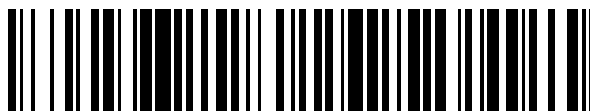


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 014**

51 Int. Cl.:

G01N 33/558 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2018** **E 18163229 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2019** **EP 3379251**

54 Título: **Dispositivo médico, procedimiento de inmunoensayo y ensayo para la detección de la retinopatía diabética proliferativa**

30 Prioridad:

22.03.2017 IT 201700031721

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

16.07.2020

73 Titular/es:

MEDICAL STRIPS SRL (100.0%)
Via Tempio del Cielo, 1/3/5
00144 Roma, IT

72 Inventor/es:

COSTAGLIOLA, CIRO;
GELSO, ALDO;
PORCELLINI, ANTONIO;
TECCE, MARIO FELICE y
DELL'OMO, ROBERTO

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 774 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Dispositivo médico, procedimiento de inmunoensayo y ensayo para la detección de la retinopatía diabética proliferativa

Campo de la invención

5 En su aspecto más general, la presente invención se refiere al campo médico y en particular la invención se refiere a un dispositivo médico, un procedimiento de inmunoensayo y un ensayo para la detección (diagnóstico) de la retinopatía diabética proliferativa en un paciente.

Estado de la técnica

La diabetes mellitus, a la que se hace referencia a menudo solo con el término diabetes se caracteriza por la presencia de altos niveles de glucosa en la sangre (hiperglucemia) y debido a una cantidad o función alteradas de la insulina.

10 La insulina es una hormona producida por el páncreas, que permite que la glucosa entre en las células y su uso posterior como fuente de energía. Cuando este mecanismo se altera, la glucosa se acumula en la circulación sanguínea.

La diabetes mellitus se distingue en diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2.

15 La diabetes tipo 1 está causada por el fallo en la producción de insulina endógena y afecta aproximadamente al 10 % de los pacientes. La diabetes tipo 2, a su vez, está producida por una producción de insulina insuficiente y/o por la incapacidad de las células diana para responder a la insulina y afecta aproximadamente al 90 % de los pacientes diabéticos, constituyendo así la forma más difundida de la enfermedad.

20 Las causas de la diabetes mellitus no han identificado y definido completamente, sin embargo, se ha descubierto que la diabetes tipo 2 se desarrolla en general después de los 40 años de edad, aunque se han observado casos en pacientes significativamente más jóvenes.

También se ha descubierto que algunos factores favorecen el desarrollo de diabetes tipo 2, tal como la familia (el 40 % de los pacientes diabéticos, tiene un pariente de primer grado con la misma enfermedad), el estilo de vida (una vida sedentaria y la obesidad) y el aumento de la esperanza de vida.

25 Además, se ha descubierto que la prevalencia de la diabetes de tipo 2 es específica de la edad: menor del 10 % hasta los 60 años de edad, variando del 10 % al 20 % entre los 60 y 69 años de edad, variando desde el 15 % al 20 % más allá de los 70 años de edad.

Basándose en estos datos, en Europa el riesgo de desarrollo de diabetes mellitus es alrededor del 30-40 % (DECODE Study Group, Diabetes Care, 2003, 26, 61).

30 Actualmente, los pacientes que padecen diabetes mellitus son aproximadamente 371 millones en todo el mundo, y se supone que este valor aumentará de acuerdo con las previsiones que estiman que estarán afectados 500 millones de pacientes en 2030 (The diabetes pandemic. Lancet. 9 de julio de 2011; 378: 99), una pandemia real.

De acuerdo con los últimos datos disponibles, en Italia, la gente que padece diabetes mellitus excedía los 3 millos, de los que el 90 % padecía de diabetes tipo 2, con una prevalencia del 5,5 % y un aumento del 45 % con respecto a los datos de 2000.

35 A lo anterior se tiene que añadir que el número de personas afectadas por diabetes mellitus no diagnosticadas se estima aproximadamente en 1 millón y el número de personas que padