron varias puntas de sonda con diferentes diámetros de depósito del MasSpec Pen, lo que produjo espectros de masas que presentan especies de lípidos características de materia gris, materia blanca o composición mixta del tejido cerebral de ratón para tamaños de muestreo más grandes. La FIG. 2 muestra un espectro de masas representativo obtenido en el modo de iones negativos utilizando la punta de un lápiz de 2,7 mm de la región de materia gris de una sección de tejido cerebral de ratón, y un espectro de masas de fondo representativo obtenido de una región de un portaobjetos de vidrio (sin muestra). Se probaron varios diámetros del MasSpec Pen, produciendo perfiles de espectros de masas similares con un recuento total de iones creciente observado para diámetros de punta de lápiz más grandes (FIG. 17).

La FIG. 2B muestra el cromatograma de iones totales obtenido durante el período total de análisis. A los 0,5 min (véase el recuadro en FIG. 2B), el espectro de masas de fondo se adquirió poniendo en contacto vidrio puro. Como se observa en el espectro de masas, se obtuvo una señal de fondo notablemente limpia en este rango de masas. A los 3,4 minutos (FIG. 2A), el MasSpec Pen se aplicó a una sección de tejido cerebral de ratón siguiendo los mismos procedimientos discutidos anteriormente. Sorprendentemente, se observaron ricos perfiles moleculares. Las señales de lípidos comúnmente detectadas mediante espectrometría de masas de ionización ambiental de tejidos biológicos se observaron a intensidades relativas altas en el espectro de masas en modo de iones negativos, incluidos ácidos grasos (FA), ceramidas (Cer), glicerofosfoinositoles (PI), glicerofosfoetanolaminas (PE), glicerofososerinas (PS) y lípidos esteroles (ST). También se observaron metabolitos endógenos primarios y secundarios en los espectros de masas. En el modo de iones positivos también se detectaron diacilgliceroles (DG), glicerofosfocolina (PC) y fosfoesfingolípidos (SM). Se utilizó un analizador de masa de polvo de alta resolución (el poder de resolución se estableció en 140.000) para identificar la mayoría de los lípidos en el espectro.

Los espectros de masas en modo de iones negativos obtenidos de la región de materia gris de la sección de tejido cerebral de ratón presentaron una rica información molecular que incluía una variedad de iones correspondientes a aductos desprotonados o de cloruro de especies lipídicas comúnmente detectadas en tejidos biológicos utilizando técnicas de EM de ionización ambiental basadas en disolventes. Los picos con abundancias relativas altas se identificaron como ácidos grasos (GA) de m/z 120-350, esfingolípidos tales como los sulfátidos de m/z 700-1100 y aductos de cloruro de ceramidas (Cer) de m/z 500-700, y glicerofosfolípidos (GL) tales como glicerofosfoinositoles (PI), glicerofosfoetanolaminas (PE), glicerofososerinas (PS) y cardiolipinas doblemente cargadas (CL) de m/z 700-1100. En el rango de masa más alto de m/z 1100-1800, se observaron dímeros GL y CL con carga simple. Se detectaron una variedad de picos identificados provisionalmente como pequeños metabolitos que incluyen glutamina en m/z 145.061, glutamato en m/z 146.045, ácido N-acetilaspártico en m/z 174.041 y aducto de cloruro de hexosa en m/z 215.033 en un rango de masa más bajo de m/z 120 - 250, basado en mediciones de alta precisión de masa y datos de espectrometría de masas en tandem (Tabla 1). Es importante destacar que los espectros de masas en modo de iones negativos obtenidos de la materia gris de diferentes secciones de tejido del mismo cerebro de ratón fueron reproducibles (RSD=9,3%, n=9), comparables a lo informado utilizando el mismo método para DESI-MSI (RSD= 8,0%, n=5). En el modo de iones positivos, los espectros de masas obtenidos presentaron altas abundancias relativas de especies moleculares comúnmente observadas identificadas como diacilgliceroles (DG), PE y glicerofosfocolina (PC)

(FIG. 18). Se realizaron asignaciones provisionales utilizando mediciones de alta precisión de masa, así como análisis de MS en tandem cuando se logró la intensidad adecuada de los iones de fragmentos para la interpretación estructural. Se describen errores de masa y m/z de iones fragmentados obtenidos mediante experimentos de MS en tandem para todas las especies identificadas a lo largo del manuscrito en las Tablas 1, 2, 3, 4 y 5. Téngase en cuenta que la isomería de los dobles enlaces en las cadenas FA de lípidos complejos complica la asignación estructural precisa, que es la causa de que las cadenas de FA se asigne provisionalmente a las especies de lípidos (Dill et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 12, 2011).

El espectro de MasSpec Pen se comparó con el espectro DESI que se adquirió con parámetros de MS similares, pero utilizando el sistema disolvente de acetonitrilo y dimetilformamida comúnmente aplicado debido a su alta eficiencia para extraer lípidos del tejido biológico. Curiosamente, en el modo de iones negativos, el espectro de MasSpec Pen que utiliza agua como disolvente de extracción comparte una gran cantidad de especies moleculares de m/z 500 a m/z 1800 utilizando el espectro de DESI ACN y DMF, con razones ligeramente mayores de lípidos PE, tales como PE (40:6) (m/z 790.539) y PE (38:4) (m/z 766.539). Las **FIGS. 6A-B** muestran que PI (38:4) (m/z 885.550) y PS (38:6) (m/z 834.529) fueron los picos dominantes tanto en los espectros de MasSpec Pen como en DESI. Por otra parte, en los espectros, se presenció un grupo de iones con mayor m/z en el rango de masas de m/z 1500 a m/z 1600, que fueron asignados provisionalmente como cardiolipinas (CL) con carga única y/o dímeros de glicerofosfolípidos.

Un análisis adicional comparó las especies moleculares detectadas en el modo de iones negativos con las observadas en un espectro de masas DESI adquirido de una sección de tejido en serie del mismo cerebro de ratón utilizando agua como disolvente y condiciones experimentales análogas. Los espectros de masas obtenidos utilizando MasSpec Pen y DESI fueron similares con una similitud de coseno calculada de 0,9, compartiendo una gran cantidad de especies moleculares en abundancias relativas y razones señal-ruido (S/N) comparables (**FIG. 6C**). También se exploraron otros sistemas disolventes, incluidas mezclas de agua con etanol en diversas proporciones, como sistemas disolventes para MasSpec Pen. Los espectros de masas obtenidos presentaron especies lipídicas similares a las observadas en los espectros de masas obtenidos con agua pura, con variaciones en sus abundancias relativas (**FIG. 3B**). Por lo tanto, para garantizar la biocompatibilidad total del dispositivo, se seleccionó agua como disolvente para todos los siguientes experimentos realizados con MasSpec Pen.

Para evaluar el rendimiento del sistema, se realizaron análisis consecutivos en la misma sección de tejido y en diferentes secciones de tejido y se demostró que el sistema es altamente reproducible dentro de muestras y entre diferentes muestras.

30 Análisis Molecular de Secciones de Tejidos de Cáncer Humano y Normales. La espectrometría de masas por ionización ambiental se ha investigado ampliamente para el diagnóstico molecular de tejidos cancerosos humanos. Para probar la capacidad del sistema MasSpec Pen descrito en el presente documento para diferenciar muestras normales y tumorales, se analizaron 62 muestras de tejido humano de cinco tipos de tejido diferentes, incluidos mama, riñón, ganglios linfáticos, tiroides y ovario. Los espectros de masas obtenidos en el modo de iones negativos utilizando agua como sistema disolvente para cada tipo de tejido mostraron iones moleculares comúnmente observados por DESI-MS, con altas abundancias relativas de metabolitos y lípidos. Se empleó el análisis de componentes principales (PCA) para evaluar estadísticamente el rendimiento de MasSpec Pen en análisis interespecíficos e intraespecíficos de especímenes humanos. Cabe señalar que en el presente trabajo se utilizan los primeros tres componentes, que abarcaron más de 85% de la varianza total. Como se puede observar en las **FIGS. 9A-B**, los tejidos normales de tiroides y riñón se discriminaron bien de los tumorales. Sorprendentemente, durante el análisis de secciones de tejido humano en modo de iones negativos, se detectaron una serie de especies con carga múltiple que se identificaron como timosina β -4 mediante mediciones de alta precisión de masa y análisis de espectrometría de masas en tandem (**FIG. 7**). Los espectros representativos de cada espécimen se muestran en la **FIG. 5**. Sorprendentemente, los perfiles moleculares obtenidos de tejidos de tiroides normal y canceroso humano muestran patrones moleculares distintos que son diagnósticos del estado de patológico. Se obtuvieron resultados similares para todos los demás tejidos cancerosos analizados.

Se probó la capacidad del MasSpec Pen para analizar 20 secciones delgadas de tejido de mama humana normal y tumoral ($n=5$ mama normal, $n=5$ carcinoma ductal de mama) y tiroides ($n=5$ tiroides normal, $n=4$ carcinoma papilar de tiroides, y $n = 1$ adenoma folicular de tiroides). Los espectros de masas obtenidos en el modo de iones negativos para cada tipo de tejido presentaron una rica variedad de iones moleculares comúnmente observados en tejidos humanos mediante DESI-MSI, con altas abundancias relativas de metabolitos, ácidos grasos y lípidos complejos. Por ejemplo, los espectros de masas obtenidos para secciones de tejido del carcinoma papilar de tiroides presentaron especies de lípidos previamente identificadas como marcadores de diagnóstico mediante DESI-MSI (Zhang et al., *Cancer Research*, 76, 2016), incluida una variedad de CL doblemente cargado y otros glicerofosfolípidos tales como PI (38:4) (m/z 885.550), PI (36:4) (m/z 857.518), PE (38:4) (m/z 766.539) y PE (36:2) (m/z 742.539) (**Tabla 2**). Se obtuvo un perfil espectral de masas distinto para la sección de tejido tiroideo normal, presentando altas abundancias relativas de m/z 126.904, identificado como yodo, m/z 145.050, identificado como glutamina, m/z 175.024, identificado como ácido ascórbico, m/z 822.472, asignado provisionalmente a C36H78O9N3I, y m/z 885.551, identificado como PI (38:4) (**FIG. 8B**). Curiosamente, se detectó una serie de iones moleculares con carga múltiple en diferentes estados de carga (z), incluidos m/z 991.091 ($z=-5$), m/z 1239.113 ($z=-4$) y m/z 1652.484 ($z=-3$) en los espectros de masas obtenidos de todas las secciones de tejido analizadas. Estos iones se identificaron provisionalmente como diferentes estados de carga de la proteína timosina β -4 basándose en mediciones de alta precisión de masa (**FIG. 7 y Tabla 1**). En particular,

el análisis de componentes principales (PCA) realizado en los datos obtenidos de las secciones de tejido humano analizadas mostró una separación entre los tejidos tumorales y normales (**FIG. 9**).

Análisis molecular de muestras de tejido reciente. El dispositivo MasSpec Pen fue diseñado para funcionar con muestras de tejido reciente independientemente de la morfología. Para probar el dispositivo para el análisis de tejido reciente, al principio se utilizó tejido cerebral de ratón reciente. No se observaron diferencias significativas en los espectros obtenidos de secciones de tejido cerebral de ratón o de tejidos cerebrales recientes. Las **FIGs. 4A-4B** muestran un patrón espectrométrico de masas casi idéntico a partir de secciones de tejido y tejido reciente de cerebro de ratón, lo que ilustra que el procedimiento de extracción de MasSpec Pen funciona de manera similar para diferentes etapas de preparación de muestras. A continuación, se analizaron más a fondo dos tipos de especímenes humanos recientes: la glándula tiroides y los ganglios linfáticos. Los espectros de muestras de tejido reciente de tiroides normal y canceroso se mostraron en la **FIG. 8**.

Cabe señalar que todos los especímenes congelados que se obtuvieron de bancos de tejidos se conservaron bien a -80 °C en el congelador y se descongelaron a temperatura ambiente antes de su uso. Los datos recopilados de especímenes humanos recientes también se procesaron mediante PCA. El PCA de los espectros registrados muestra una clara distinción entre las muestras normales y tumorales (**FIGs. 10A-10B**). Por lo tanto, se establece que MasSpec Pen podría emplearse para diferenciar muestras recientes normales y enfermas. Cabe señalar que no se observaron daños en el tejido debido al procedimiento de muestreo.

Tabla 1: Datos obtenidos para la identificación de iones moleculares en modo de ion negativo seleccionados de tejido cerebral de ratón.

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	m/z medido	m/z teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmento principales en MS/MS ^a
timosina β-4		$C_{212}H_{350}N_{56}O_{78}S_1$	991,091 (-5)	991,090 (-5)	<1 (-5)	N/A
			1239,113 (-4)	1239,114 (-4)	<1 (-4)	
			1652,484 (-3)	1652,488 (-3)	2,4 (-3)	
ST	t42:1	$C_{48}H_{92}NO_{12}S$	906,634	906,635	-1,1	N/A
PI	38:4	$C_{47}H_{82}O_{13}P$	885,550	885,550	<1	152,995, 241,011, 283,264, 303,233, 419,257, 581,309
PS	40:6	$C_{46}H_{77}NO_{10}P$	834,529	834,529	<1	152,994, 283,264, 327,233, 419,256, 437,267, 747,497
PE	40:6	$C_{45}H_{77}NO_8P$	790,539	790,539	<1	283,243, 283,264, 327,232, 480,309
	38:4	$C_{43}H_{77}NO_8P$	766,539	766,539	0	259,243, 283,263, 303,232, 480,309
	P-38:6	$C_{43}H_{73}NO_7P$	746,513	746,513	<1	283,243, 327,232, 436,282
	O-36:3	$C_{41}H_{71}NO_7P$	726,545	726,544	1,4	140,010, 152,994, 281,248, 444,288, 462,299
	P-36:4	$C_{41}H_{73}NO_7P$	722,513	722,513	<1	152,994, 259,243, 303,233, 418,273, 436,283
Cer	36:1	$C_{36}H_{71}NO_3Cl$	600,513	600,513	<1	N/A
FA	22:6	$C_{22}H_{31}O_2$	327,233	327,233	<1	229,195, 283,243, 309,174
	20:4	$C_{20}H_{31}O_2$	303,233	303,233	<1	205,195, 259,243, 284,991
	18:0	$C_{18}H_{35}O_2$	283,264	283,264	<1	265,130

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmento principales en MS/MS ^a
	16:0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255,233	255,233	<1	237,043
Ácido N-acetilaspártico		C ₆ H ₈ NO ₅	174,040	174,041	-5,7	58,028, 88,039, 130,049
hexosa		C ₆ H ₁₂ O ₆ Cl	215,033	215,034	-4,7	N/A
glutamato		C ₅ H ₈ NO ₄	146,045	146,046	-6,8	102,054, 128,034
Glutamina		C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145,061	145,062	-6,9	127,050, 128,034

^a NA (no disponible) significa que solo se utilizó una alta precisión de masa para la identificación provisional de iones,

Tabla 2. Datos obtenidos para la identificación de iones moleculares en modo de ion negativo seleccionados de tejido tiroideo humano.

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmento principales en MS/MS ^a
PI	40:5	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₃ P	911,566	911,566	<1	N/A
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885,550	885,550	<1	152,994, 223,006, 241,011, 283,264, 303,233, 419,256, 581,310
	36:4	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₃ P	857,518	857,518	<1	152,994, 241,011, 279,233, 415,226, 577,278
	34:1	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₃ P	835,534	835,534	<1	152,994, 241,011, 255,232, 391,226, 553,277
PE	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766,539	766,539	<1	140,010, 152,995, 259,243, 283,264, 303,233, 480,309
	36:2	C ₄₁ H ₇₇ NO ₈ P	742,539	742,540	-1,3	140,010, 152,994, 281,248
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722,513	722,513	<1	140,010, 196,037, 259,243, 303,233, 418,270, 436,283
CL	74:7	C ₈₃ H ₁₄₆ O ₁₇ P ₂	738,502	738,502	<1	N/A
	72:8	C ₈₁ H ₁₄₀ O ₁₇ P ₂	723,479	723,479	<1	N/A
Cer	34:1	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ Cl	572,481	572,482	-1,7	N/A
FA	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303,233	303,233	<1	205,195, 259,243, 284,992
	18:0	C ₁₈ H ₃₅ O ₂	283,265	283,264	3,5	265,130
	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281,250	281,249	3,6	N/A

ES 2 971 214 T3

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	m/z medido	m/z teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmento principales en MS/MS ^a
	18:2	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	279,234	279,233	3,6	261,222
	16:0	C ₁₈ H ₃₁ O ₂	255,233	255,233	<1	N/A
Ácido ascórbico		C ₆ H ₇ O ₆	175,024	175,025	-5,7	87,007, 115,002
Glutamina		C ₅ H ₉ N ₂ O ₃	145,050	145.062	-8,3	N/A
I-			126,904	126.905	-7,9	N/A

^a NA (no disponible) significa que solo se utilizó una alta precisión de masa para la identificación provisional de iones.

Tabla 3. Datos obtenidos para la identificación de iones moleculares en modo ion negativo seleccionados de tejido ovárico humano.

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	m/z medido	m/z teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmentos principales en MS/MS ^a
PI	40:4	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₃ P	913,581	913,581	<1	223,000, 241,011, 283,264, 331,264, 419,257, 581,309
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885,549	885,550	-1,1	152,994, 223,000, 241,011, 283,264, 303,233, 419,256, 439,225, 581,309
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863,565	863,566	-1,2	152,995, 241,011, 281,248, 283,264, 419,256
	34:1	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	835,534	835,534	<1	152,994, 223,000, 241,011, 255,233, 281,248, 391,225, 553,278
PS	38:3	C ₄₄ H ₇₉ NO ₁₀ P	812,544	812,545	-1,2	152,994, 283,264, 305,248, 419,256, 437,266, 725,514
	36:1	C ₄₂ H ₇₉ NO ₁₀ P	788,545	788,545	<1	281,248, 283,264, 417,242, 419,256, 437,268, 701,512
PE	38:4	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₃ P	766,539	766,539	<1	259,243, 283,264, 303,233, 480,309
	O-38:5	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750,544	750,544	<1	259,243, 303,233, 446,303, 464,313
	P-35:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722,512	722,513	-1,4	259,243, 303,233, 418,273, 436,283
FA	16:0	C ₁₆ H ₃₁ O ₂	255,232	255,233	-3,9	N/A

ES 2 971 214 T3

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmentos principales en MS/MS ^a
Ácido ascórbico		C ₆ H ₇ O ₆	175,024	175,024	<1	87,007, 115,002

^a NA (no disponible) significa que solo se utilizó una alta precisión de masa para la identificación provisional de iones.

Tabla 4. Datos obtenidos para la identificación de iones moleculares en modo de ion negativo seleccionados de tejido pulmonar humano.

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmento principales en MS/MS ^a
PI	40:4	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₃ P	913,580	913,581	-1,1	152,994, 223,000, 241,010, 283,264, 331,264, 419,256, 581,311
	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885,550	885,550	<1	152,994, 223,000, 241,011,
						283,264, 303,233, 419,256, 581,311
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863,565	863,566	-1,2	152,994, 241,011, 281,248, 283,264, 419,256, 581,311
	36:2	C ₄₅ H ₈₂ O ₁₃ P	861,548	861,549	-1,2	152,994, 223,000, 241,011, 281,256, 417,241
PG	36:2	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773,542	773,534	10	152,994, 281,256, 417,241, 491,278, 509,288
	34:1	C ₄₀ H ₇₆ O ₁₀ P	747,514	747,517	-4,0	152,994, 255,233, 281,256, 391,226, 417,241, 491,277
PE	38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₈ P	766,535	766,539	-5,2	140,010, 283,256, 303,233, 480,309,
	36:1	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744,552	744,555	-4,0	140,011, 281,256, 283,264, 480,307
	P-38:4	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750,534	750,544	-13	259,243, 303,233, 464,314
	P-36:4	C ₄₁ H ₇₃ NO ₇ P	722,511	722,513	-2,8	259,243, 303,233, 418,273, 436,283
	O-34:2	C ₃₉ H ₇₅ NO ₇ P	700,527	700,529	-2,9	N/A
Cer	34:1	C ₃₄ H ₆₇ NO ₃ Cl	572,479	572,482	-5,2	N/A
FA	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281,249	281,249	<1	N/A
Ácido ascórbico		C ₆ H ₇ O ₆	175,023	175,024	-5,7	115,002

Identificación propuesta	Fórmula propuesta	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmento principales en MS/MS ^a
^a NA (no disponible) significa que solo se utilizó una alta precisión de masa para la identificación provisional de iones.					

Tabla 5. Datos obtenidos para la identificación de iones moleculares en modo de ion negativo seleccionados de tejido mamario humano.

Identificación propuesta		Fórmula propuesta	<i>m/z</i> medido	<i>m/z</i> teórico	Error de masa (ppm)	Iones fragmentos principales en MS/MS ^a
PI	38:4	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₃ P	885,550	885,550	<1	152,994, 223,000, 241,011, 283,264, 303,233, 419,257, 581,310, 599,319
	36:1	C ₄₅ H ₈₄ O ₁₃ P	863,565	863,566	-1,2	152,994, 223,000, 241,011, 281,248, 283,264, 419,256, 581,309
PG	36:2	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₀ P	773,542	773,534	10	152,994, 281,248, 417,240, 491,276
FA	20:4	C ₂₀ H ₃₁ O ₂	303,233	303,233	<1	205,195, 259,243, 284,991
	18:1	C ₁₈ H ₃₃ O ₂	281,249	281,249	<1	N/A

^a NA (no disponible) significa que solo se utilizó una alta precisión de masa para la identificación provisional de iones.

Tabla 6. Datos demográficos de los pacientes de las 253 muestras de tejido humano utilizadas en este estudio.

Diagnóstico del paciente		Edad media, años	Rango de edad, años	Número de pacientes por sexo (masculino, femenino)	Número de pacientes por raza (blanca, negra, asiática, desconocida)
Mama	Normal	47	24-76	(0, 29)	(21, 7, 1, 0)
	Cáncer	58	41-75	(2, 14)	(10, 2, 4, 0)
Pulmón	Normal	57	12-82	(33, 14)	(35, 12, 0, 0)
	Cáncer	66	22-84	(25, 23)	(35, 7, 0, 6)
Ovario	Normal	50	31-80	(0, 29)	(22, 7, 0, 0)
	Cáncer	62	30-83	(0, 28)	(25, 2, 0, 1)
Tiroídes	Normal	40	18-80	(10, 17)	(18, 7, 0, 2)
	Tumor	49	16-81	(12, 17)	(21, 4, 0, 4)

Materiales y métodos.

Espectrómetro de masas. Se utilizó el espectrómetro de masas Q Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (Thermo Scientific, San José, CA). Se realizó un escaneo completo en el rango de *m/z* 120-1800, y los otros parámetros espectrométricos de masas se enumeraron como sigue: poder de resolución 140.000, micro escaneo 2, tiempo máximo de inyección 300 ms, temperatura capilar 350 °C y nivel de RF de lente S 100.

Tejidos biológicos. Se adquirieron cerebros de ratón de tipo salvaje de Bioreclamation IVT. Se obtuvieron 62 muestras de tejido humano congeladas, incluidas mama, tiroides, ganglios linfáticos, ovario y riñón, de Cooperative Human Tissue Network y Baylor College Tissue Bank. Las muestras se almacenaron en un congelador a -80 °C. Los portaobjetos de tejido se seccionaron a 16 µm utilizando un Criostato CryoStar™ NX50. El espécimen de tejido congelado se descongeló a temperatura ambiente antes de su uso.

Análisis estadístico. Se utilizó IBM SPSS Statistics 22.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EE. UU.) para realizar un análisis de componentes principales (PCA) para revelar patrones en los datos. El análisis se realizó directamente utilizando los datos brutos. Los 10 picos de las intensidades relativas máximas en el rango m/z de 700-900 se utilizaron un para PCA. Típicamente, en los presentes resultados se utilizan los primeros tres componentes, que abarcaron más de 85% de la varianza total.

Ejemplo 3: Automatización del sistema para uso portátil y laparoscópico

Debido a que todos los materiales (PDMS y PTFE) y el disolvente (solo agua) utilizados en el diseño de MassSpec Pen son biológicamente compatibles, el sistema tiene un alto potencial para utilizarse en cirugía de forma portátil para análisis en tiempo real. Más que eso, debido a las pequeñas dimensiones del dispositivo, incluso puede integrarse en un sistema quirúrgico robótico, tal como el sistema quirúrgico Da Vinci a través de un puerto accesorio o uno de sus brazos robóticos. Se pueden tomar muestras rápidamente de varias regiones de la cavidad del cuerpo humano durante la cirugía y analizarlas utilizando una base de datos de firmas moleculares y algoritmos de aprendizaje automático. Por lo tanto, los resultados del diagnóstico pueden proporcionarse en tiempo real para cada región muestreada. Este sistema se puede utilizar ampliamente en una amplia variedad de intervenciones oncológicas y otras intervenciones quirúrgicas (tales como endometriosis) para las que se necesitan la caracterización y el diagnóstico de los tejidos en tiempo real.

Ejemplo 4: Análisis predictivo de muestras de tejido

El diseño MassSpec Pen se utilizó para analizar muestras de tejido de pacientes con cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de ovario o cáncer de tiroides junto con muestras de tejido normal. Antes de analizar estas muestras, las muestras se procesaron redondeando la razón masa-carga (m/z) al 0,01 más cercano y normalizando el cromatograma de iones totales (TIC). También se eliminaron todos los picos de m/z del fondo y aquellos picos que aparecieron en menos de 10% de las muestras de pacientes. En el análisis se utilizó todo el rango de masas. El clasificador entrenado fue un modelo de regresión logística de Lasso. Para las muestras de tejido en las que se estaba analizando la presencia de cáncer, los resultados de rendimiento general para todos los clasificadores se muestran en la Tabla 7. Los resultados generales tienen una precisión de 96,3%, una sensibilidad de 96,4% y una especificidad de 96,2%.

Tabla 7: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera de todo normal frente a todo cáncer*

		Pronosticado	
		Normal	Cáncer
Verdadero	Normal	127	5
	Cáncer	4	106

*sin incluir tiroides benigno

- Para las muestras de tejido en las que se estaba analizando la presencia de cáncer de pulmón, la Tabla 8 muestra los valores de masa a carga (m/z) utilizados en la diferenciación de las muestras de tejido junto con el coeficiente asociado para ese valor particular.

Tabla 8: Valores de masa a carga (*m/z*) de cáncer de pulmón y coeficientes para pulmón normal frente a cáncer de pulmón

<i>m/z</i>	Coeficiente
175,02	32,51042
187,01	492,94937
201,04	324,19856
215,03	-134,54101
313,16	-711,31964
330,98	31,73486
332,90	-49,54229
357,10	-903,32504
409,23	218,36836
615,17	-418,02900
722,51	42,39442
744,55	780,14488
747,52	-248,52283
748,52	-494,98929
771,52	6,80739
773,53	-292,30917
863,57	-722,21921
885,55	703,46083
886,55	8,82125

La Tabla 9 muestra la tasa de análisis y la clasificación de cada muestra con la determinación verdadera (histológica) en filas y el valor pronosticado en las columnas. De las muestras de tejido canceroso, las muestras se identificaron con una precisión de 96,8%, una sensibilidad de 97,9%, una especificidad de 95,7% y AUC de 0,97.

Tabla 9: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera de cáncer de pulmón

		Pronosticado		Prop. correcta
		Normal	Cáncer	
Verdadero	Normal	45	2	0,957
	Cáncer	1	47	0,979

Se realizó un análisis similar para muestras de pulmón normal frente a muestras de adenocarcinoma como se muestra en la Tabla 10 y la Tabla 11. Las muestras se identificaron con una precisión de 92,2%, una sensibilidad de 88,2%, una especificidad de 93,6% y AUC de 0,98.

5

Tabla 10: Valores de masa a carga (*m/z*) de cáncer de pulmón y coeficientes para pulmón normal frente a adenocarcinoma

<i>m/z</i>	Coeficiente
175,02	78,79492
201,04	113,95819
747,52	-134,59620
773,53	-17,30482
885,55	205,16262

Tabla 11: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera de carcinoma de células escamosas de pulmón

		Pronosticado		
		Normal	Cáncer	Prop. correcta
Verdadero	Normal	44	3	0,936
	Cáncer	2	15	0,882

Se realizó un análisis similar para muestras de pulmón normal frente a muestras escamosas como se muestra en la Tabla 12 y la Tabla 13. Las muestras se identificaron con una precisión de 93,8%, una sensibilidad de 88,2%, una especificidad de 95,7% y AUC de 0,93.

10

15

Tabla 12: Valores de masa a carga (*m/z*) para cáncer de pulmón y coeficientes para pulmón normal frente a cáncer de pulmón de células escamosas

<i>m/z</i>	Coeficiente
201,04	203,209288
306,08	2,171805
747,52	-83,325218
773,53	-101,591552
861,55	-22,995934
885,55	248,475559

Tabla 13: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera para cáncer de pulmón

		Pronosticado		
		Normal	Cáncer	Prop. correcta
Verdadero	Normal	45	2	0,957
	Cáncer	2	15	0,882

De manera similar al análisis realizado para el cáncer de pulmón descrito anteriormente, se realizó un análisis similar con el cáncer de ovario, tiroides y mama y mostrando los respectivos picos de *m/z* y coeficientes para cada conjunto de muestras.

Se detectaron muestras de cáncer de ovario con una precisión de 94,7%, una sensibilidad de 100%, una especificidad de 89,7% y AUC de 0,98. Las muestras de cáncer de tiroides se detectaron con una precisión de 94,7%,

una sensibilidad de 90,9%, una especificidad de 96,3% y AUC de 0,93. Finalmente, las muestras de cáncer de mama

se detectaron con una precisión de 95,6%, una sensibilidad de 87,5%, una especificidad de 100% y AUC de 1,00.

Tabla 14: Valores de masa a carga (*m/z*) para cáncer de ovario y coeficientes

<i>m/z</i>	Coeficiente
124,01	-0,39418349
175,02	-0,44099907
175,03	-0,65091248
283,27	-0,19534503
313,16	0,13896620
341,27	-0,01845538

ES 2 971 214 T3

Tabla 15: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera para cáncer de ovario

		Pronosticado		
		Normal	Cáncer	Prop. correcta
Normal		26	3	0,897
Cáncer		0	28	1,000

Tabla 16: Valores de masa a carga (*m/z*) de cáncer de tiroides y coeficientes para tiroides normal frente a tumor benigno

<i>m/z</i>	Coeficiente
175,02	0,050122579
191,02	-0,009462112
191,05	-0,354060964
283,27	-0,471995496
341,27	-0,151684619
615,17	-0,208451792
822,47	-1,009896669
822,48	-1,045185471

Tabla 17: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera para tiroides normal frente a tumor benigno

		Pronosticado		
		Normal	Cáncer	Prop. correcta
Verdadero	Normal	26	1	0,963
	Cáncer	1	10	0,909

ES 2 971 214 T3

Tabla 18: Valores de masa a carga (*m/z*) de cáncer de tiroides y coeficientes para tiroides normal frente a tumor maligno

<i>m/z</i>	Coeficiente
175,02	-0,13520642
283,27	-0,41455282
341,27	-0,16730814
353,16	-0,06014487
432,20	-0,31647335
433,21	-0,07291166
615,17	-0,61749889
822,47	-0,53746679
822,48	-1,04230818

Tabla 19: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera para tiroides normal frente a tumor benigno

		Pronosticado		
		Normal	Cáncer	Prop. correcta
Verdadero	Normal	26	1	0,963
	Cáncer	1	10	0,909

Tabla 20: Valores de masa a carga (*m/z*) de cáncer de tiroides y coeficientes para mama normal frente a cáncer de mama

<i>m/z</i>	Coeficiente
187,04	476,70006
268,80	-190,32304
279,92	79,49933
283,27	-31,45926
341,27	-11,77054
345,16	-154,78978
381,21	-68,13689

<i>m/z</i>	Coeficiente
687,51	-39,13906
742,54	1771,27018
766,54	1663,80192

Tabla 21: Predicción de muestras de tejido en relación con la determinación verdadera para mama normal frente a cáncer de mama

		Pronosticado		
		Normal	Cáncer	Prop. correcta
Verdadero	Normal	29	0	1,000
	Cáncer	2	14	0,875

Ejemplo 5: Resolución espacial del sistema MasSpec Pen

Se probó la resolución espacial del sistema MasSpec Pen y se determinó que se podía determinar una resolución espacial más alta utilizando un punto específico. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando materia blanca frente a materia gris en el cerebro de un ratón. En las FIGs. 11A-11E se muestra la porción del cerebro probada con el tamaño particular del punto. En particular, el Punto de muestra 1 indica que el punto estaba compuesto principalmente de materia gris.

Ejemplo 6: Análisis molecular no destructivo de muestras de tejido

El MasSpec Pen fue diseñado para funcionar directamente sobre especímenes de tejido independientemente de la rigidez y morfología del tejido. El rendimiento del MasSpec Pen se probó para analizar muestras de tejido blando (0,1 - 5 g) de diferentes órganos, incluidos cerebro de ratón y tejidos humanos de mama, tiroides, pulmón y ovario. Los análisis de tejidos se realizaron en condiciones ambientales mediante un experimento simple de una sola etapa, siguiendo las mismas etapas operativas automatizadas descritas anteriormente. La punta del MasSpec Pen se puso en contacto suavemente con la superficie de la muestra de tejido durante un período de 3 segundos mientras se realizaba la extracción. Los espectros de masas obtenidos para una región de materia gris del cerebro de ratón fueron reproducibles ($RSD = 4,6\%$, $n=10$) y muy similares a los espectros de masas de la sección de tejido cerebral de ratón (similitud de coseno de 0,93) (FIG. 4), lo que indica que el procedimiento de extracción en la superficie del tejido ocurre eficientemente independientemente de la forma y rigidez del tejido. De manera similar, los análisis de MasSpec Pen de muestras de tejido humano proporcionaron información molecular rica, especialmente de tejidos compuestos de células epiteliales y cancerosas. Los especímenes de tejido no canceroso que estaban compuestos principalmente de tejido conectivo blando, tal como estroma, proporcionaron perfiles espectrales de masas menos abundantes. En particular, muchas de las muestras de tejido de cáncer de mama normal analizadas presentaron contenido de grasa, que es inmiscible con agua y, por lo tanto, produjeron recuentos de iones totales menos abundantes en los espectros de masas en comparación con los tejidos de cáncer de mama o las glándulas de mama normales.

La inspección visual y microscópica de todas las muestras de tejido después del análisis con MasSpec Pen no reveló daños detectables en la morfología de la muestra de tejido en la región sondeada. La Fig. 15 muestra imágenes ópticas obtenidas de una muestra de tejido pulmonar antes, durante y después del análisis con MasSpec Pen. No se detectaron daños observables en el tejido en la región analizada, mientras que se obtuvieron perfiles de espectros de masas ricos (FIG. 15). Téngase en cuenta que las etapas operativas automatizadas y controladas por tiempo del MasSpec Pen evitan daños al tejido, ya que el tejido solo está expuesto a la pequeña gota de agua y no al vacío utilizado para transportar la gota desde el depósito al espectrómetro de masas. Por lo tanto, estos resultados proporcionan evidencia de que MasSpec Pen es un enfoque no destructivo para obtener información molecular rica a partir de muestras de tejido.

Ejemplo 7 - Diagnóstico molecular y predicción estadística de cáncer en tejidos humanos

A continuación, se evaluó si la información molecular obtenida de muestras de tejido humano utilizando MassSpec Pen era diagnóstica y predictiva del estado patológico. Se tomaron un total de 253 especímenes de tejido humano utilizando

5 MasSpec Pen, incluidas 95 muestras de pulmón (47 muestras normales y 48 de cáncer, incluidos 17 de adenocarcinoma, 17 de carcinoma de células escamosas y 14 muestras de cáncer de otros subtipos histológicos), 57 muestras de ovario (29 normales y 28 HGSC), 57 muestras de tiroides (27 normales, 11 adenoma de tiroides folicular y 18 de carcinoma papilar de tiroides) y 45 muestras de mama (29 normales y 16 de carcinoma ductal) (FIG. 11). La información demográfica de los pacientes se proporciona en la **Tabla 6**. Después del análisis con MasSpec Pen, la 10 región analizada fue demarcada y registrada a través de una serie de imágenes ópticas. A continuación, se congelaron piezas paralelas de las muestras, se seccionaron en la región demarcada, se tiñeron con HE y se evaluaron mediante 15 histopatología para obtener un diagnóstico. Para construir bases de datos moleculares solo se utilizaron muestras con una composición celular predominante y un diagnóstico claro. Los espectros de masas histológicamente validados obtenidos para las muestras cancerosas presentaron especies moleculares identificadas como varios lípidos y metabolitos previamente descritos como marcadores potenciales de enfermedades utilizando técnicas de MS de ionización ambiental. Para el tejido de cáncer de pulmón, se observaron marcadores moleculares característicos tales 20 como m/z 863,565, identificado como PI (36:1), m/z 773,542, identificado como PG (36:2), m/z 747,514, identificado como PG (34:1), y ácidos grasos como m/z 281,249, identificado como FA (18:1) (**FIG. 15 y Tabla 4**). Para pulmón normal, se observaron m/z 885,550, identificado como PI (38:4), y m/z 744,552, identificado como PE (36:1). Los 25 espectros de masas obtenidos para el tejido de cáncer de mama presentaron marcadores lipídicos de diagnóstico previamente descritos por DESI-MSI (29, 30), incluido m/z 885,550, identificado como PI (38:4), m/z 863,565, identificado como PI (36:1), m/z 773,542, identificado como PG (36:2), y varios FA tales como m/z 303,233, identificado como FA (20:4), y m/z 281,249, identificado como FA (18:1) (**Tabla 5**). El PCA realizado con los datos obtenidos para las 30 253 muestras de tejido humano analizadas mostró una separación entre el cáncer y los tejidos normales para cada órgano (**FIG. 11**).

25 Para evaluar si las firmas moleculares de MasSpec Pen pronostican el cáncer y los tejidos normales, se aplicó el método Lasso para construir modelos de clasificación utilizando la base de datos de espectros de masas validada histológicamente. El rendimiento del modelo se evaluó mediante un enfoque de validación cruzada en donde se excluye a un paciente y se midió mediante la sensibilidad y especificidad para el cáncer, así como la precisión y el AUC (**Tabla 22**). Para el cáncer de mama (n=45), 87,5% de sensibilidad, 100% de especificidad (AUC = 1,0), se logró una precisión general de 95,6%, que es comparable a los resultados notificados utilizando DESI-MSI (98,2% de precisión, n = 126) (Guenther et al., *Cancer Research*, 75, 2015)), el iKnife (95,5% de precisión, n=10) (Balog et al., *Science Translational Medicine*, 5, 2013), y generación de imágenes por MALDI de lípidos y proteínas (94,1% de precisión, n = 68) (31). Para HGSC (n=57), se logró una sensibilidad de 100%, una especificidad de 89,7% y una precisión de 94,7% (AUC = 0,98), lo que también es similar a los resultados de clasificación obtenidos por DESI-MSI (precisión de 97,1%, n=31) (Sans et al., *Cancer Research*, 2017). Para el cáncer de pulmón (n = 956), se logró una sensibilidad de 98,097,9%, una especificidad de 95,7% y una precisión de 96,89% (AUC = 0,97). Al predecir según los subtipos histológicos de cáncer de pulmón, se logró una precisión de 93,8% y de 92,2% para el carcinoma de células escamosas y el adenocarcinoma, respectivamente. Las muestras de tumores de tiroides investigadas incluyeron muestras de adenoma de tiroides folicular benigno (FTA) y de carcinoma papilar de tiroides maligno (PTC). 35 40 45 Se construyó un clasificador para cada uno que arrojó una precisión de 94,7% para FTA y una precisión de 97,8% para PTC. En general, se logró una sensibilidad de 96,4%, una especificidad de 96,2% y una precisión de 96,3% para los cuatro tipos de cáncer investigados. Estos resultados demuestran que la información molecular obtenida de muestras de tejido humano mediante MasSpec Pen es altamente predictiva de cáncer. Adicionalmente, los resultados indican que los clasificadores estadísticos basados en los datos moleculares adquiridos con MasSpec Pen son sólidos y pueden utilizarse en un enfoque automatizado para el diagnóstico clínico rápido de muestras de tejido.

Tabla 22: Descripción de las muestras y resultados obtenidos utilizando el MasSpec Pen. Se muestran el diagnóstico patológico, el número de muestras de pacientes y la sensibilidad, especificidad, precisión y área bajo la curva de la predicción de Lasso obtenidos mediante un enfoque de validación cruzada de dejar uno fuera.

Órgano	Evaluación patológica		Número de pacientes	Predicción del Lasso			
	Diagnóstico	Tipo histológico		Sensibilidad	Especificidad	Precisión	AUC
Mama	Normal		29	87,5%	100,0%	95,6%	1,00
	Cáncer	Carcinoma ductal	16				
Pulmón ^a	Normal		47	98,0%	95,7%	96,9%	0,97
	Cáncer	Adenocarcinoma	17	88,2%	93,6%	92,2%	0,98

Órgano	Evaluación patológica		Número de pacientes	Predicción del Lasso			
	Diagnóstico	Tipo histológico		Sensibilidad	Especificidad	Precisión	AUC
Ovario		Células escamosas	17	88,2%	95,7%	93,8%	0,93
		Otro	14	-	-	-	-
	Normal		29	100,0%	89,7%	94,7%	0,98
Tiroídes ^b	Cáncer	Seroso de alto grado	28				
			27	-	-	-	-
	Carcinoma papilar		18	94,4%	100,0%	97,8%	0,99
Tumor	Adenoma folicular		11	90,9%	96,3%	94,7%	0,93

^a Los resultados de la predicción de Lasso para el cáncer de pulmón se muestran para los tejidos normales frente a todos los cancerosos (primera fila), seguido de normal frente a adenocarcinoma de pulmón (fila central) y normal frente a carcinoma de células escamosas (última fila).

^b Los resultados de la predicción de Lasso para el cáncer de tiroides se muestran para normal frente a carcinoma papilar maligno y para normal frente a adenoma folicular benigno.

Ejemplo 8: Análisis intramuestra de regiones histológicas distintas y de tejido con margen canceroso

La capacidad del MasSpec Pen para identificar regiones histológicamente distintas se evaluó en una única muestra de tejido humano que contenía regiones de HGSC adyacentes al tejido del estroma ovárico normal. Se analizaron cinco puntos consecutivos en la muestra de tejido utilizando un MasSpec Pen con un diámetro de 1,5 mm, como se demarca en la imagen óptica que se muestra en la FIG. 14A. Una sección de tejido de la muestra, incluidas las regiones analizadas por MasSpec Pen, se sometió a tinción HE y se evaluó mediante histopatología. Patólogos expertos diagnosticaron los puntos 1 y 2 como estroma normal, mientras que las regiones 4 y 5 fueron diagnosticadas como HGSC. El punto 3 estaba en el margen entre las regiones de tejido del estroma con cáncer y normales, presentando ~50% de tejido tumoral y ~50% de tejido de estroma normal. La FIG. 14B muestra los espectros de masas obtenidos para los puntos 1, 3 y 5. Los espectros obtenidos para el punto 5, HGSC, presentaron marcadores lipídicos característicos detectados en los tejidos de HGSC analizados ex-vivo para construir el clasificador estadístico (Tabla 3). Los espectros de masas obtenidos para el punto 1, diagnosticado como tejido del estroma ovárico normal, presentaron moléculas de iones menos abundantes como también se observó para los tejidos del estroma analizados ex-vivo. El punto 3 presentó perfiles moleculares característicos de HGSC con menor abundancia total debido a la contribución del tejido del estroma normal presente dentro de la región analizada. A continuación, el clasificador molecular de cáncer de ovario de los autores de la presente invención evaluó los espectros de masas obtenidos para los 5 puntos como un conjunto de validación independiente. Sorprendentemente, esto clasificó correctamente los puntos 1 y 2 pronosticados como normales, y 3, 4 y 5 como cáncer (FIG. 14C). Se obtuvieron resultados similares para una muestra de tejido diferente con regiones histológicamente distintas (FIG. 19). Estos resultados muestran que la información molecular obtenida por MasSpec Pen se puede utilizar para detectar cáncer en regiones marginales con una composición mixta de células normales y cancerosas.

Ejemplo 9 - Análisis in vivo de un modelo murino de cáncer de mama humano durante la cirugía

El MasSpec Pen fue diseñado con materiales biocompatibles para garantizar una compatibilidad total como herramienta de diagnóstico molecular *in vivo*. El MasSpec Pen fue probado para análisis de tejido *en vivo* utilizando un modelo murino de cáncer de mama humano. Se implantaron células de cáncer de mama BT474 HER2+ por vía subcutánea en ratones atípicos desnudos ($n = 3$). Los tumores crecieron hasta un promedio de 250 mm^3 durante un período de 4 semanas. Todos los procedimientos quirúrgicos y de análisis con MasSpec Pen se realizaron bajo anestesia. Se utilizó una hoja de bisturí para abrir un colgajo de piel que rodeaba el tumor y después se disecó el colgajo de piel de la superficie del tumor. A continuación, el tumor expuesto se analizó utilizando MasSpec Pen

siguiendo las mismas etapas experimentales automatizadas descritas anteriormente. La FIG. 16A muestra una imagen óptica del animal bajo anestesia antes del inicio de la cirugía, antes del análisis (y después de la extirpación quirúrgica de la piel), durante el análisis con MasSpec Pen y después del análisis. Se analizaron varias regiones de tejido para cada animal investigado, incluidas múltiples posiciones de la parte superior del tumor, el núcleo del tumor después de la resección parcial del tumor, así como el tejido conectivo blando normal adyacente. Los espectros de masas obtenidos para las regiones tumorales presentaron muchas especies moleculares observadas en el tejido mamario humano, con un perfil claramente distintivo del obtenido para las regiones adyacentes de tejido conectivo blando normal FIG. 16B). Utilizando microscopía óptica, no se detectaron daños macroscópicos o microscópicos observables en las regiones de tejido analizadas debido a los análisis con MasSpec Pen, como lo demuestran las imágenes ópticas obtenidas de secciones de tejido teñidas con HE (FIG. 20). Adicionalmente, no se observaron efectos aparentes en la salud de los animales debido al análisis con MasSpec Pen durante la cirugía. Después del análisis *in vivo*, también se analizaron especímenes de tumores recién extirpados *ex-vivo*, produciendo espectros de masas con especies de lípidos comunes a los observados en el análisis *in vivo* a pesar de las variaciones en las abundancias relativas, que probablemente se deben al procedimiento de reanálisis de la misma región del tejido (FIG. 21). Estos resultados sugieren que el MasSpec Pen es adecuado para evaluación molecular y diagnóstico de cáncer *in vivo*.

Ejemplo 10 - Materiales y métodos

Diseño del estudio: El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de una nueva sonda basada en espectrometría de masas para analizar y diagnosticar cáncer de forma no destructiva en muestras de tejido humano. En este estudio, se investigaron los perfiles moleculares de muestras de tejido humano obtenidas de 282 pacientes, incluidos tejidos normales y cancerosos de mama, pulmón, tiroides y ovario. Todas las muestras de pacientes se obtuvieron de Cooperative Human Tissue Network (CHTN), Asterand Biosciences (Detroit, MI), MD Anderson Tissue Bank y Baylor College of Medicine Tissue Bank, según el protocolo aprobado de la Junta de Revisión Institucional (IRB). Los espectros de masas obtenidos con MasSpec Pen en muestras de tejido se normalizaron, se les restó el fondo y se analizaron utilizando una técnica estadística para construir modelos de clasificación. Patólogos expertos y certificados (J.L, W.Y y N.C) evaluaron secciones de tejido teñidas con HE obtenidas de las muestras de tejido analizadas. Los patólogos estaban ciegos a cualquier información sobre la adquisición del análisis de espectrometría de masas. Las muestras se excluyeron del análisis estadístico si el patólogo determinó que tenían una heterogeneidad sustancial en la composición celular, que incluía 28 muestras. Los experimentos *in vivo* con modelos animales se realizaron según el protocolo aprobado del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC).

Diseño y construcción del MasSpec Pen: Se utilizó una impresora 3D (Modelo uPrint SE plus) para imprimir el componente clave: la punta de la sonda de PDMS (Dow Corning, Midland, MI, EE. UU.). Las puntas de los lápices se fabricaron moldeando un elastómero a partir de un molde negativo y después disolviendo el molde. Los moldes negativos se diseñaron utilizando el soporte lógico de diseño asistido por ordenador (CAD) SolidWorks y después se modeló el depósito fundido con la impresora 3D utilizando plástico ABS (Stratasys, Eden Prairie, MN, EE. UU.) y material de soporte soluble. A continuación, se lavaron las piezas para eliminar el material de soporte, utilizando un aparato de limpieza de soporte (SCA-1200HT, SCA) y disolvente (EcoWorks) a 70 °C durante 24 horas o hasta que el material de soporte se disolvió por completo. Para el moldeo, se preparó una mezcla de base de elastómero de PDMS y agente de curado (Sylgard 184, Dow Corning) a una razón en peso de 10:1, respectivamente. La mezcla se vertió en moldes impresos en 3D, se curó en un horno (10GCE-LT, Quincy Lab) a 74 °C durante 1 h y después se colocó en un recipiente cerrado con acetona (Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) para la disolución. En la etapa de lavado final, las puntas se sometieron a sonicación en acetona para eliminar cualquier ABS restante. Se insertó directamente un tubo de PTFE (DI 0,08 cm, DE 0,16 cm, Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, EE. UU.) en la punta de la sonda para los experimentos.

Adquisición de datos: Todos los experimentos se realizaron en un espectrómetro de masas híbrido Cuadrupolo-Orbitrap Q Exactive (Thermo Fisher Scientific, San José, CA). La exploración completa se llevó a cabo en el rango de *m/z* 120-1800, utilizando un poder de resolución de 140.000, una temperatura capilar de 350 °C y un nivel de RF de lente S de 100. Se adquirió cerebro de ratón de tipo salvaje de BioreclamationIVT (Westbury, NY). Un total de 282 especímenes de tejido humano, incluidos mama, tiroides, ovario y pulmón, se obtuvieron congelados y se almacenaron en un congelador a -80 °C hasta su análisis, cuando se descongelaron a temperatura ambiente. Los tejidos se colocaron en una superficie y se analizaron con MasSpec Pen utilizando las etapas experimentales descritas. Después de los experimentos, se anotaron las regiones de tejido analizadas, se congelaron y se prepararon secciones de tejido de 16 µm utilizando un Criostato CryoStar™ NX50. Se obtuvieron secciones de tejido adicionales en diferentes regiones del fragmento de tejido para el análisis por EM. Las secciones de tejido se mantuvieron congeladas hasta el análisis, cuando estaban a temperatura ambiente y se analizaron con MasSpec Pen. A continuación, las secciones de tejido se tiñeron con HE y se evaluaron mediante histopatología. El diagnóstico patológico se utilizó como referencia para la base de datos molecular de los autores de la presente invención.

Experimentos *in vivo*: Los experimentos *in vivo* se realizaron durante la resección quirúrgica de tumores utilizando modelos animales murinos mientras los ratones estaban bajo anestesia (2% de isoflurano, 98% de O₂). Se cultivaron células BT474 HER2+ en medio esencial mínimo mejorado (IMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA) con un suplemento de FBS al 10%, L-glutamina al 1% e insulina al 1%, hasta una confluencia de 80-90% en O₂ al 5% y 37°C. Las células se contaron mediante hemocitómetro y exclusión con colorante azul tripán. A ratones hembra atípicos desnudos (N = 3) se les implantó por vía subcutánea un gránulo de 17β-estradiol de 0,72 mg de liberación durante 60 días (Innovative

Research of America, Sarasota, FL) en la nuca. Aproximadamente 24 horas después, las células de cáncer de mama BT474 (10^7) en medio IMEM sin suero con Matrigel con factor de crecimiento reducido al 20% se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho del ratón (inyección total de 100 μ l). Se controló semanalmente el crecimiento de los tumores hasta que alcanzaron entre 0,7 y 1,0 cm de diámetro (promedio de 250 mm³). En ese momento, todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron mientras los ratones estaban bajo anestesia (isoflurano al 2%, O₂ al 98%). Se utilizó una hoja de bisturí para abrir un colgajo de piel, dejando aproximadamente entre 1 y 2 cm de espacio alrededor de los tumores, y después se disecó el colgajo de piel de la superficie del tumor. Se agitó la piel para exponer el tumor y los tejidos normales adyacentes, que se analizaron en varias regiones utilizando el MasSpec Pen. A continuación, se resecaron trozos del tumor con un escalpelo y se analizaron *ex-vivo*. Las regiones de tejido tumoral analizadas con el lápiz MasSpec se anotaron, se congelaron instantáneamente, se seccionaron y se sometieron a tinción HE para el diagnóstico.

Análisis estadístico: Se utilizaron promedios de tres espectros de masas obtenidos durante cada 10 segundos de análisis con MasSpec Pen para construir bases de datos moleculares. Los datos sin procesar de Xcalibur se convirtieron al formato de hoja de cálculo de Microsoft Excel. El rango de masas completo de los espectros se dividió en intervalos de clase redondeando los valores de m/z a la centésima más cercana. Todos los espectros de masas se normalizaron primero según el recuento total de iones (TIC) o la intensidad absoluta de m/z 885,55, para tener en cuenta ligeras fluctuaciones en las intensidades de las señales que pueden ocurrir entre experimentos. A continuación, se excluyeron los picos de fondo y los picos que no aparecían en al menos 10% de las muestras analizadas para reducir el ruido aleatorio.

- 5 Para cada sección de tejido (mama o tiroides), se importaron a metaboanalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>) cuatro espectros de masas representativos para cada sección de tejido analizada para el análisis de componentes principales (PCA) utilizando la función integrada del sitio web. Los gráficos de puntuación y los gráficos de carga se generaron a través del sitio web para cada tipo de tejido. Para cada tipo de muestra de tejido blando (mama, tiroides, pulmón y ovario), los datos se importaron al lenguaje de programación R. El PCA se realizó centrando los datos preprocesados en cero y calculando los componentes principales utilizando la función prcomp en R. Los primeros tres componentes principales se visualizaron con los paquetes rgl y pca3d para R. Para la clasificación de tejidos, se aplicó el método Lasso utilizando el paquete glmnet en la biblioteca en lenguaje R de CRAN. Los modelos generados con Lasso son más sencillos de interpretar que otros métodos de regularización, ya que produce modelos "dispersos", es decir, modelos que implican solo un subconjunto de características. Lasso calcula un peso matemático para cada rasgo estadísticamente informativo dependiendo de la importancia que tiene el rasgo espectral de masas en la caracterización de una determinada clase (cáncer frente a normal, o un subtipo de cáncer frente a normal). La clasificación se realizó utilizando un enfoque de validación cruzada de dejar uno fuera para evaluar la precisión predictiva dentro del conjunto de entrenamiento. El rendimiento de los clasificadores capacitados se midió mediante la sensibilidad, la especificidad, la precisión y el AUC.
 - 10
 - 15
 - 20
 - 25
 - 30
 - 35
 - 40
- Todos los métodos divulgados y reivindicados en el presente documento se pueden realizar y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente divulgación. Si bien las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a los métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en el presente documento sin apartarse del alcance de la invención. Más específicamente, resultará evidente que ciertos agentes que están relacionados química y fisiológicamente pueden sustituir a los agentes descritos en el presente documento mientras se logran resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos y modificaciones similares evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del alcance de la invención, que se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para obtener un perfil de espectrometría de masas que comprende:
 - (a) utilizar una sonda (111) para aplicar de forma no destructiva un volumen discreto de un disolvente a un sitio de ensayo en un sujeto vivo en donde el volumen discreto del disolvente se aplica al sitio de ensayo a una presión inferior a 690 kPa con respecto a la presión atmosférica ambiental (6,89 bar), preferiblemente inferior a 69 kPa con respecto a la presión atmosférica ambiental (0,69 bar);
 - (b) utilizar la sonda para recoger de forma no destructiva el disolvente aplicado para obtener una muestra líquida; y
 - (c) someter la muestra líquida a análisis de espectrometría de masas,
- 10 en donde la sonda comprende un depósito (115), un primer conducto (111), un segundo conducto (112) y un tercer conducto (113), en donde:
 - el depósito (115) está en comunicación de fluido con el primer conducto (111), el segundo conducto (112) y el tercer conducto (113);
 - el primer conducto (111) está en comunicación de fluido con una cámara (120) para transferir disolvente desde la cámara al depósito (115);
 - el segundo conducto (112) está en comunicación de fluido con un suministro de gas presurizado (130) para transferir gas desde el suministro de gas al depósito (115); y
 - el tercer conducto (113) está en comunicación de fluido con el espectrómetro de masas (140).
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en donde el disolvente es una solución acuosa, preferiblemente en donde el disolvente es agua estéril.
3. El método de la reivindicación 1, en donde el sitio de ensayo es un sitio de tejido.
4. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente recolectar una pluralidad de muestras líquidas de una pluralidad de sitios de ensayo.
- 25 5. El método de la reivindicación 4, en donde la sonda se lava entre la recolección de las diferentes muestras o en donde la sonda es desechable y se cambia entre la recolección de las diferentes muestras.
6. El método de la reivindicación 3, en donde someter la muestra a análisis de espectrometría de masas comprende determinar un perfil correspondiente al sitio del tejido, y comprende adicionalmente comparar el perfil con un perfil de referencia para identificar sitios del tejido que incluyen tejido enfermo.
- 30 7. El método de la reivindicación 6, en donde el tejido enfermo comprende células cancerosas, preferiblemente en donde el tejido enfermo comprende células cancerosas de pulmón, ovario o tiroides.
8. El método de la reivindicación 1, en donde la sonda es portátil.
9. El método de la reivindicación 3, en donde el método no implica la aplicación de energía ultrasónica o vibratoria al tejido.
- 35 10. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen discreto de disolvente es una gota y en donde el depósito está configurado para formar y contener una gota del disolvente.
11. El método de la reivindicación 1, en donde el volumen discreto de disolvente no se aplica en forma de pulverización.
12. Un aparato (100) para producir muestras para análisis de espectrometría de masas, comprendiendo el aparato:
 - una cámara (120) que comprende un disolvente;
 - 40 un suministro de gas presurizado (130) que proporciona un gas a la sonda a una presión inferior a 690 kPa con respecto a la presión atmosférica ambiental (6,89 bar), preferiblemente inferior a 69 kPa con respecto a la presión atmosférica ambiental (0,69 bar);
 - un espectrómetro de masas (140);
 - una sonda (110) que comprende un depósito (115), un primer conducto (111), un segundo conducto (112) y un tercer conducto (113), en donde:

- el depósito (115) está en comunicación de fluido con el primer conducto (111), el segundo conducto (112) y el tercer conducto (113);
- el primer conducto (111) está en comunicación de fluido con la cámara (120) para transferir disolvente desde la cámara al depósito (115);
- 5 el segundo conducto (112) está en comunicación de fluido con el suministro de gas presurizado (130) para transferir gas desde el suministro de gas al depósito (115); y
- el tercer conducto (113) está en comunicación de fluido con el espectrómetro de masas (140).
13. El aparato de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente un dispositivo de ionización (146) en comunicación de fluido con el tercer conducto (113).
- 10 14. El aparato de la reivindicación 13, en donde el dispositivo de ionización (146) es un dispositivo de ionización por electropulverización (ESI).
15. El aparato de la reivindicación 12, en donde la sonda (110) está comprendida en un alojamiento que está diseñado para ser portátil o en donde la sonda está comprendida en un alojamiento que está diseñado para acoplarse a un dispositivo quirúrgico laparoscópico.

15

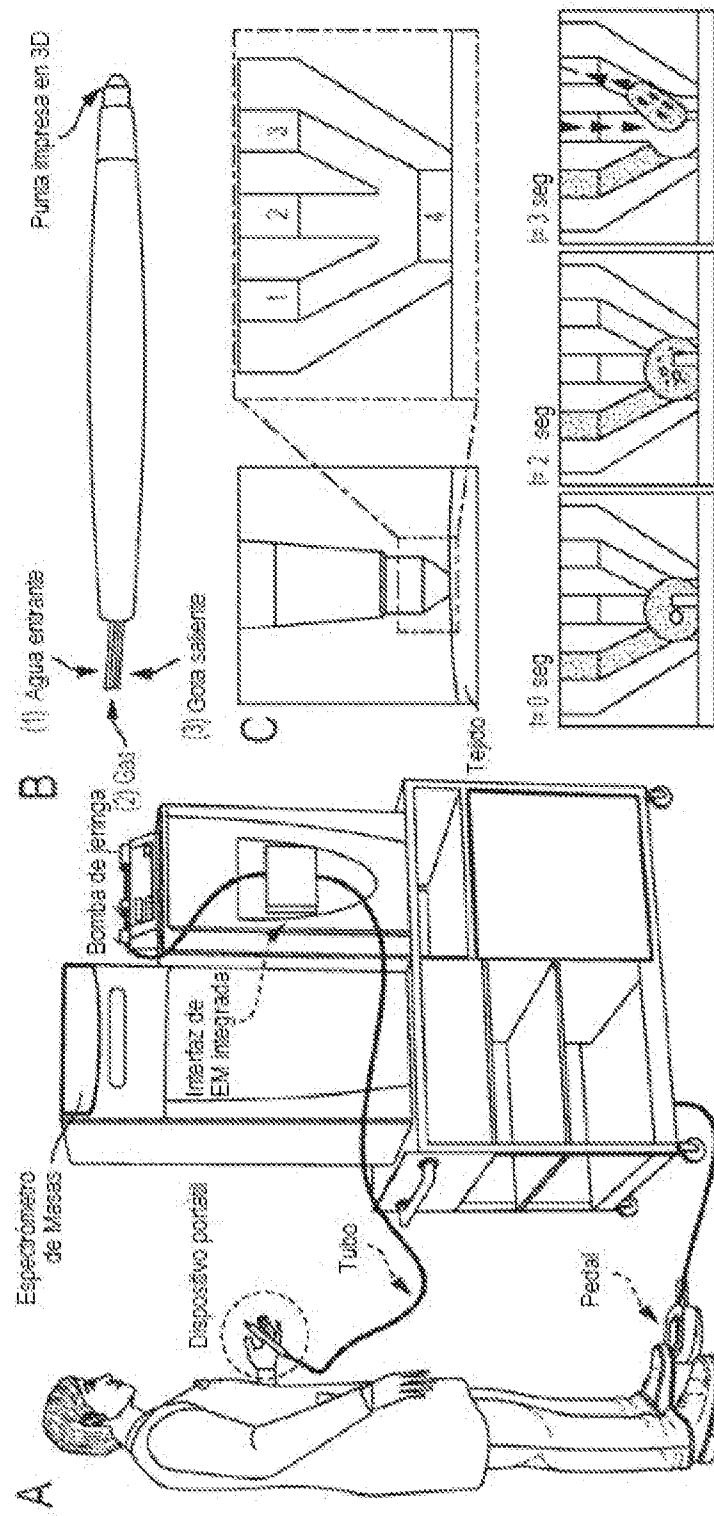


FIG. 1 A-C

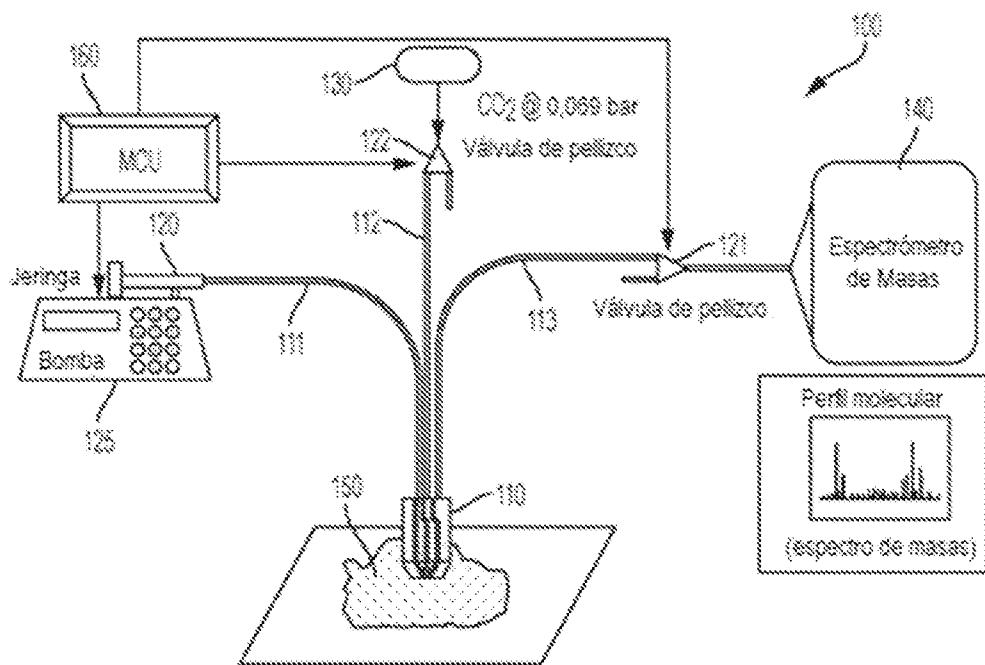


FIG. 1D

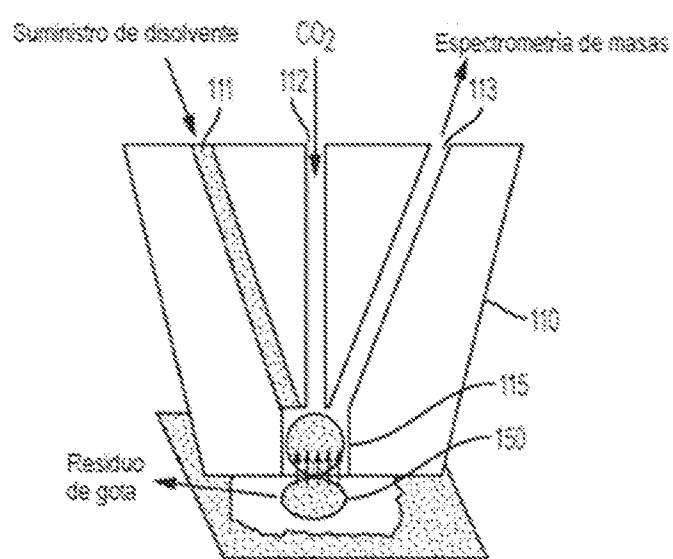


FIG. 1E

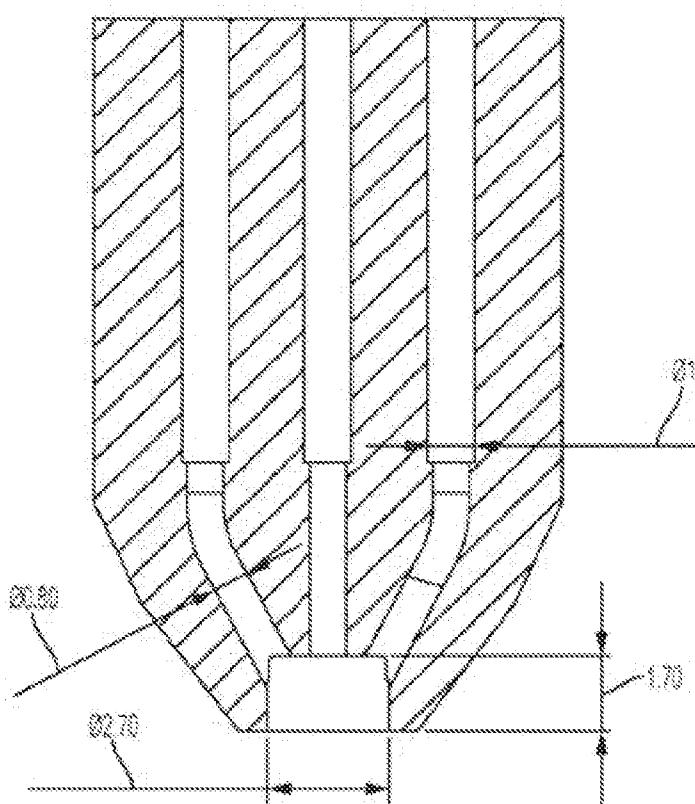
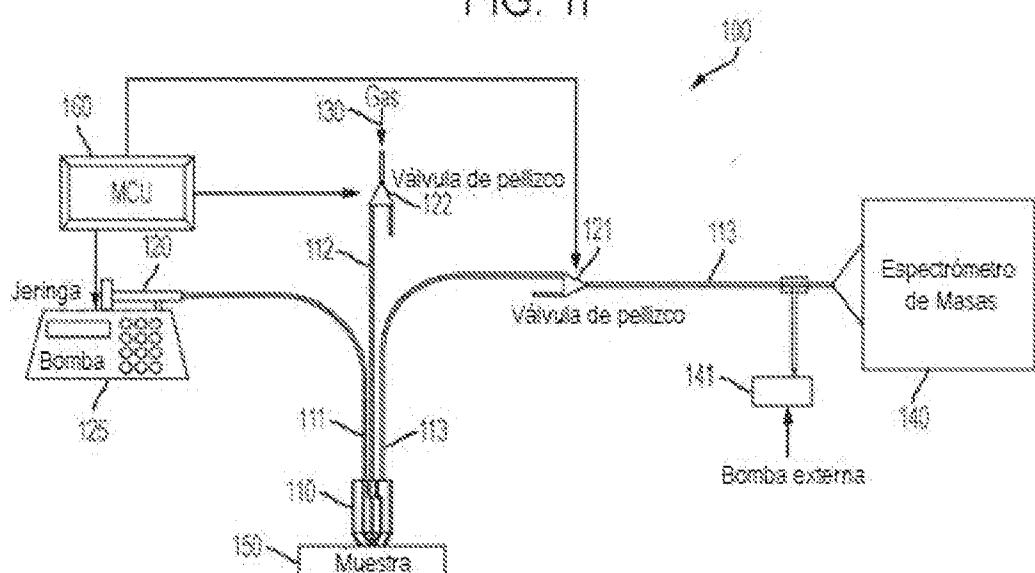


FIG. 1F



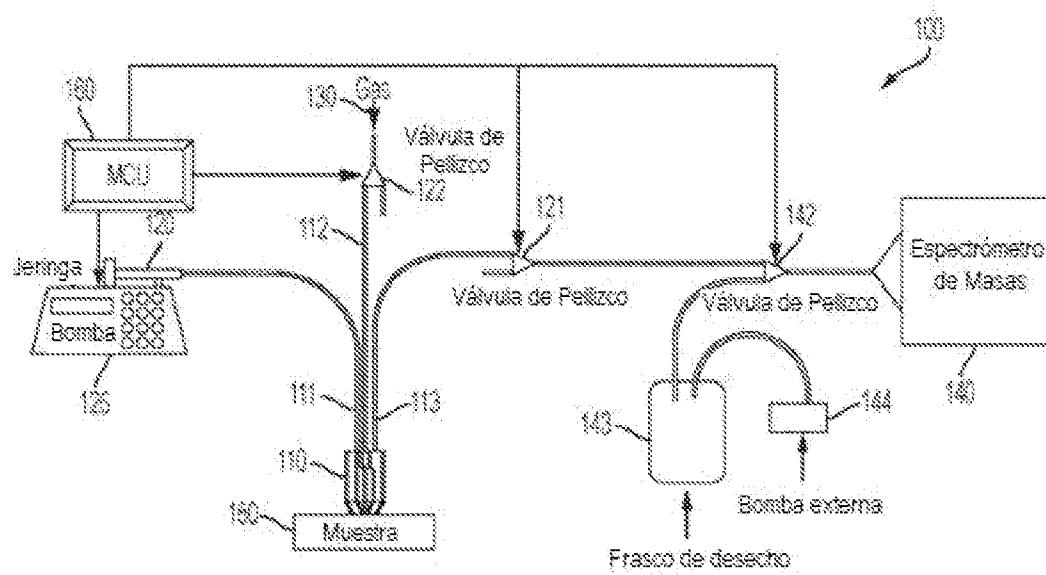


FIG. 1H

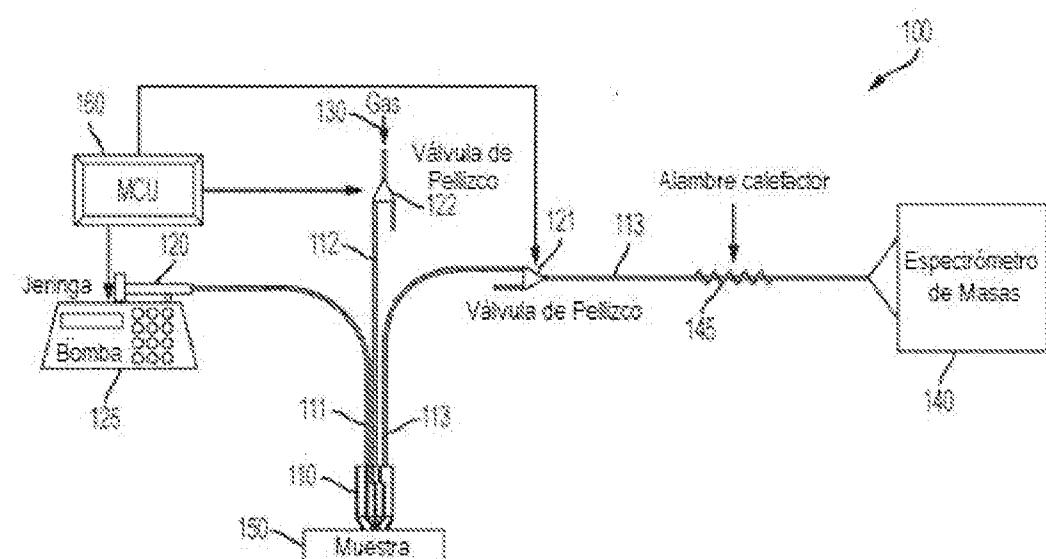


FIG. 1I

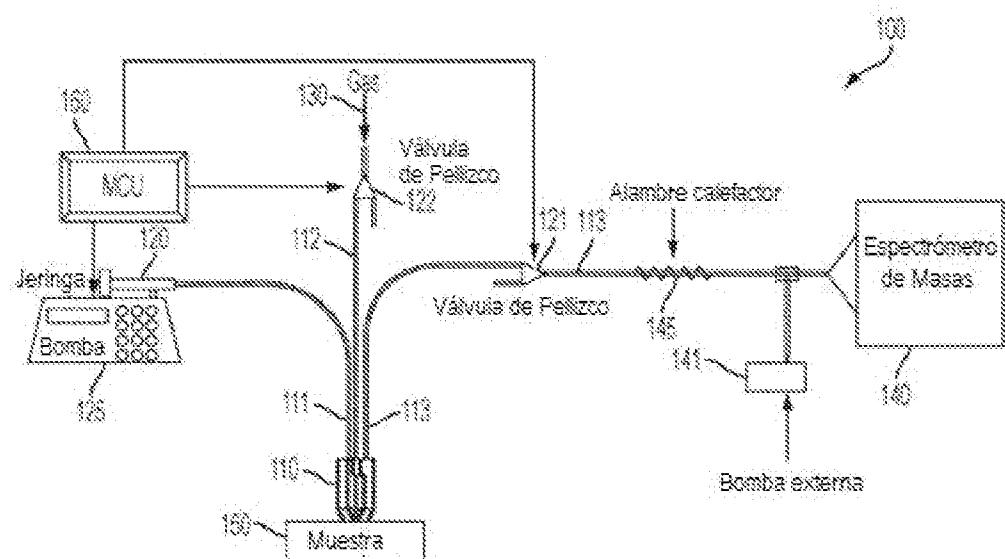


FIG. 1J

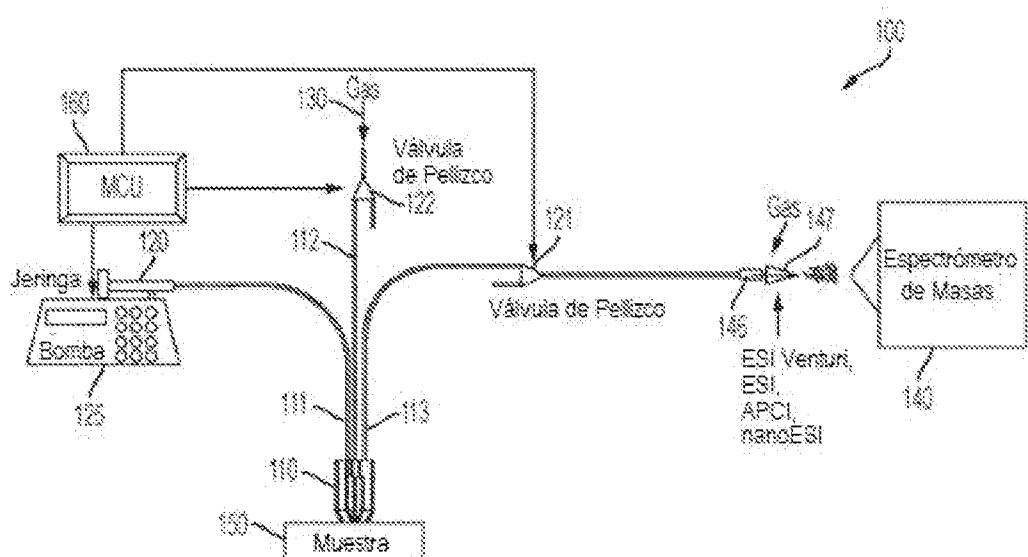


FIG. 1K

ES 2 971 214 T3

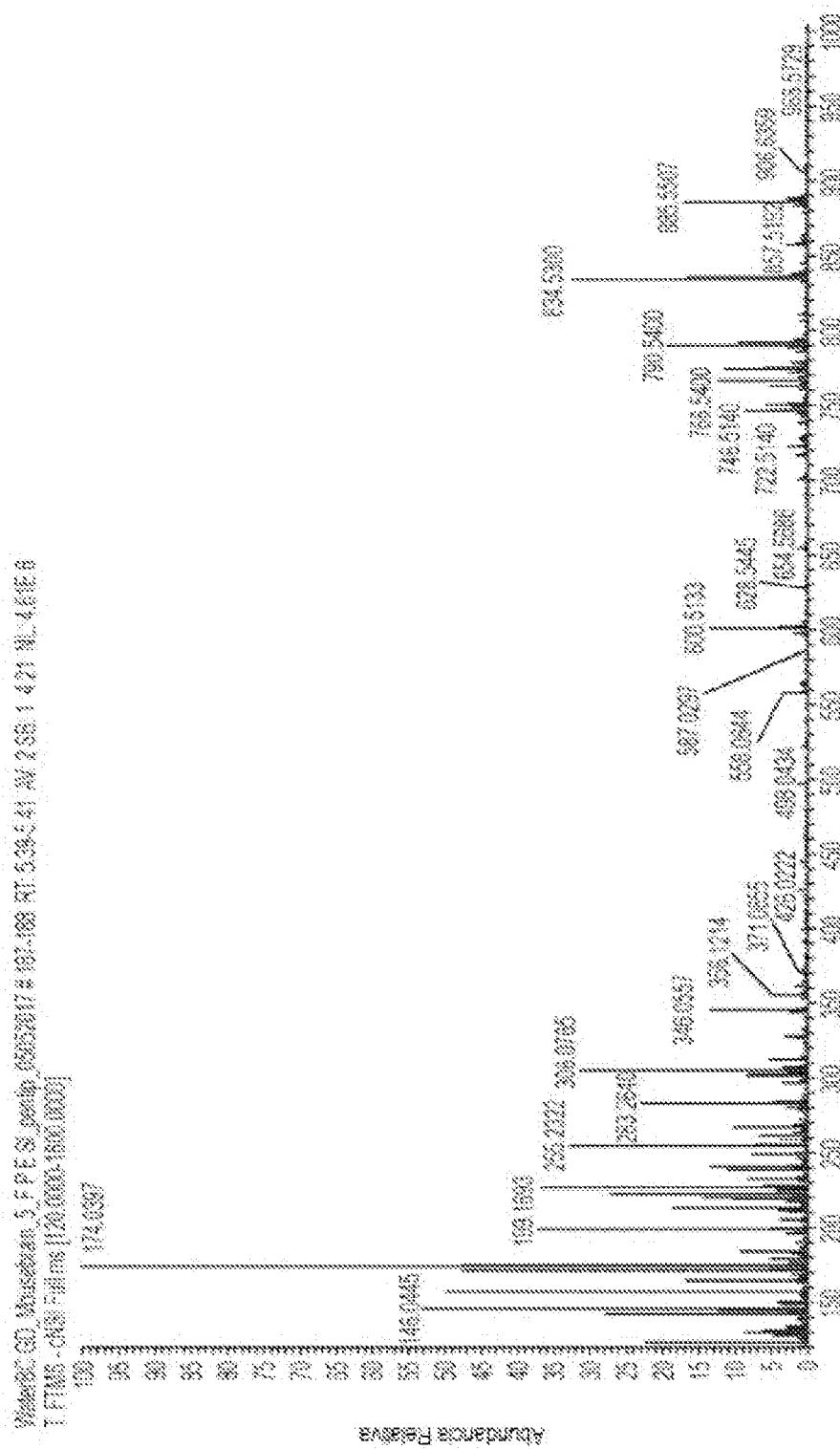


FIG. 1L - Espectros de masas en modo ionizante negativo de una sección cerebral de rata usando MassSpec Flex conectado a una fuente ESI-Vernon (diseño similar a la discusión B).

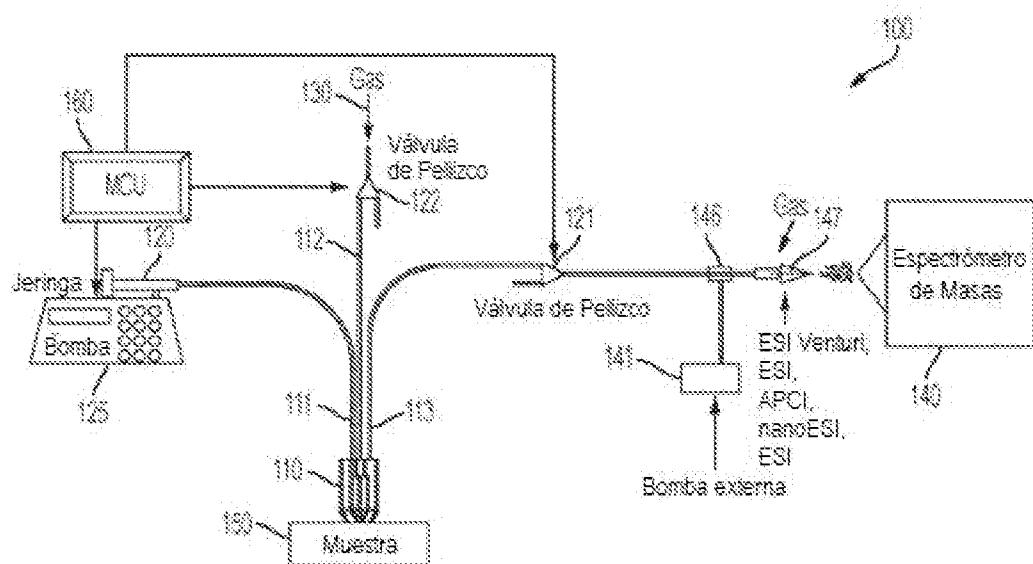


FIG. 1M

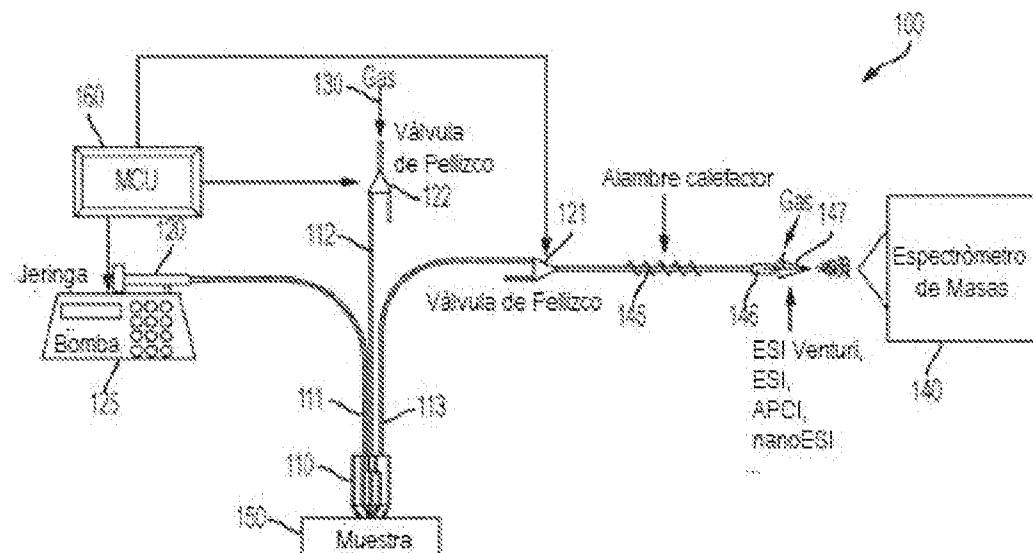


FIG. 1N

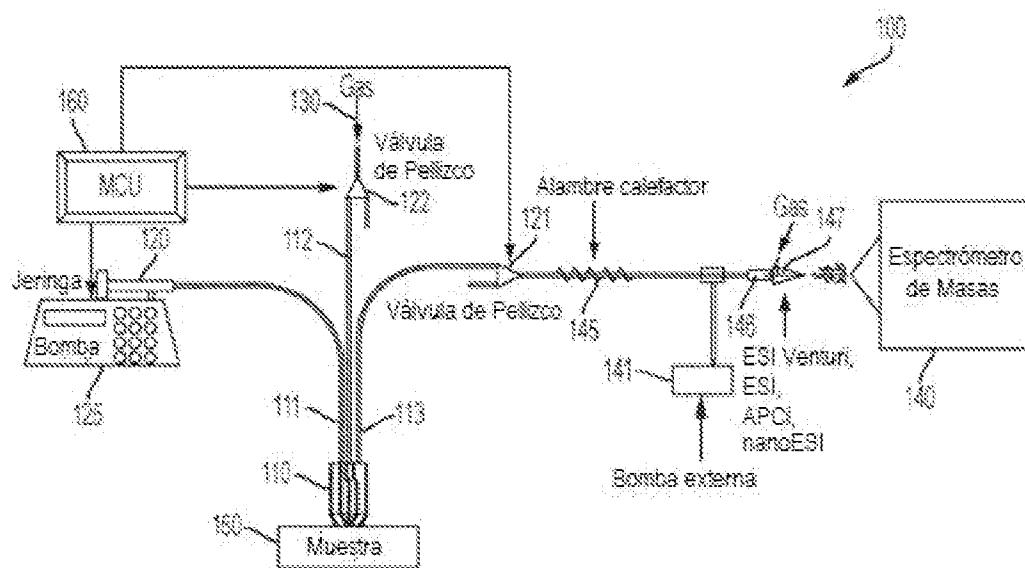


FIG. 10

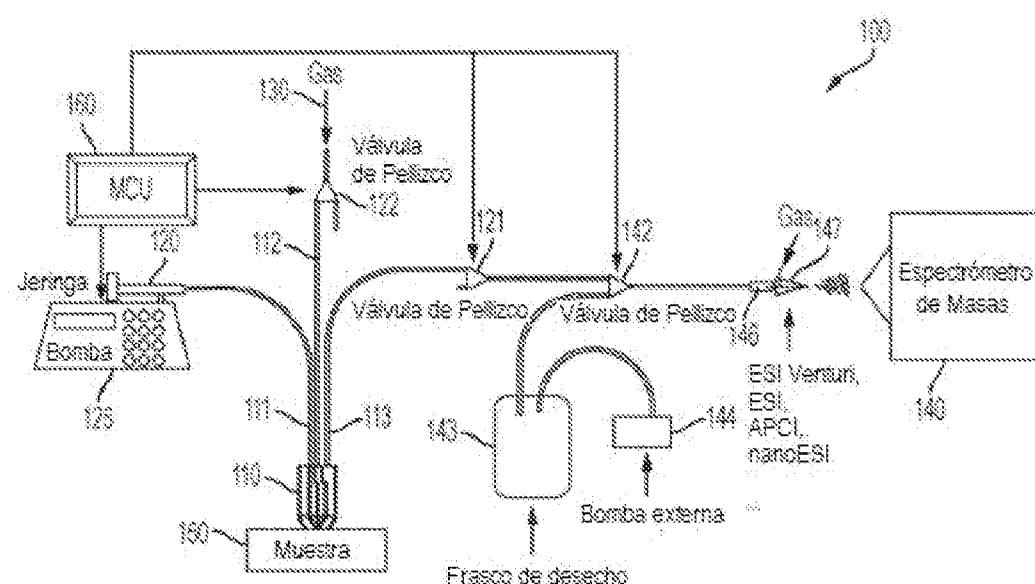


FIG. 1P

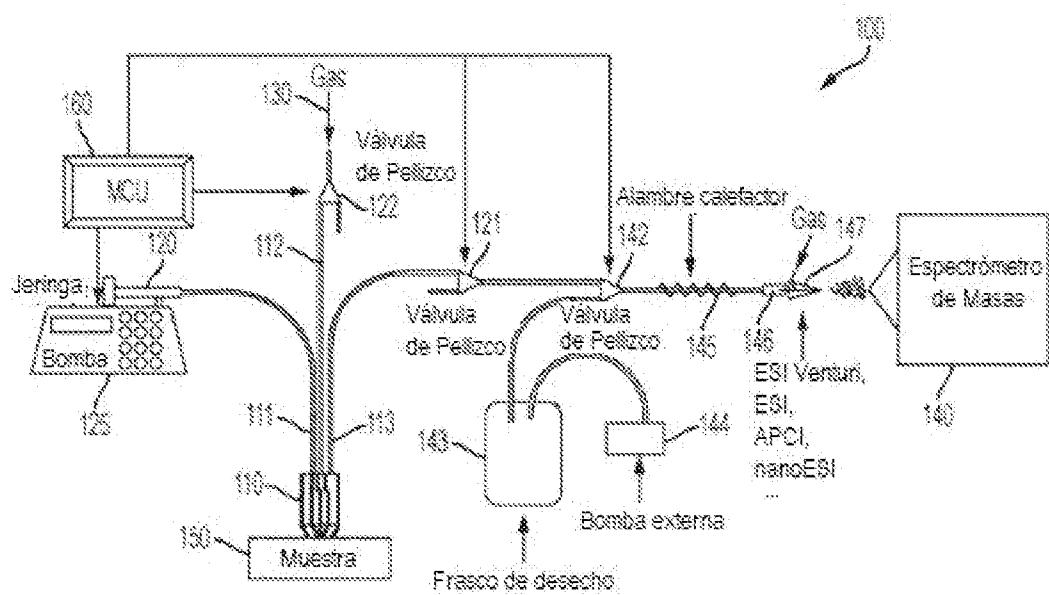
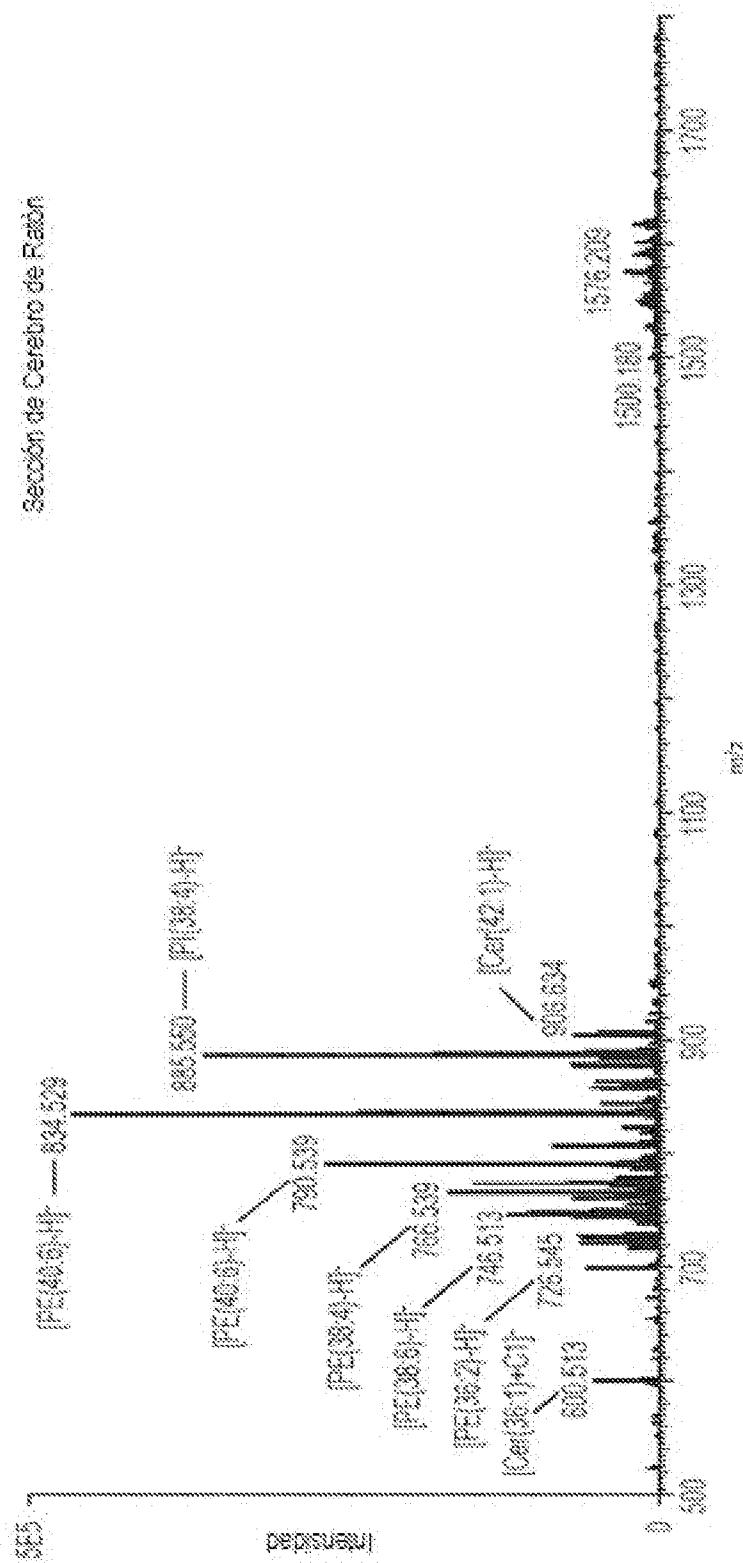


FIG. 1Q

ES 2 971 214 T3



EG 2A

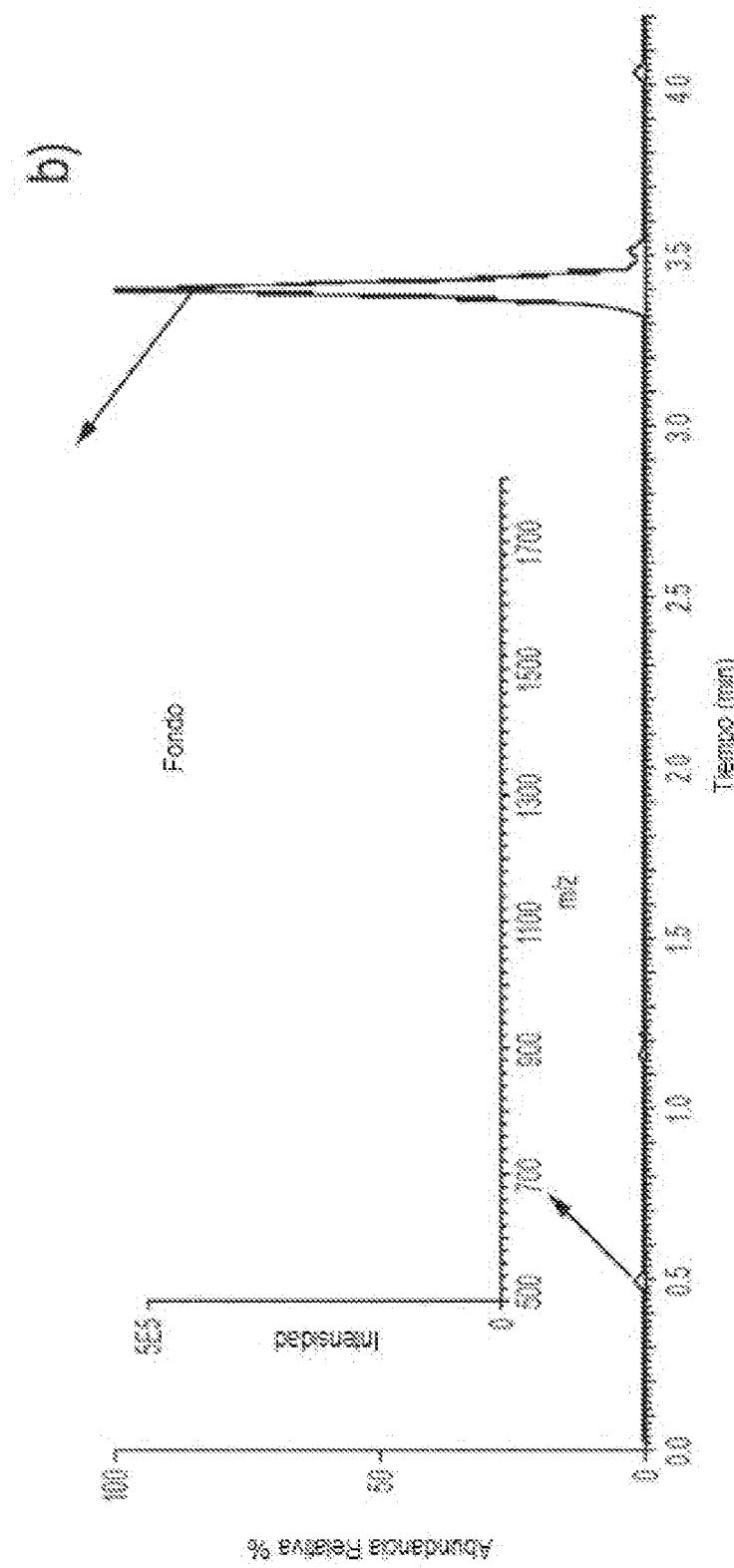
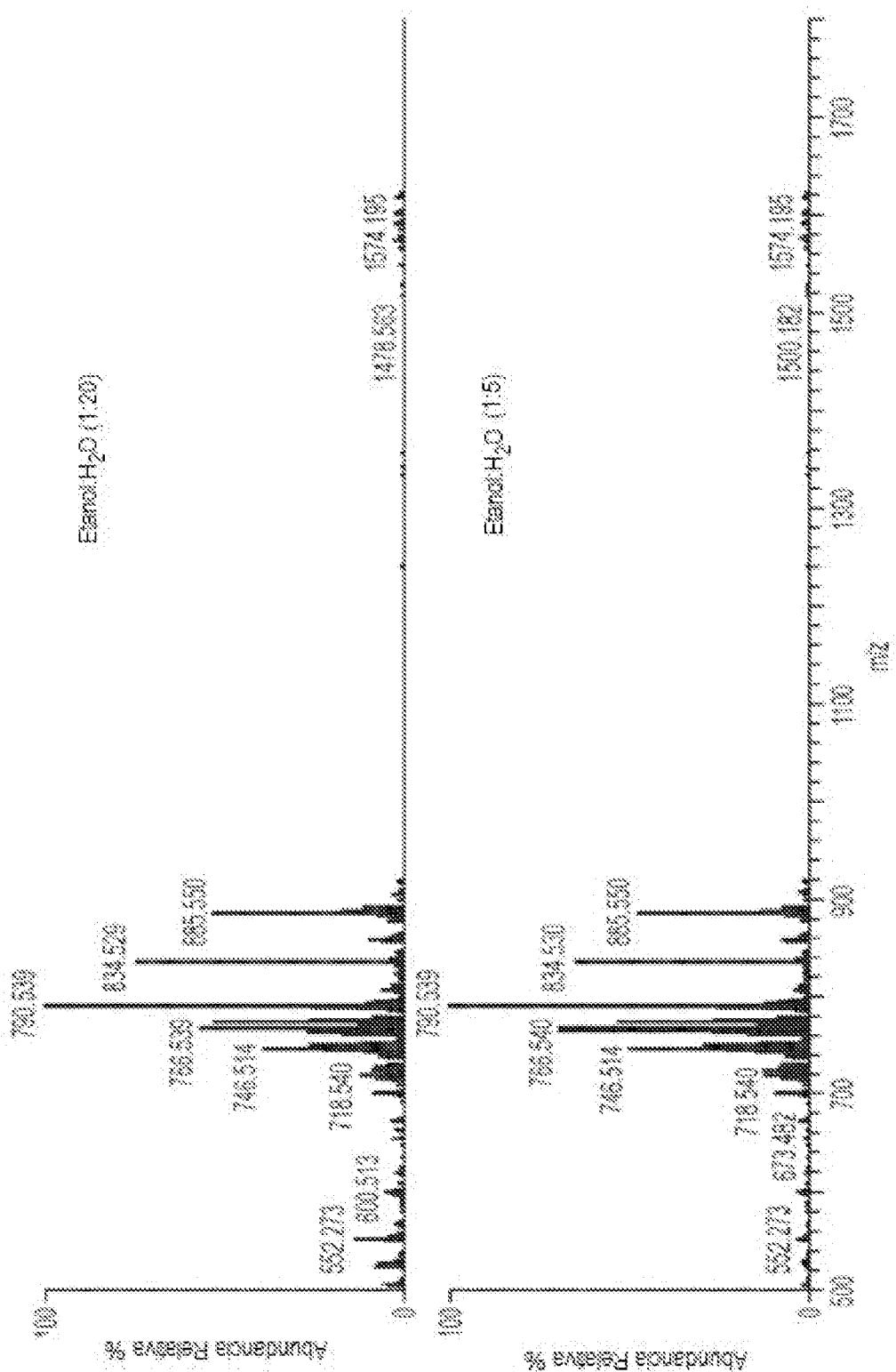
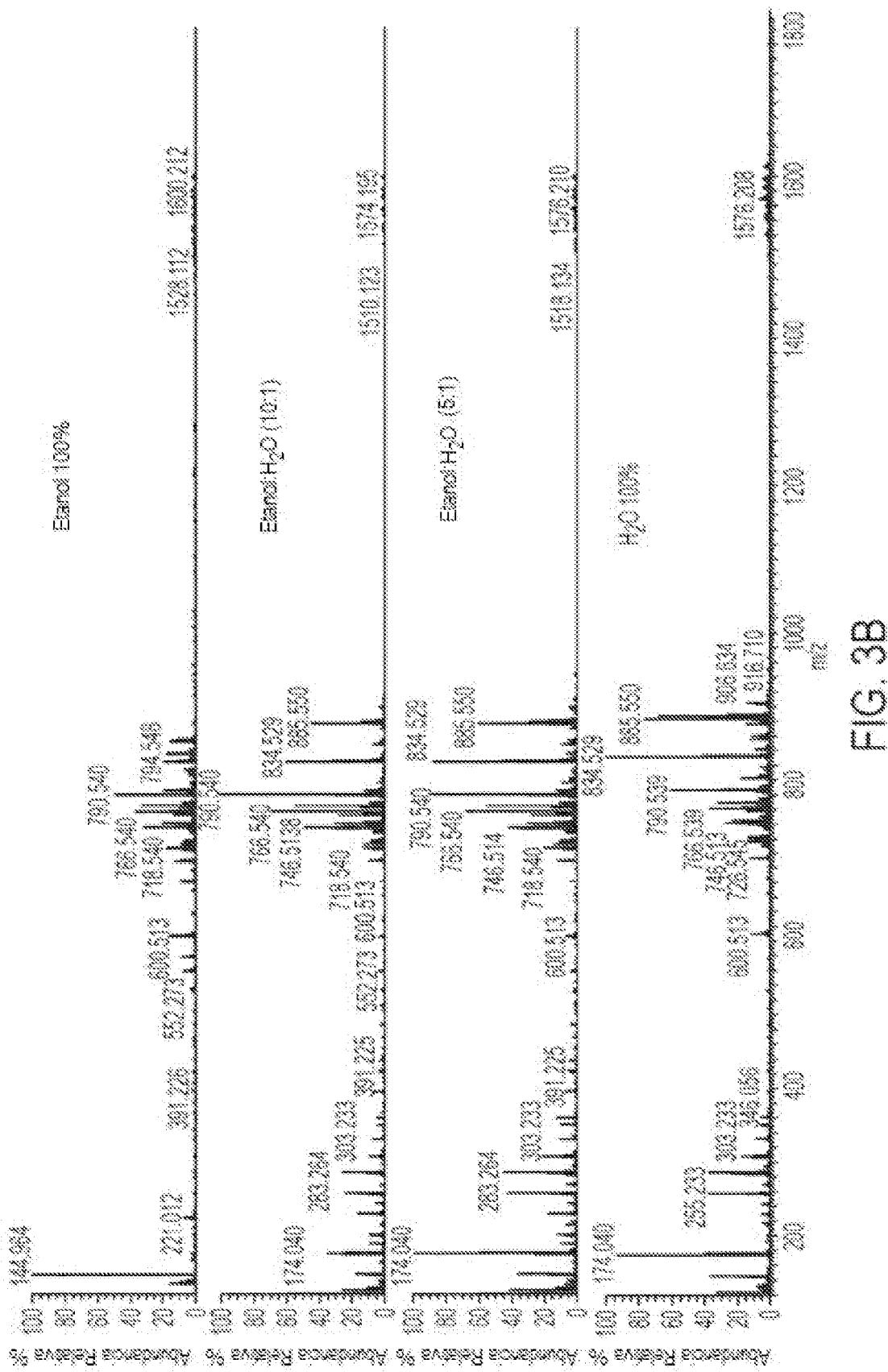


FIG. 2B



三
三
三
三

ES 2 971 214 T3



三

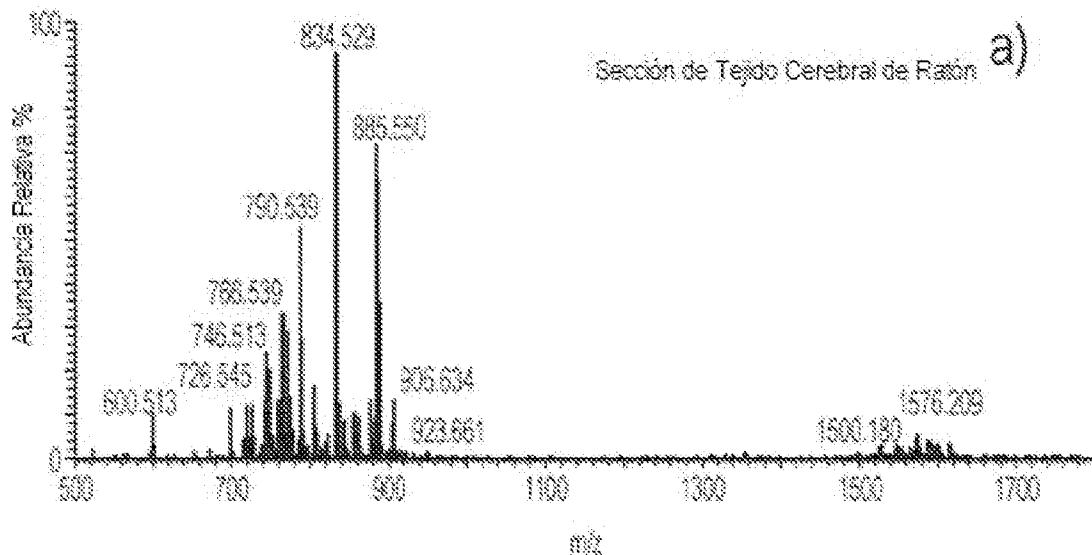


FIG. 4A

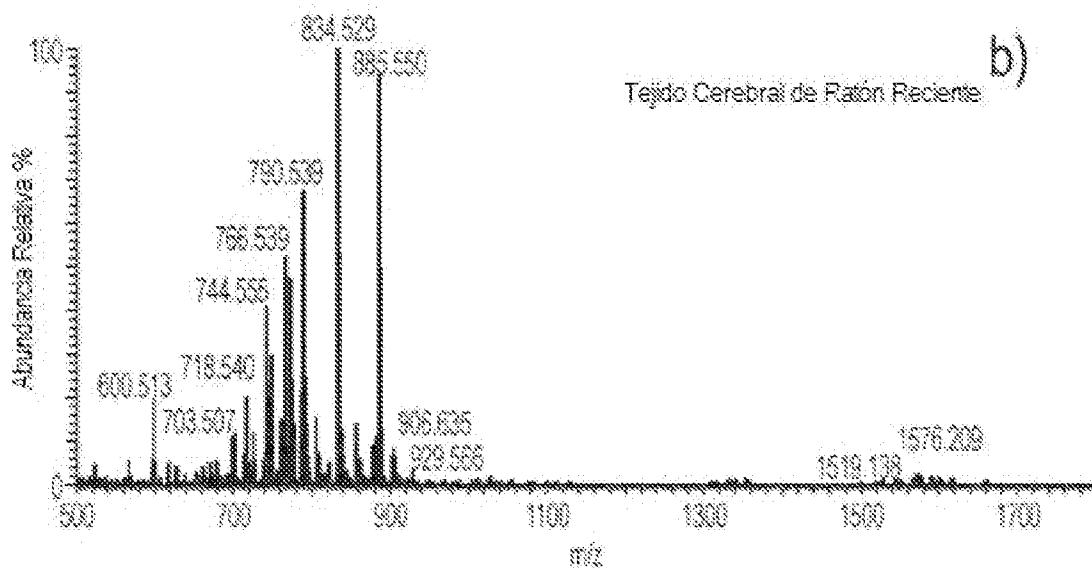


FIG. 4B

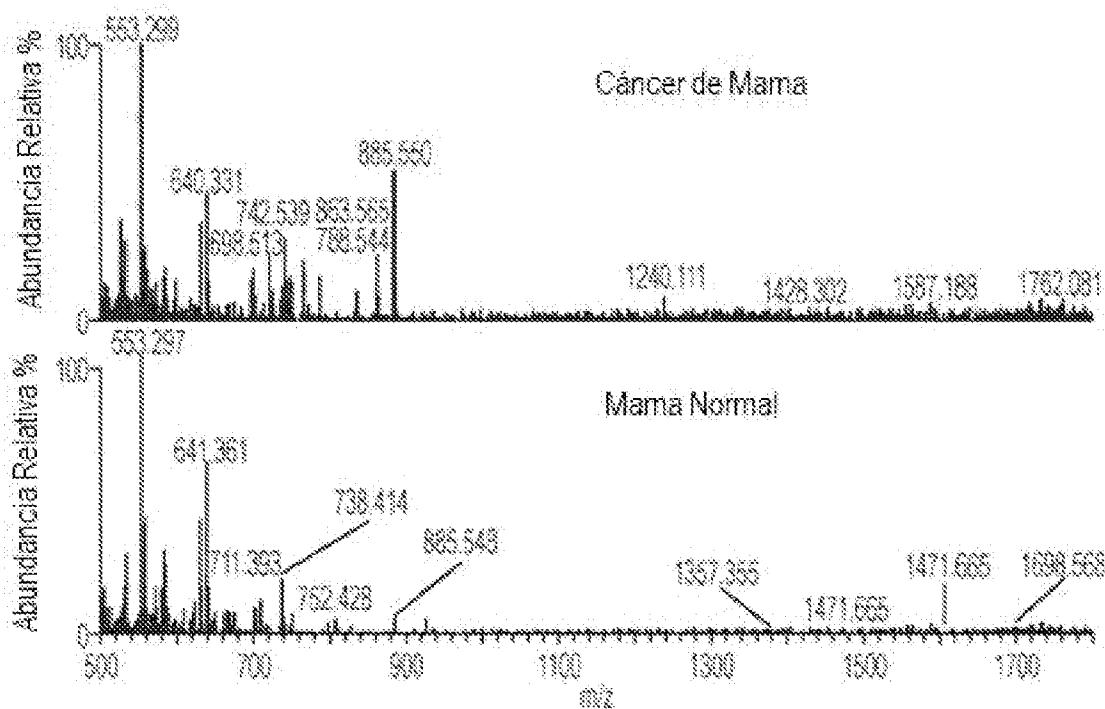


FIG. 5A

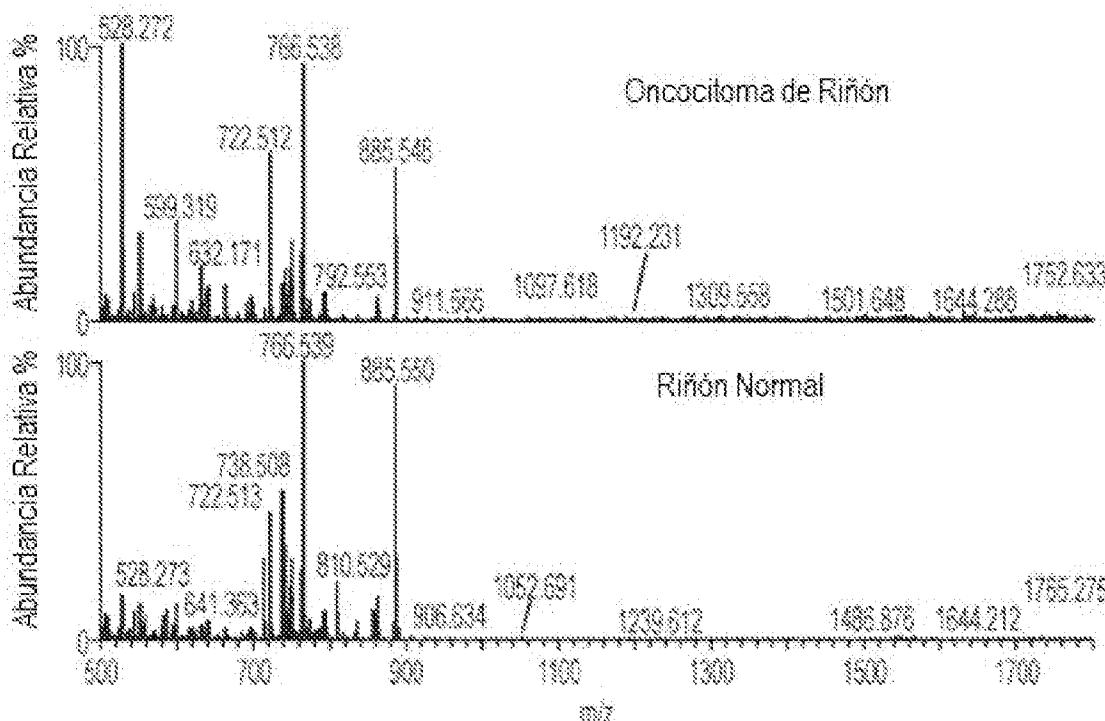


FIG. 5B

ES 2 971 214 T3

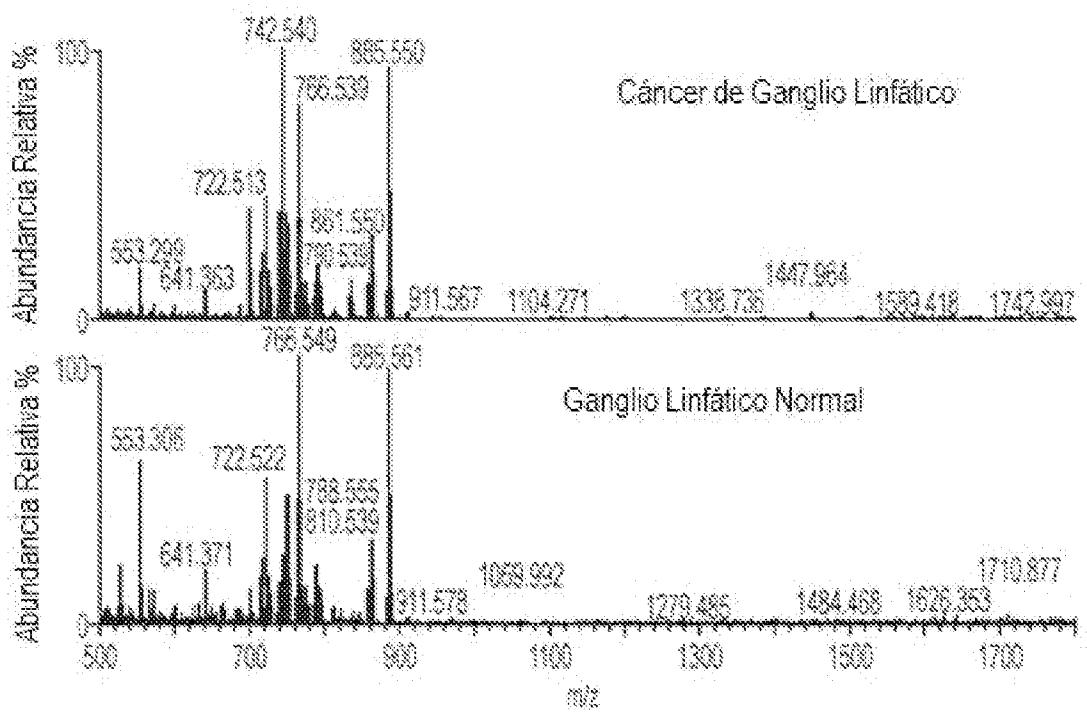


FIG. 5C

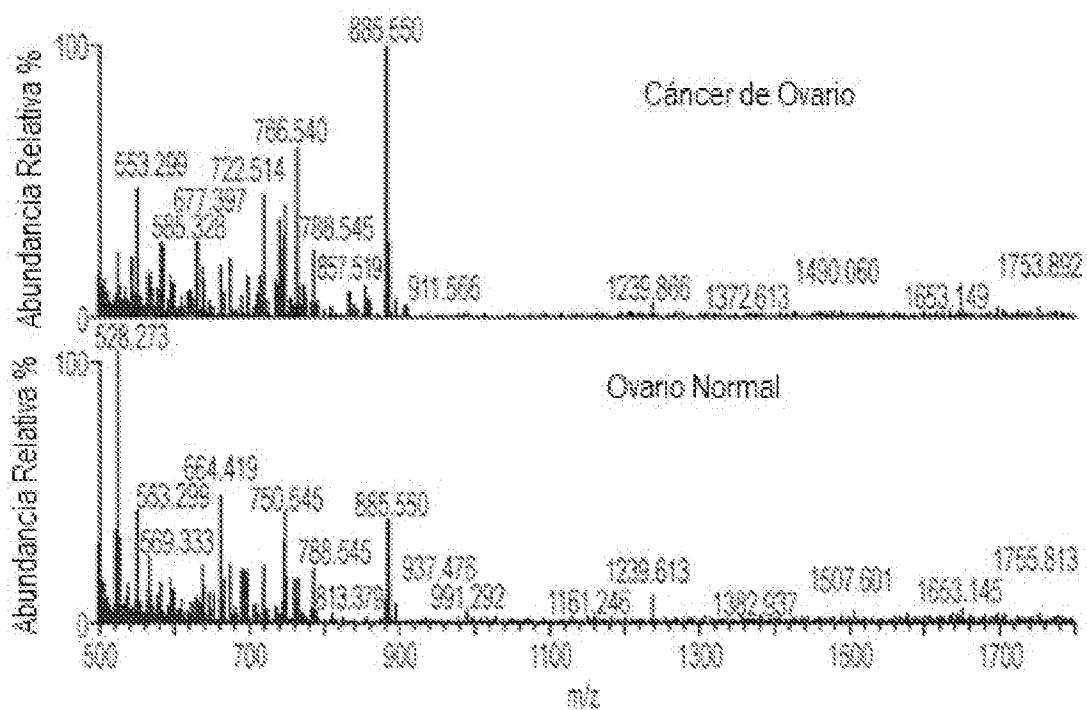


FIG. 5D

ES 2 971 214 T3

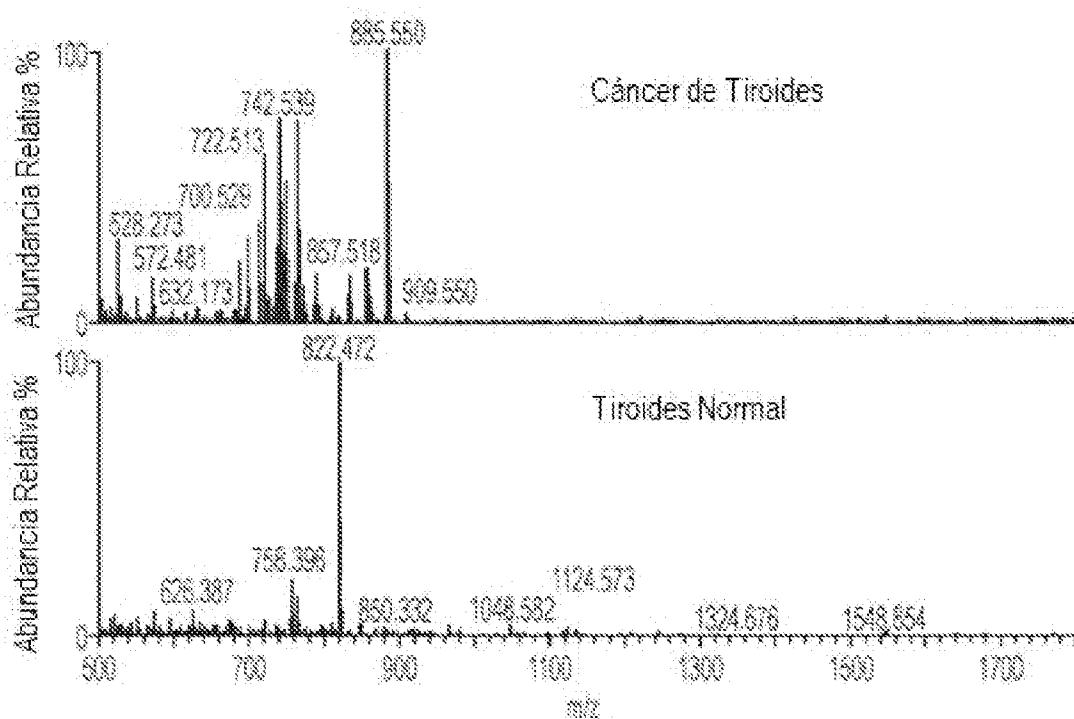


FIG. 5E

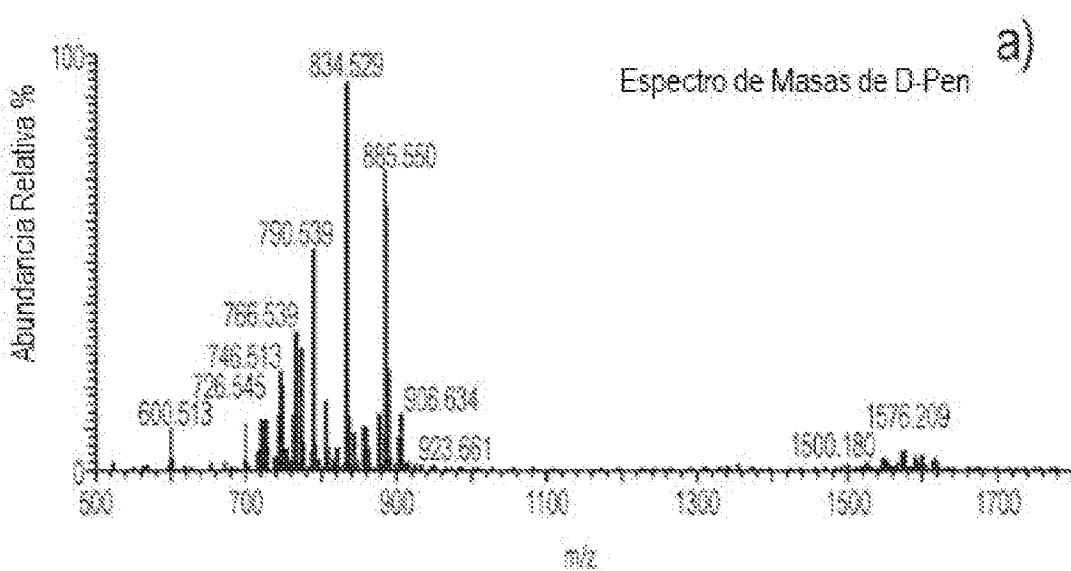


FIG. 6A

ES 2 971 214 T3

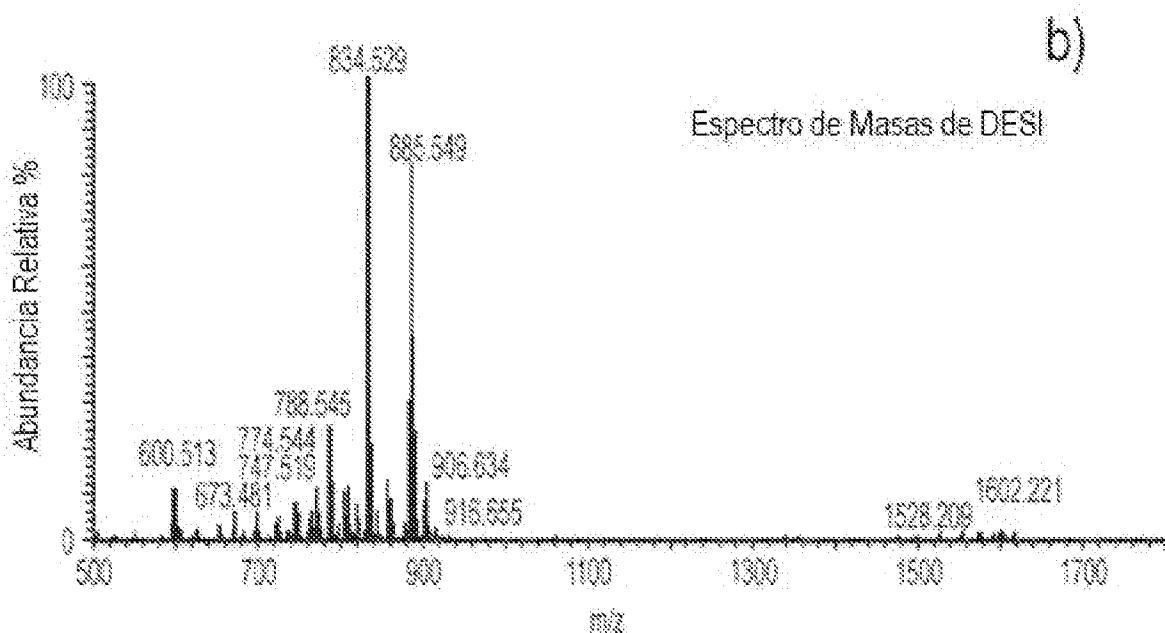


FIG. 6B

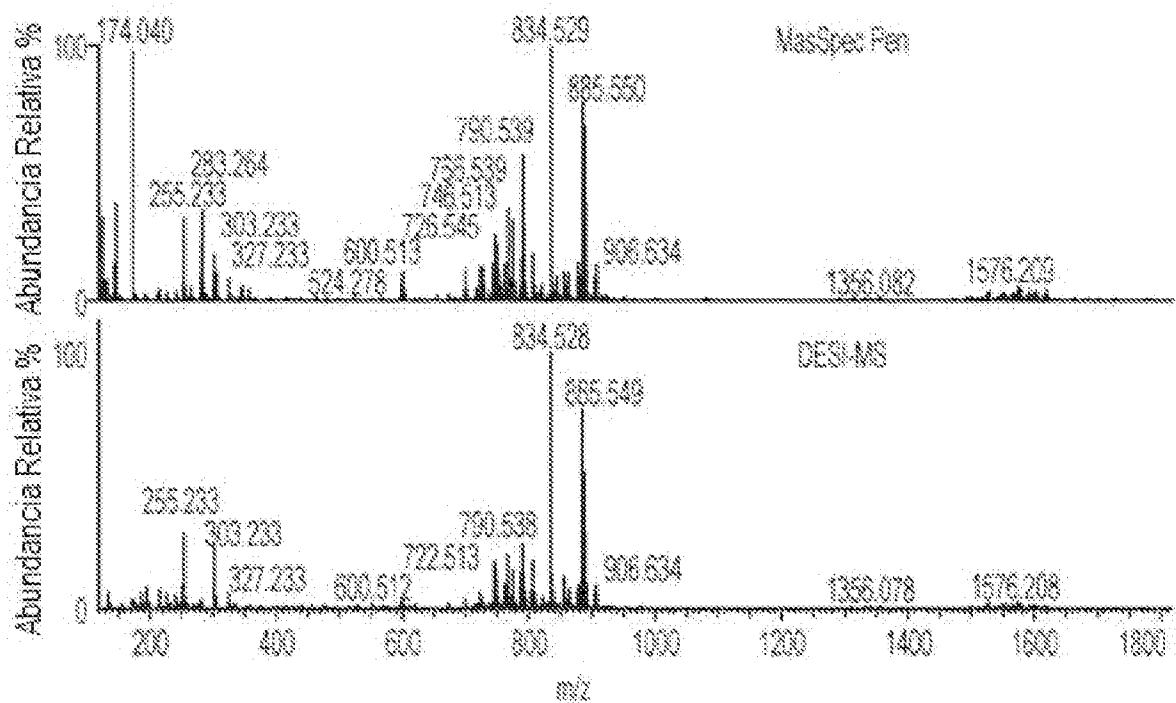


FIG. 6C

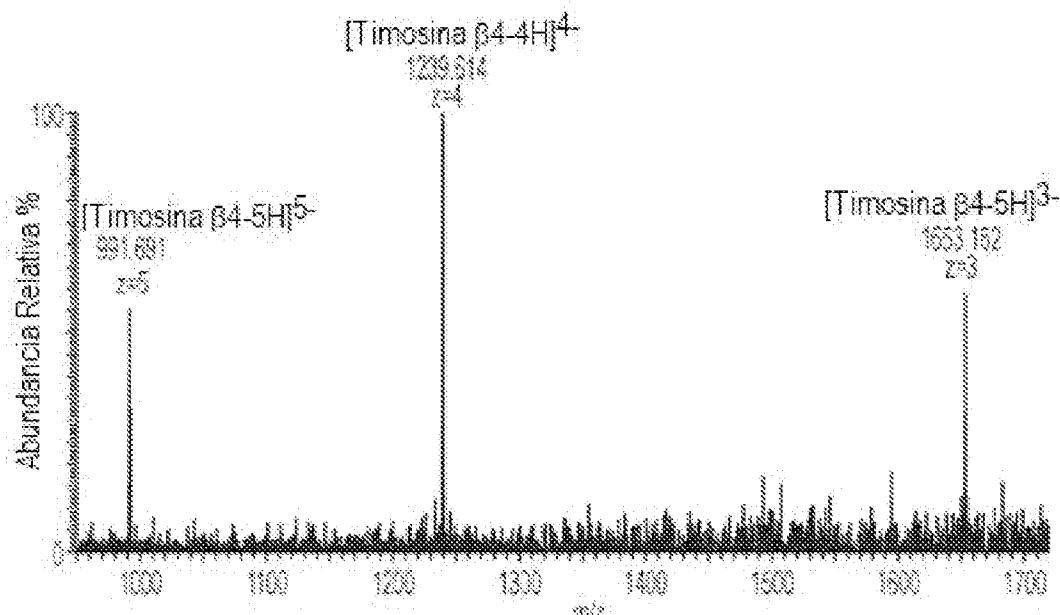


FIG. 7

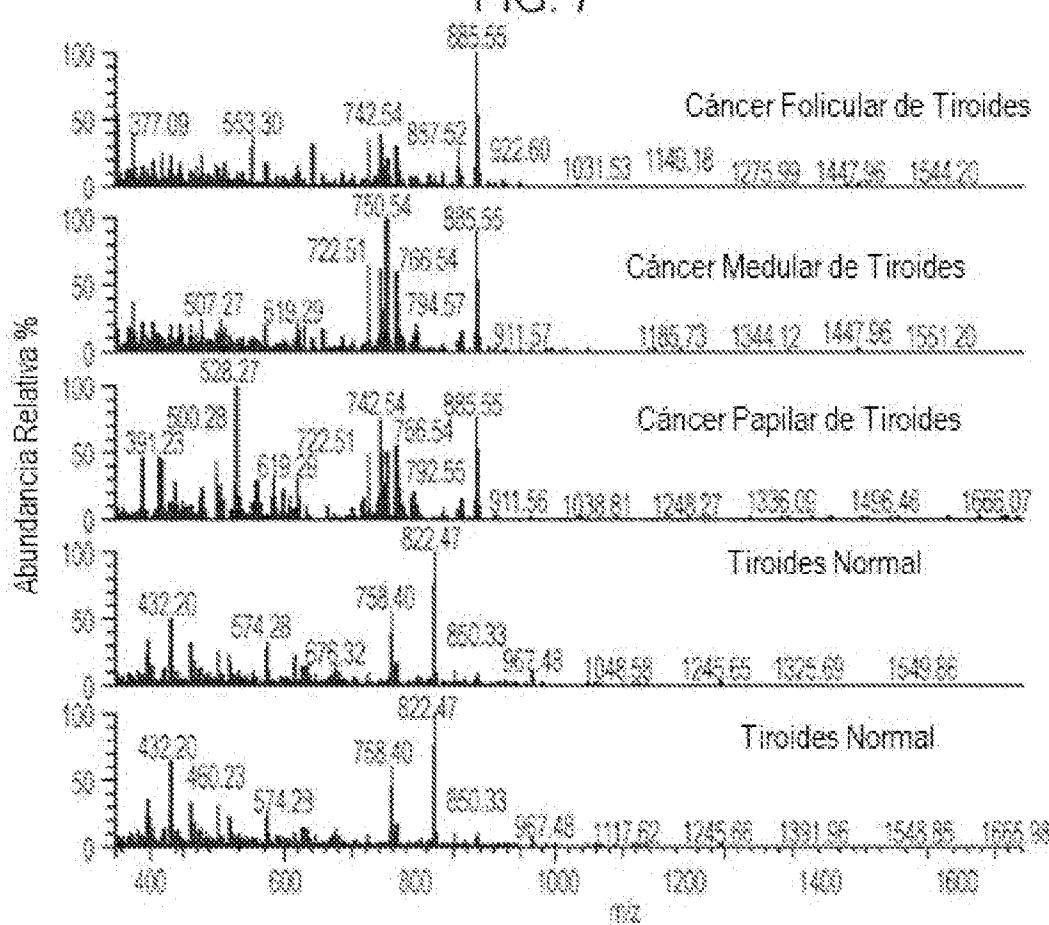


FIG. 8A

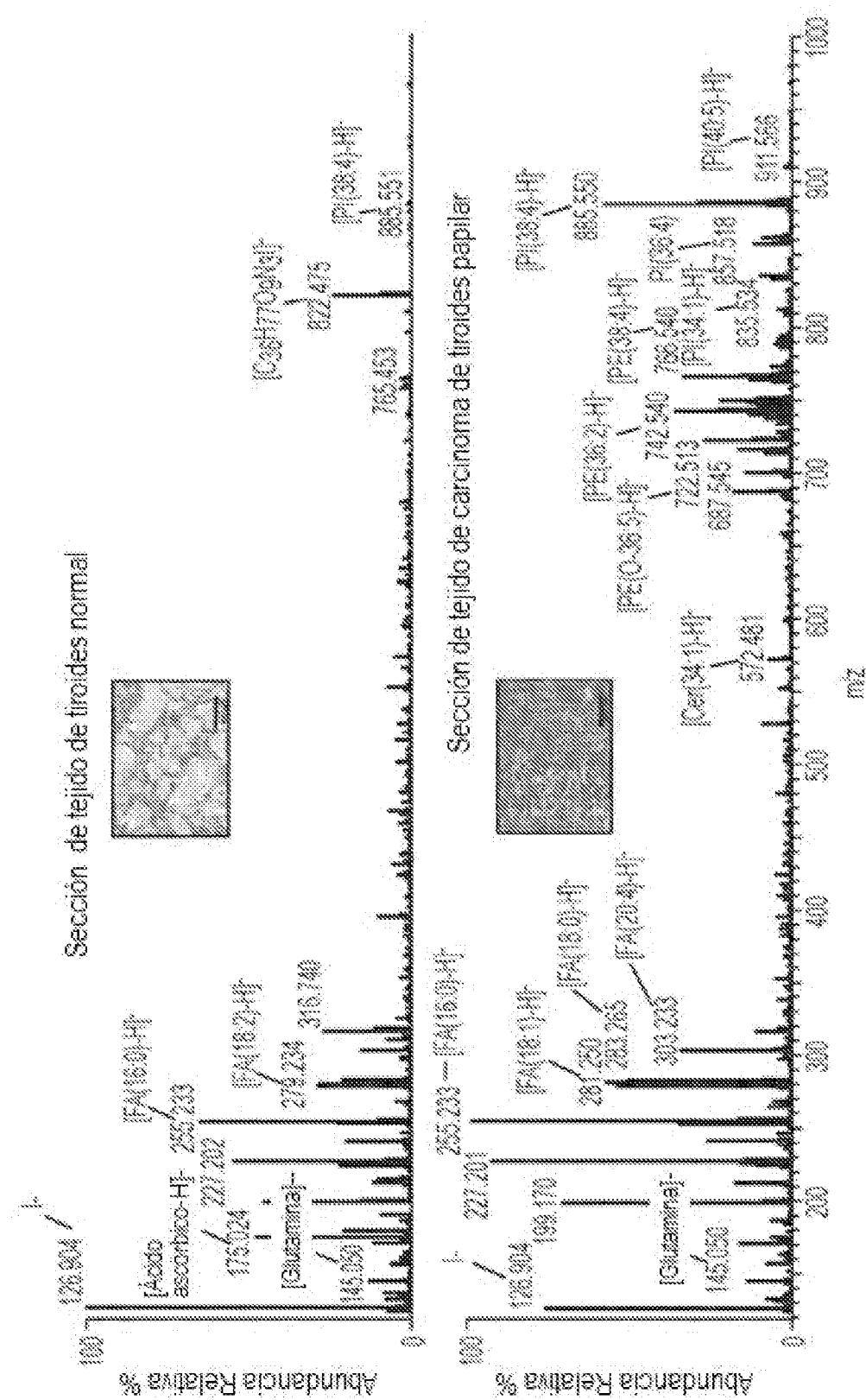


FIG. 8B

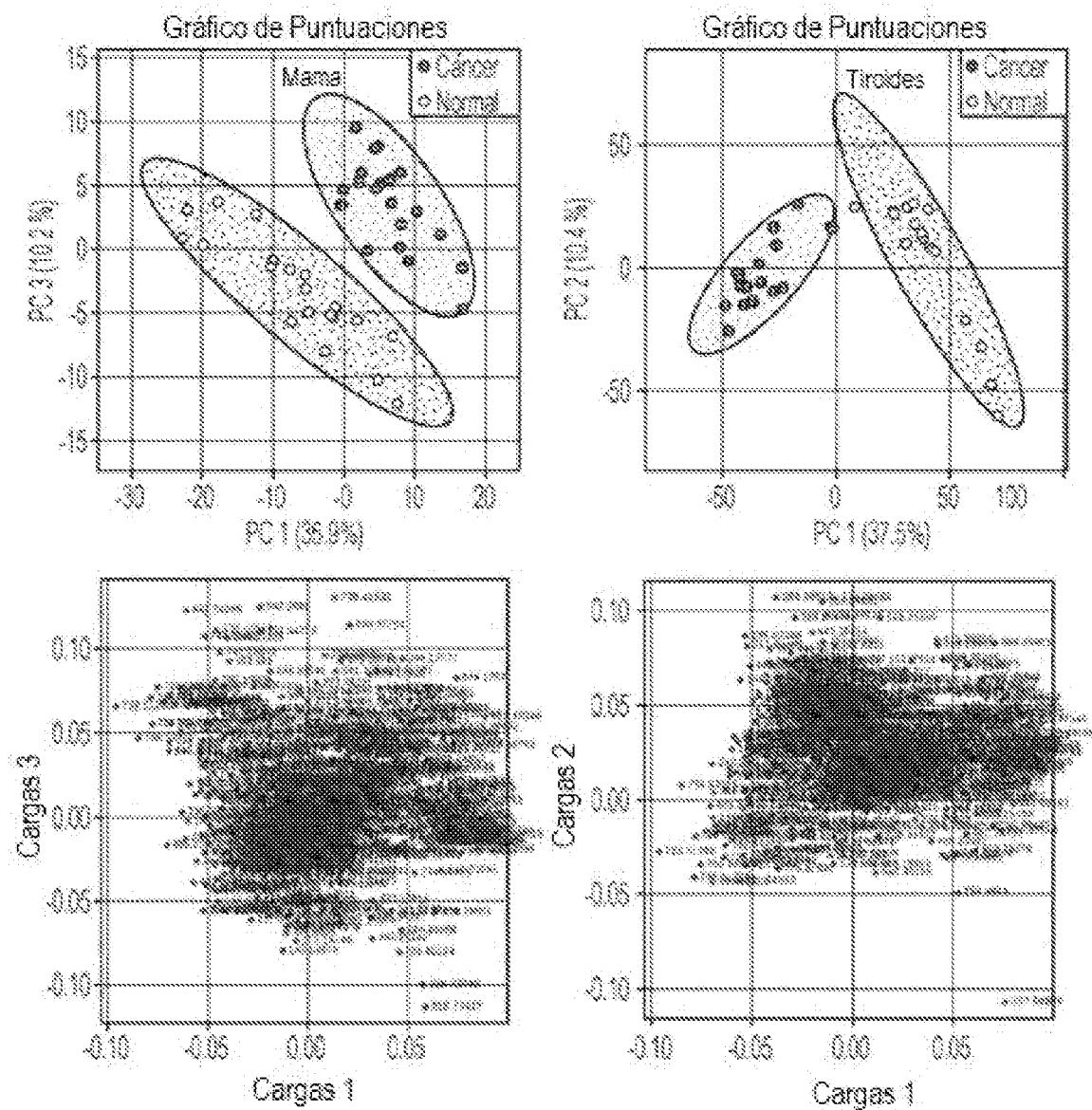


FIG. 9

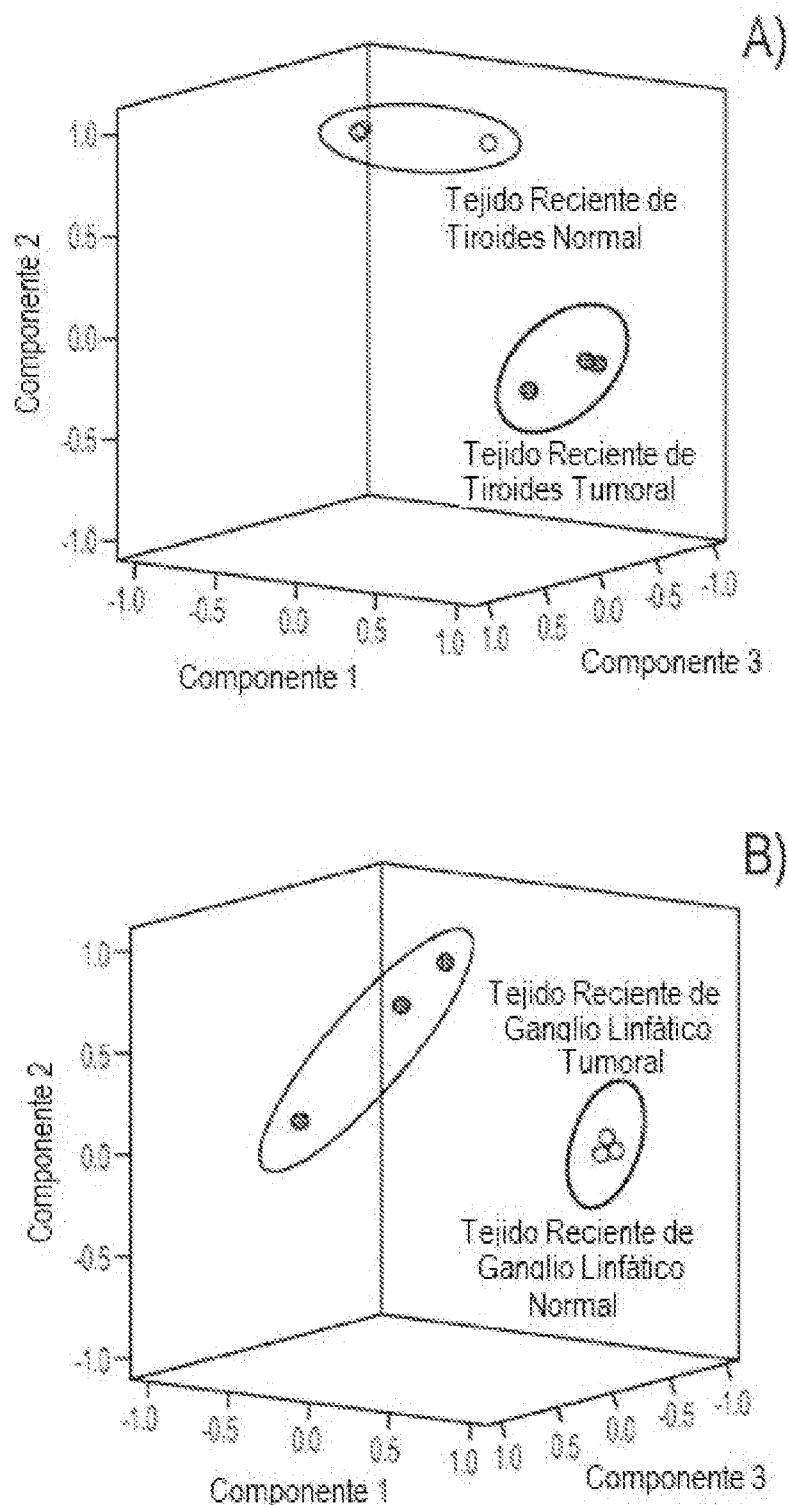


FIG. 10A-B

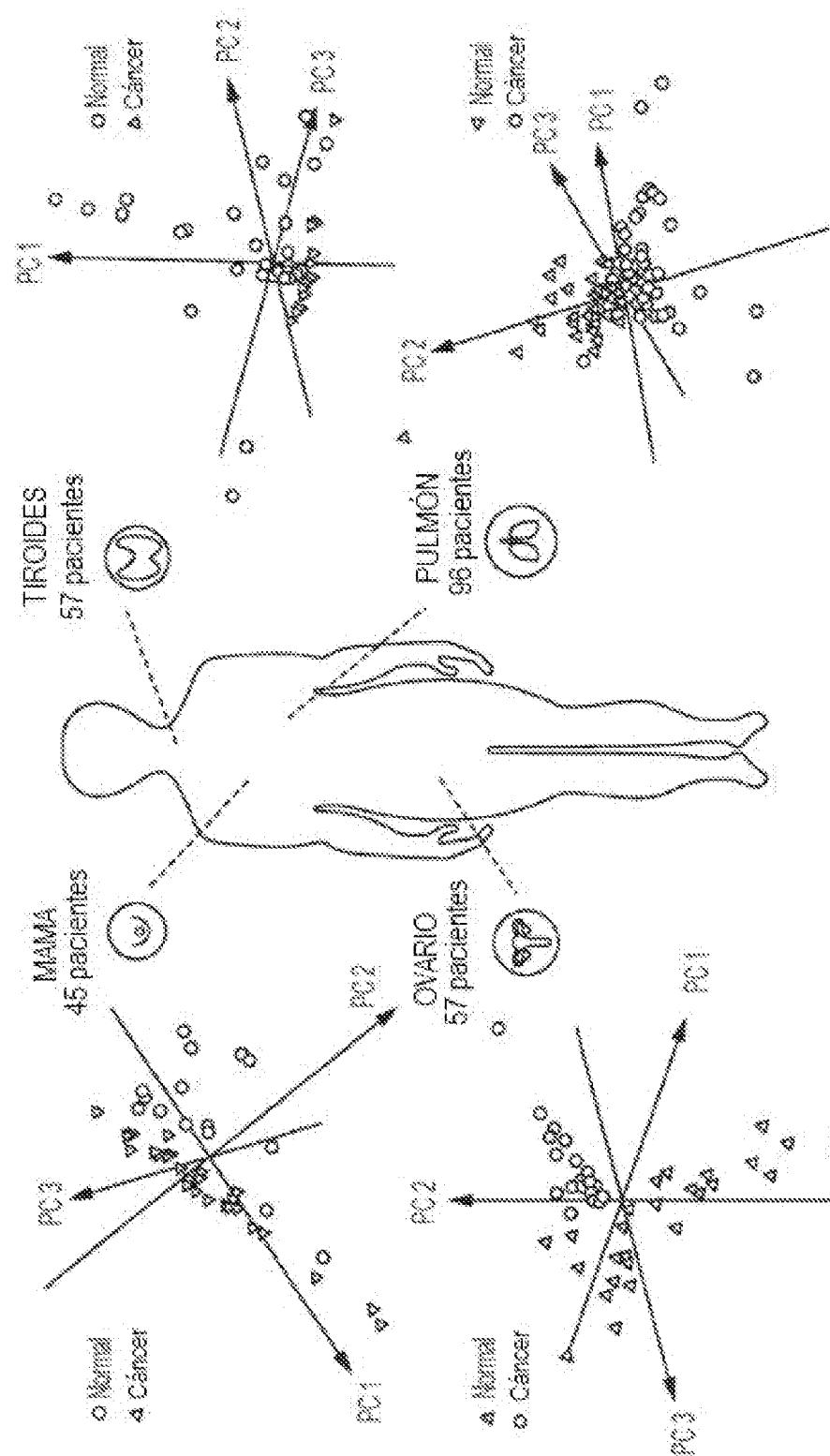


FIG. 11

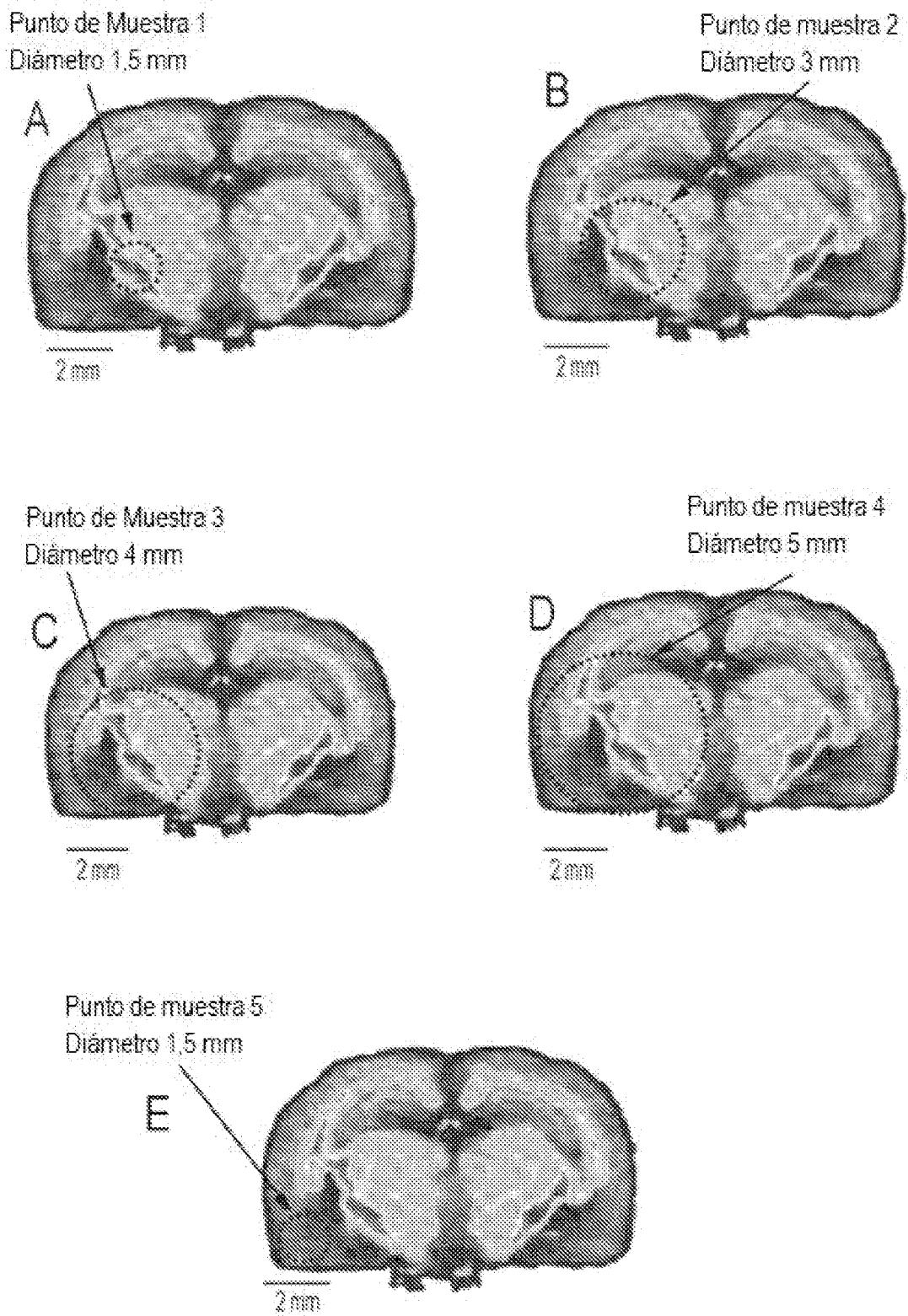


FIG. 12A-E

ES 2 971 214 T3

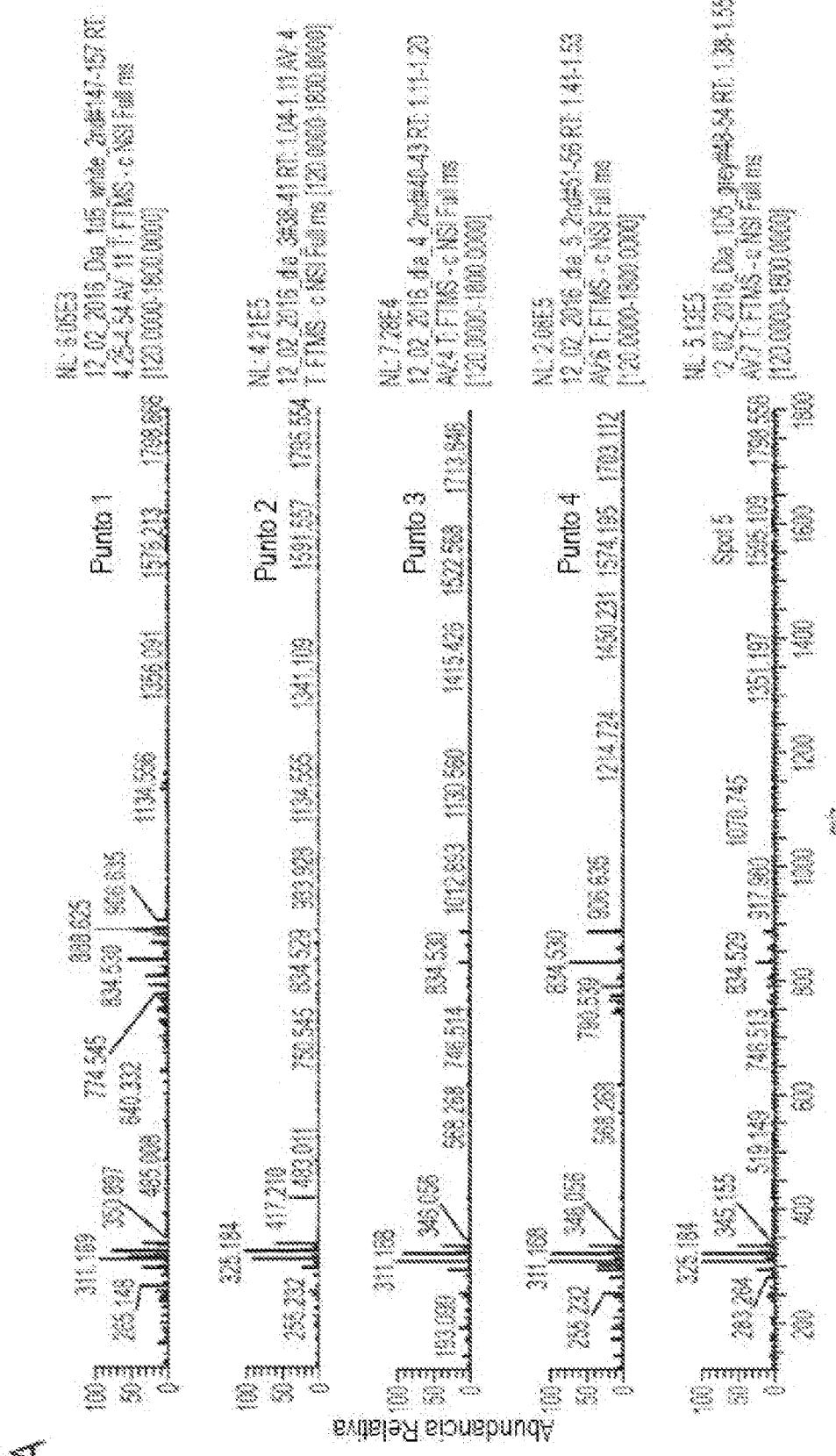
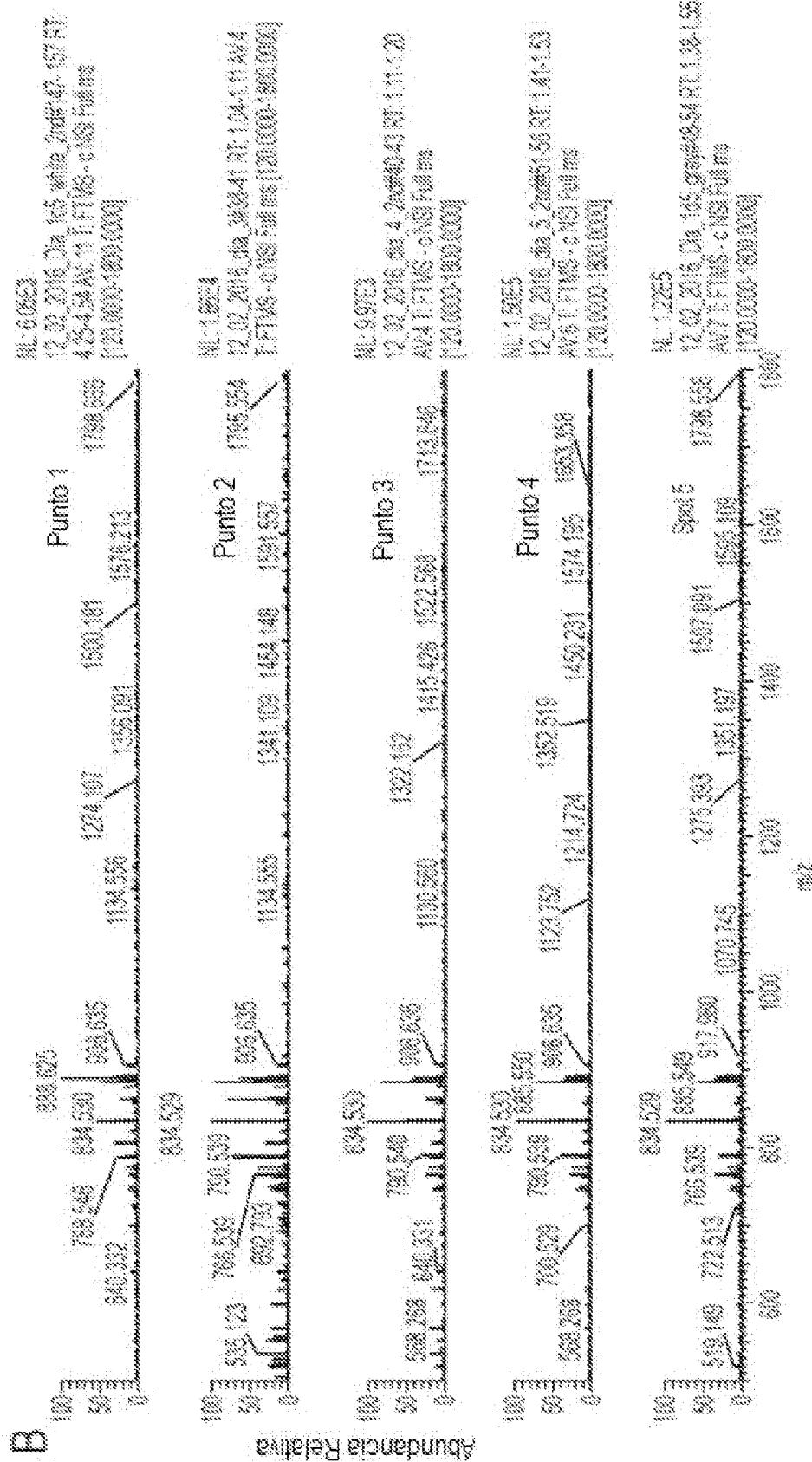


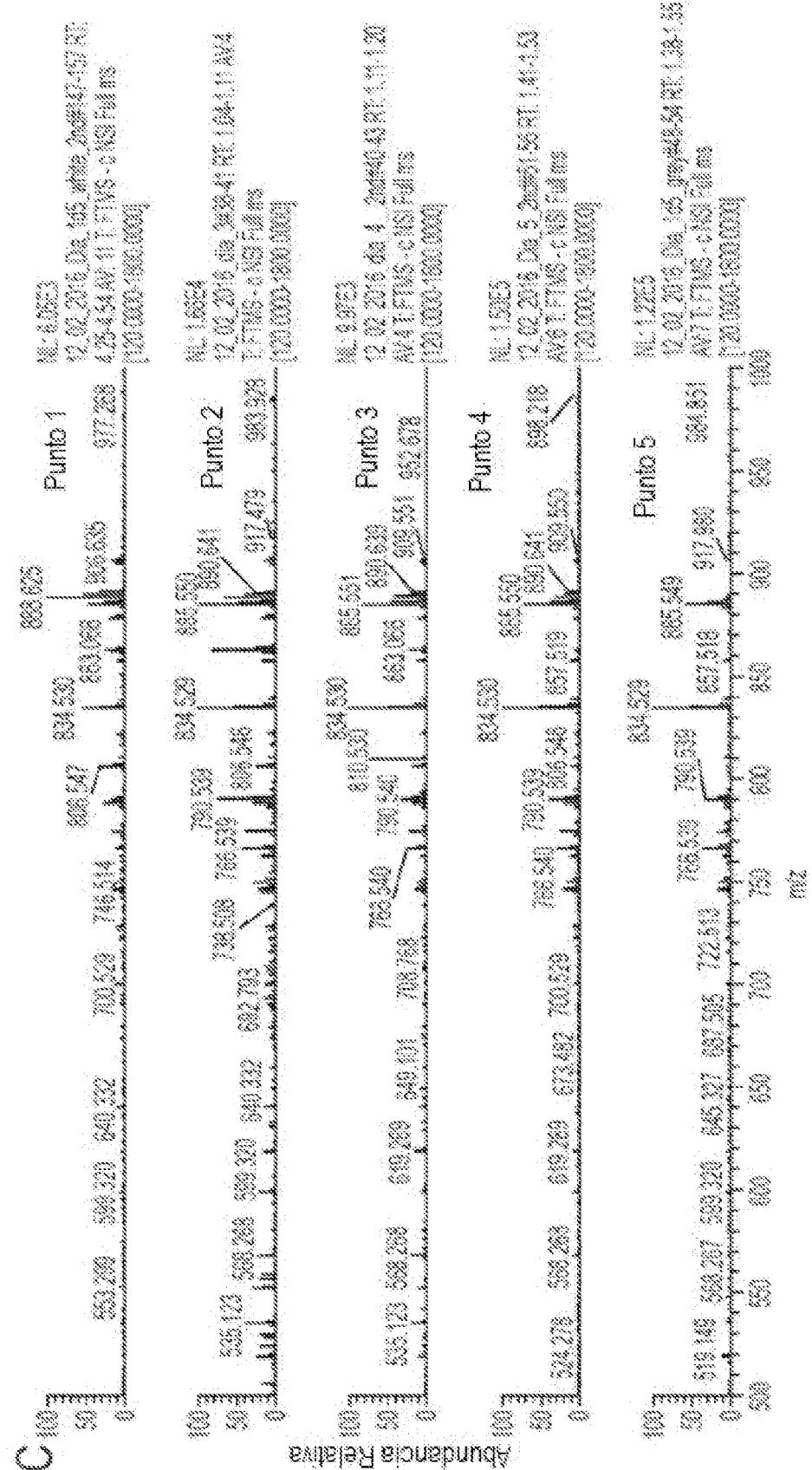
FIG. 13A

ES 2 971 214 T3



13

ES 2 971 214 T3



130

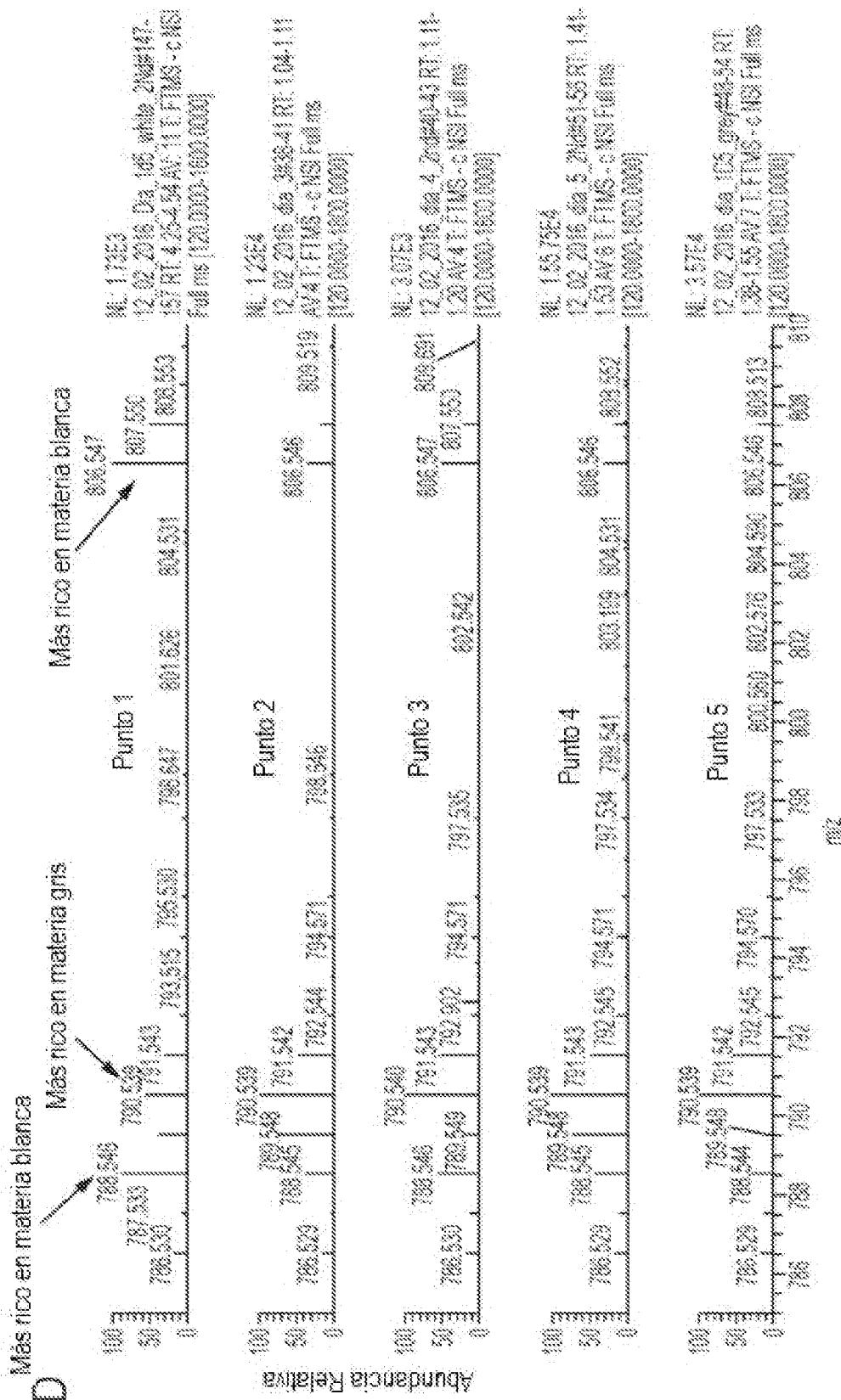
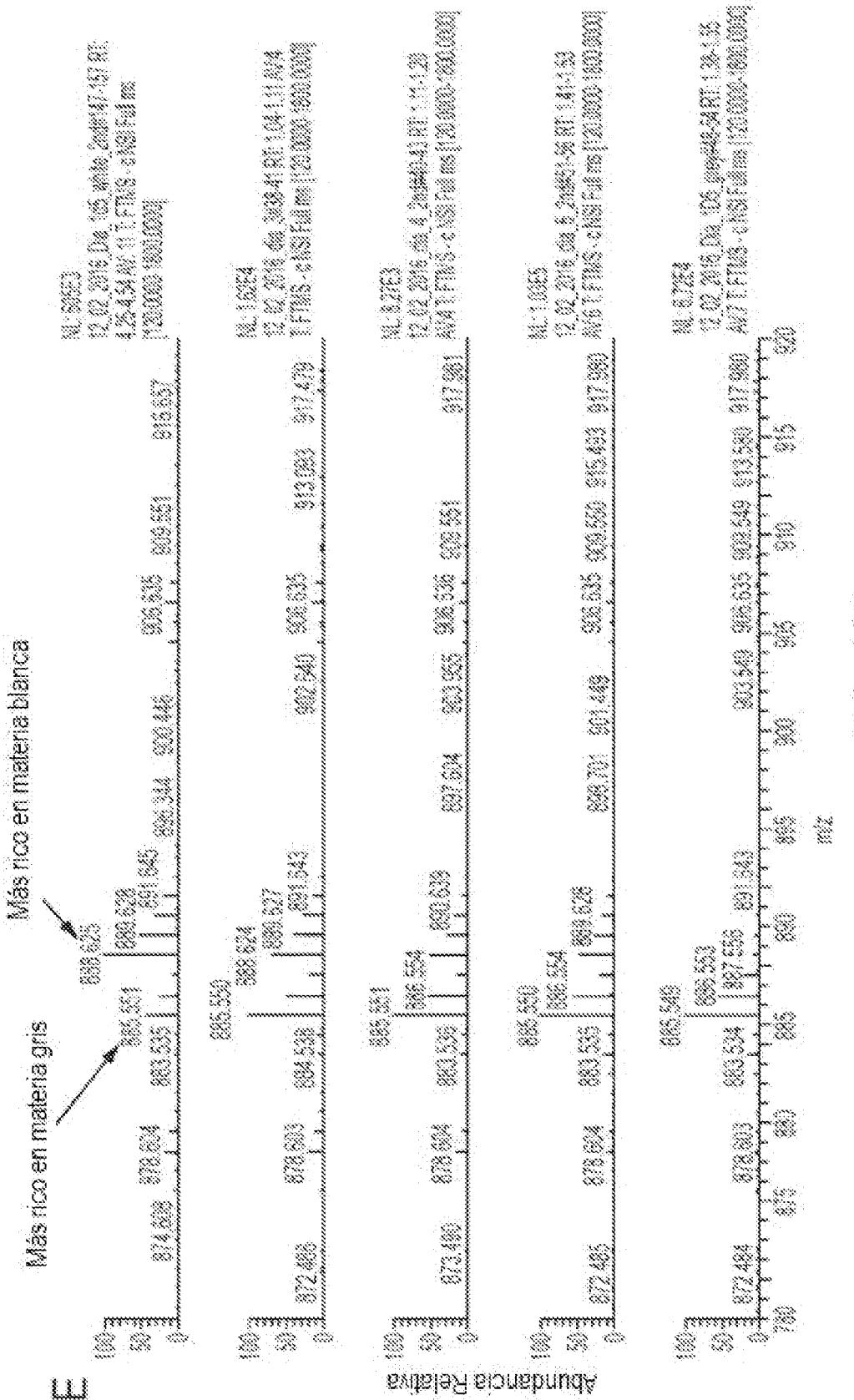


FIG. 13D

ES 2 971 214 T3



三
三
三

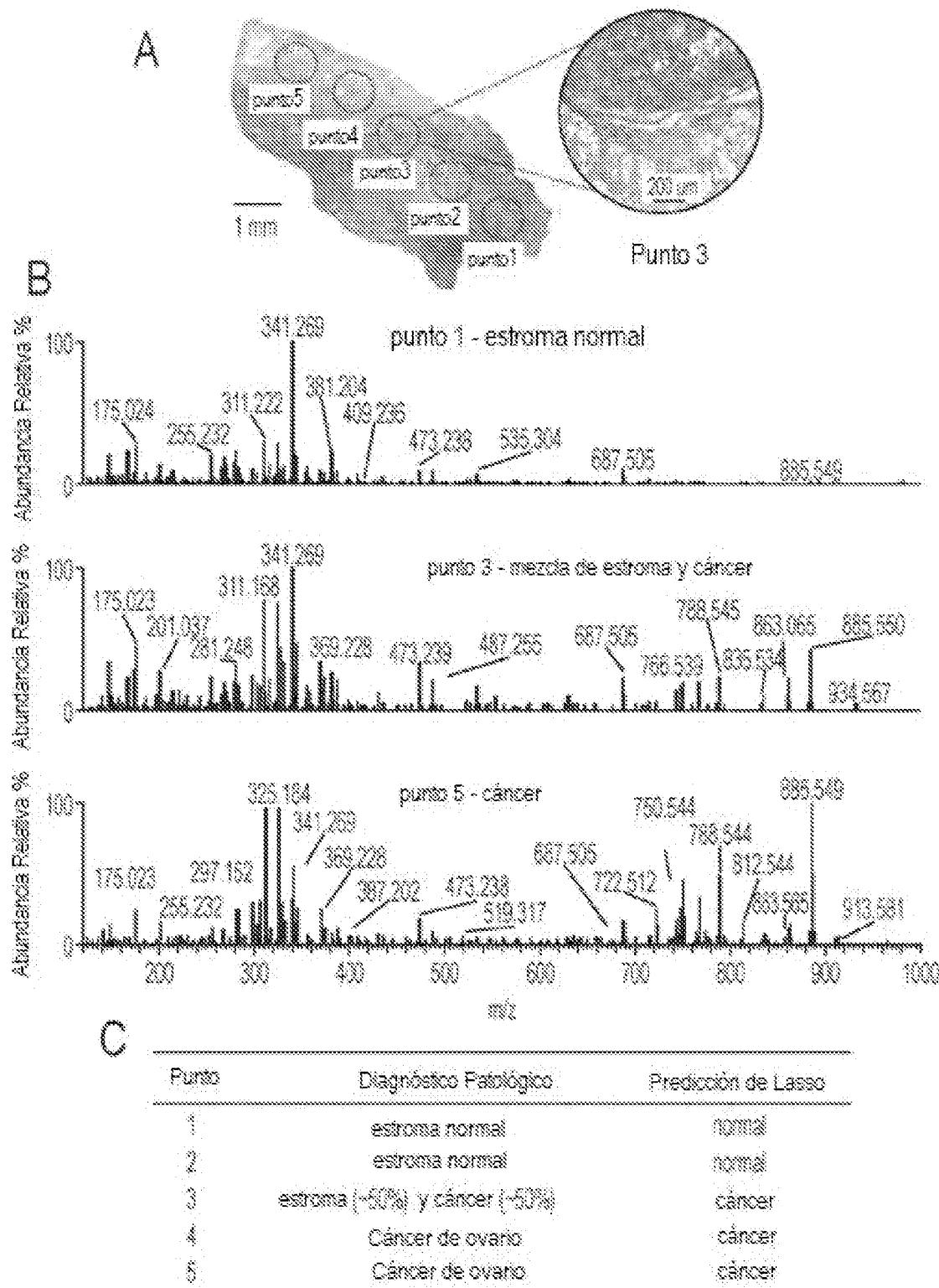


FIG. 14A-C

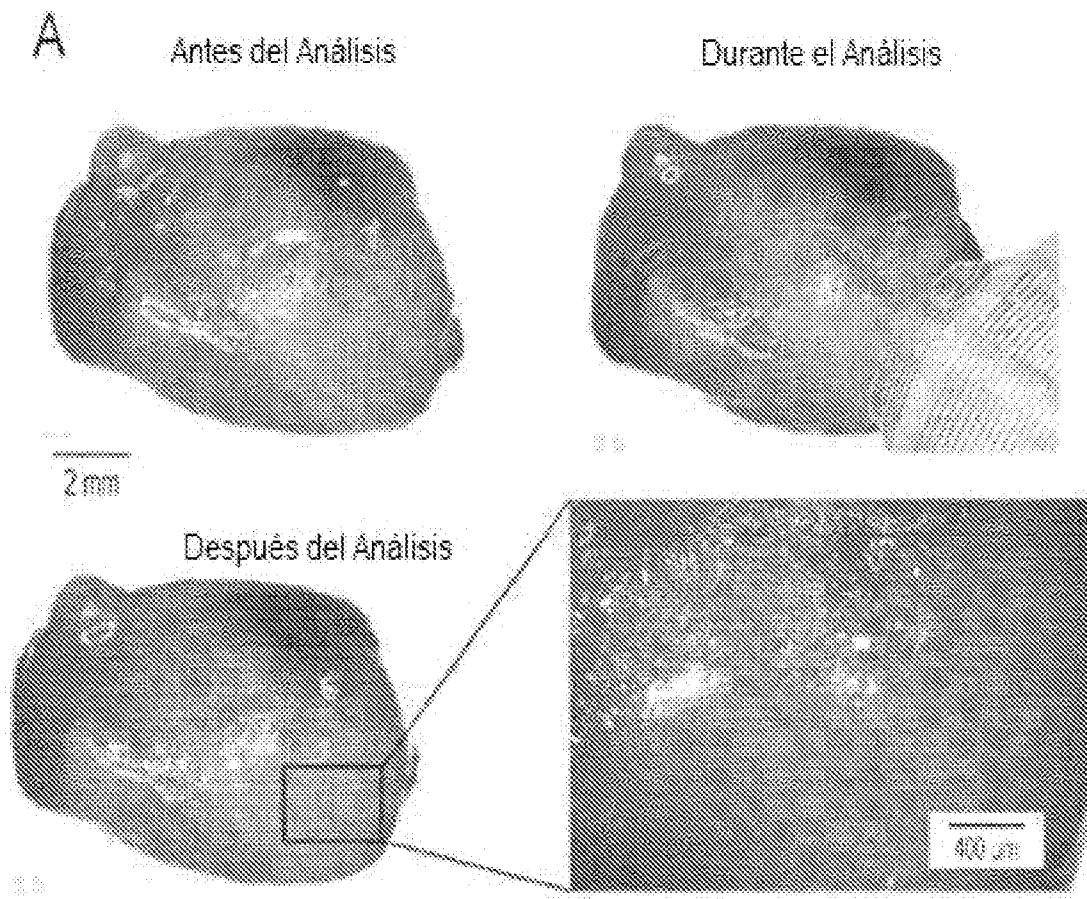


FIG. 15A-B

ES 2 971 214 T3

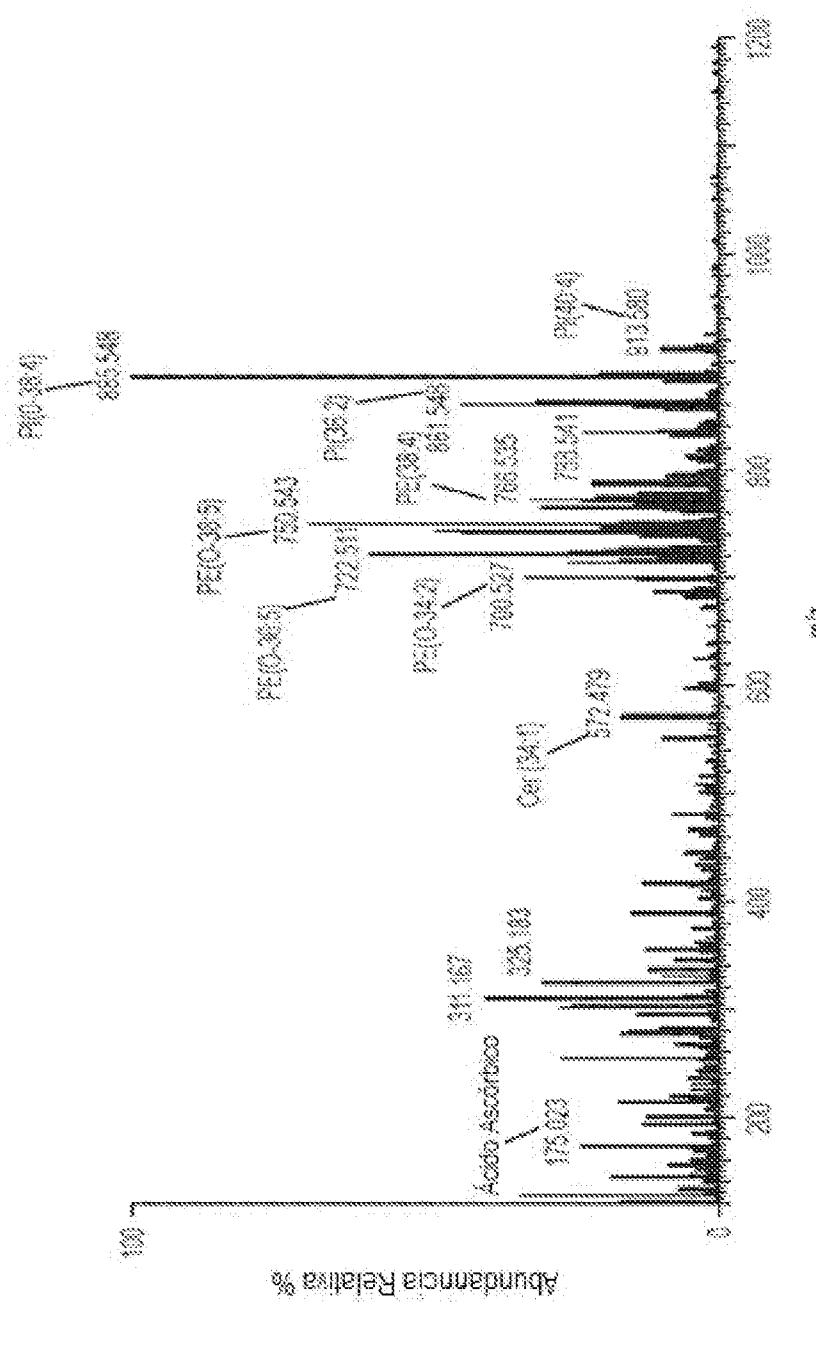


FIG. 15A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

ES 2 971 214 T3

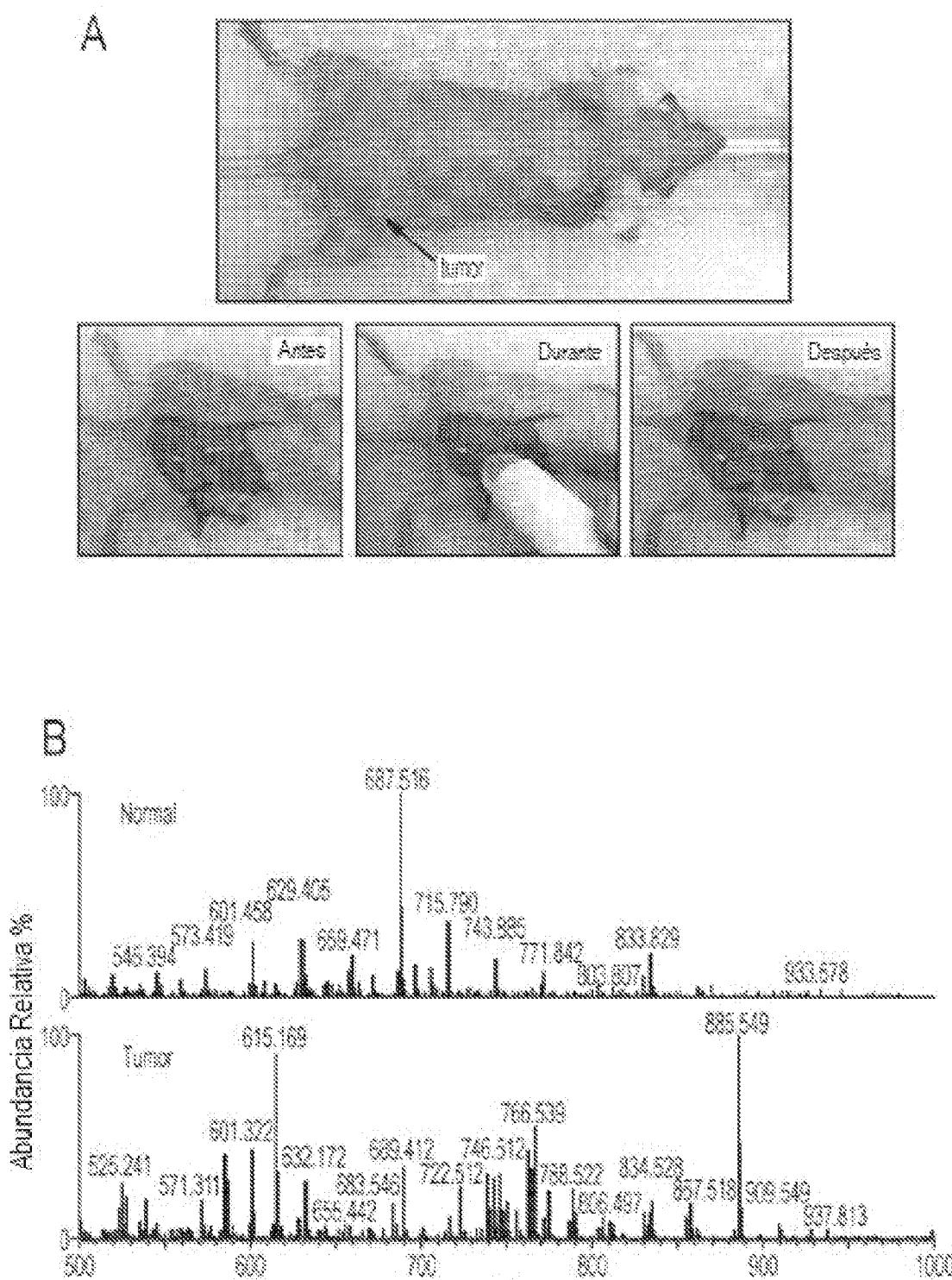


FIG. 16A-B

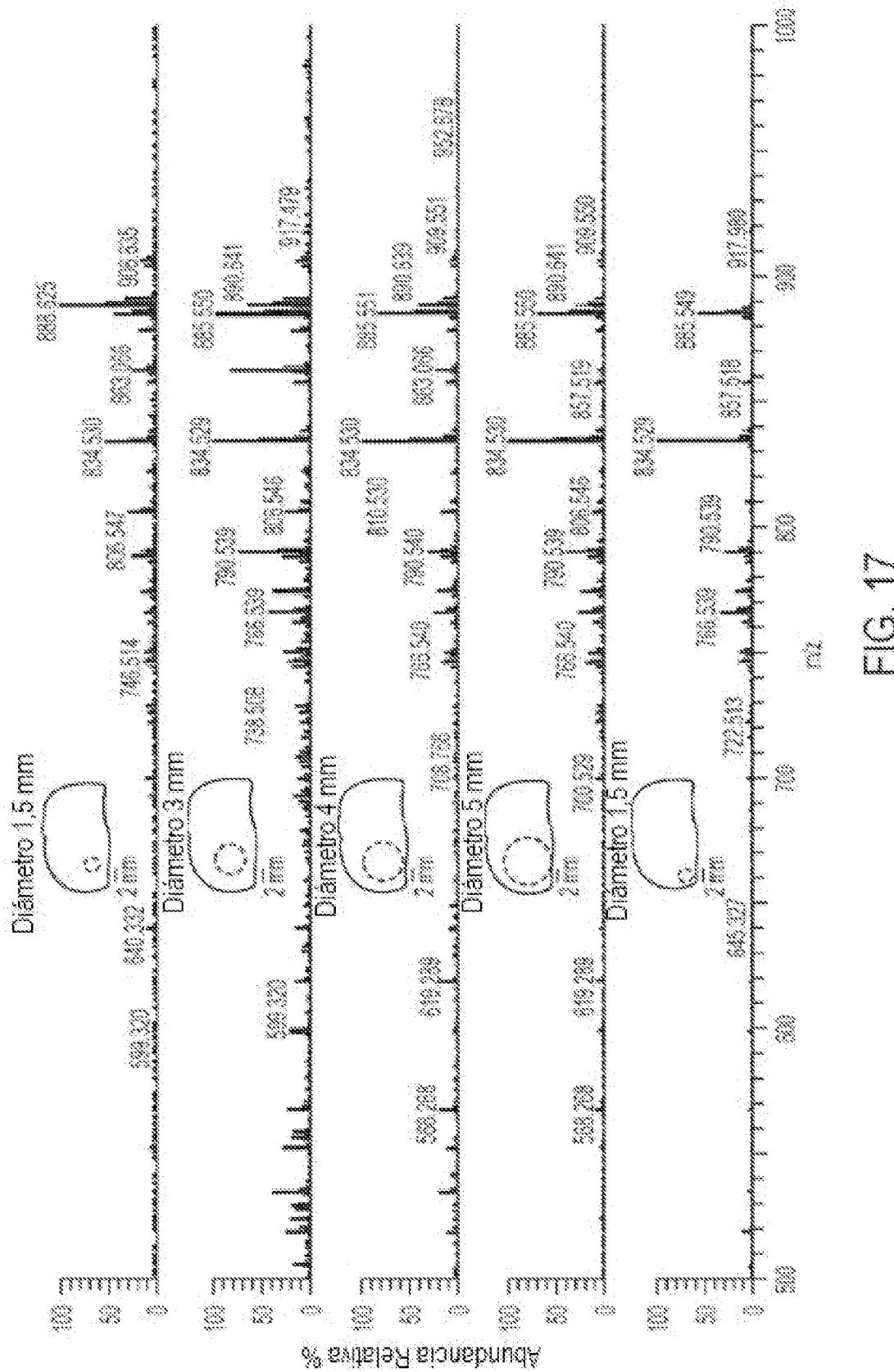


FIG. 17

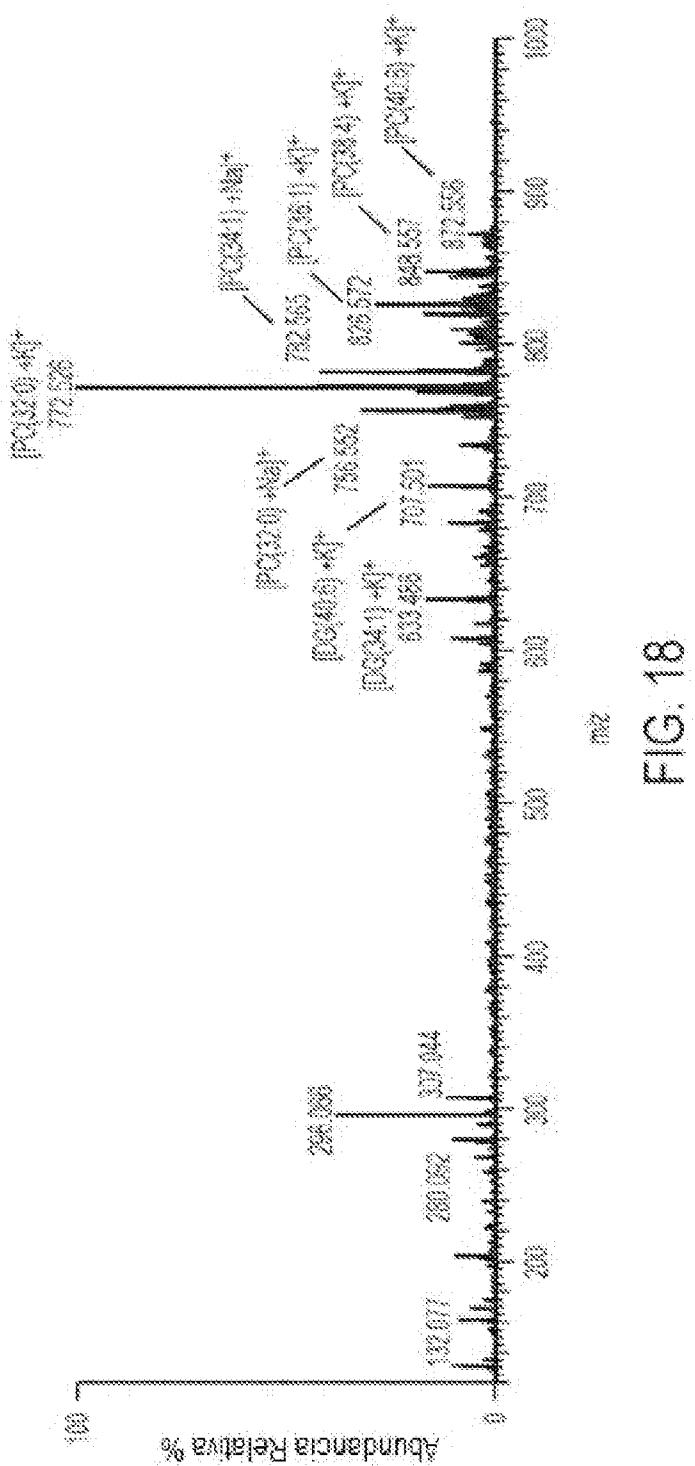


FIG. 18

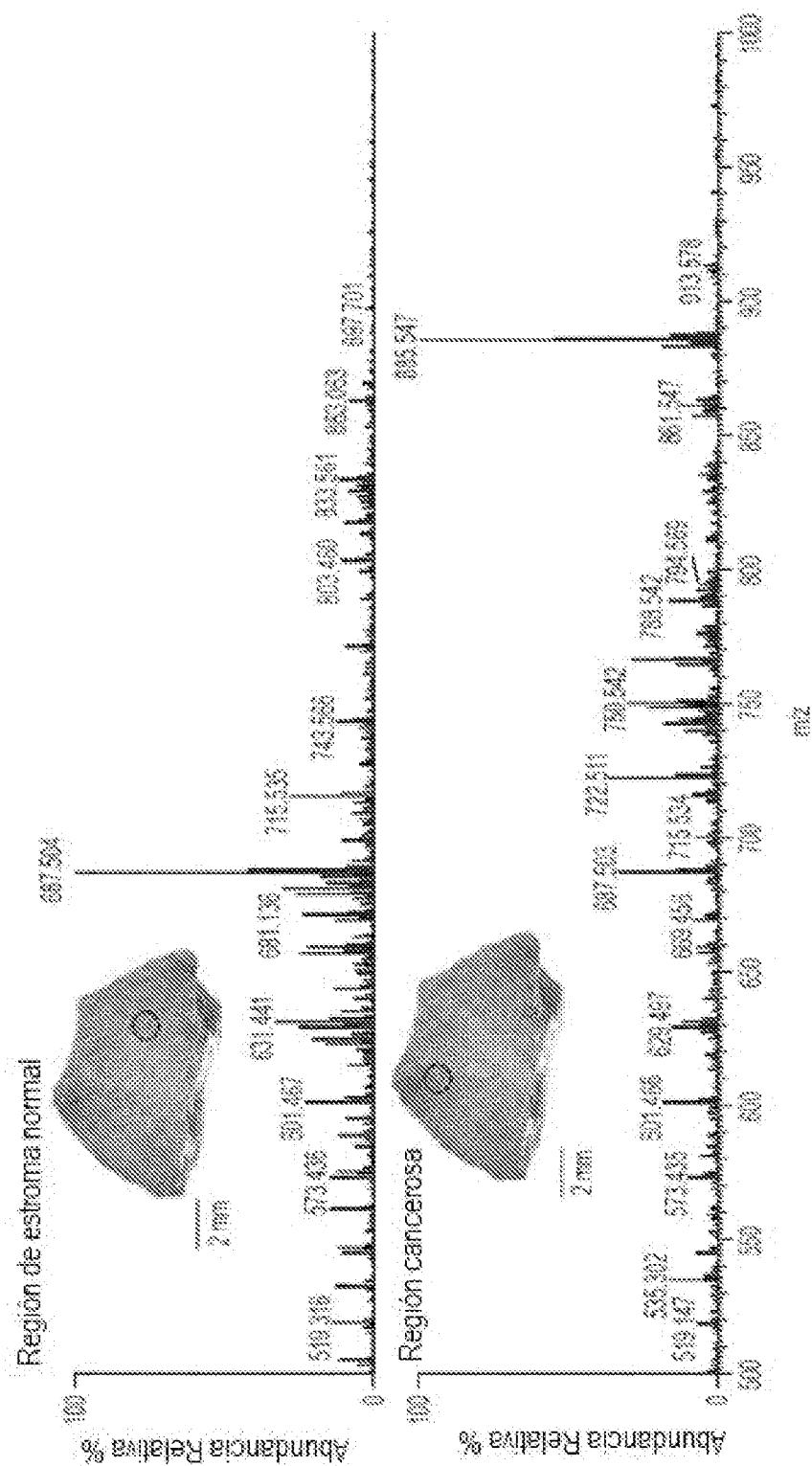


FIG. 19

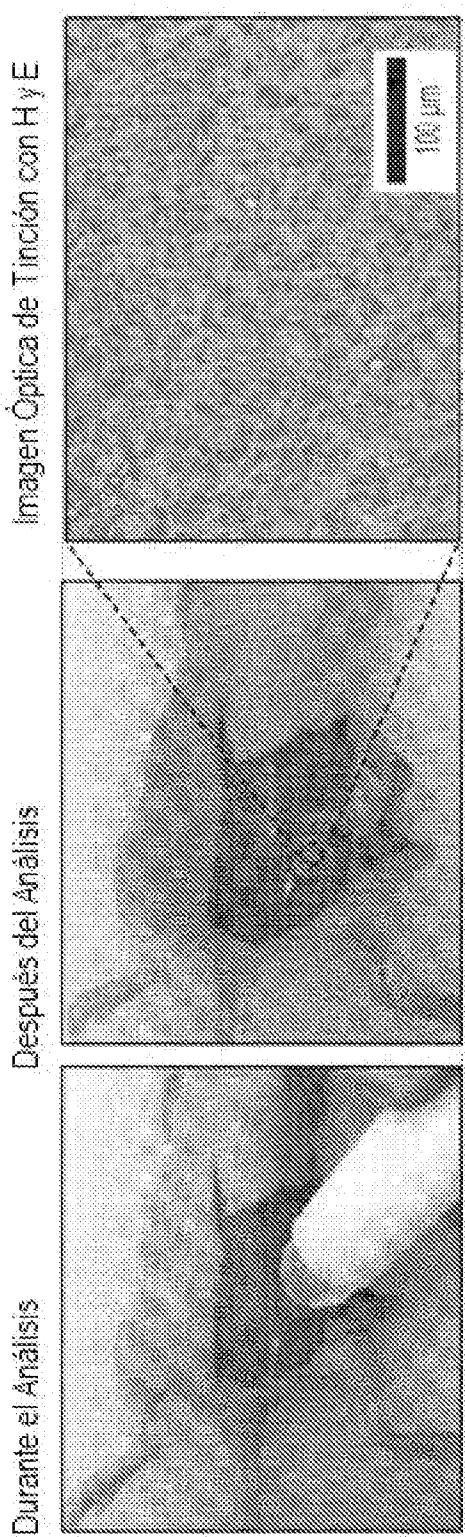


FIG. 20

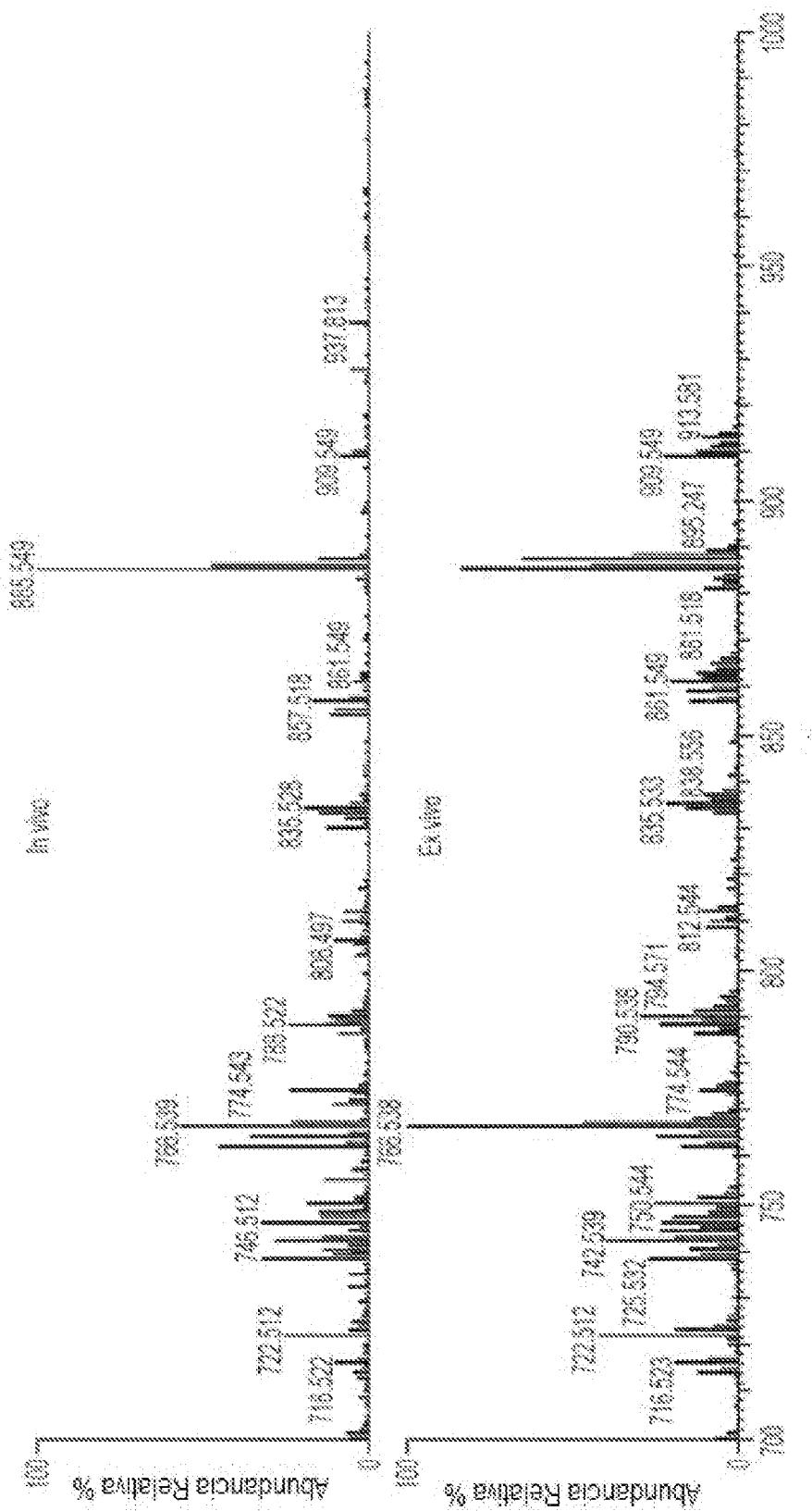


FIG. 21

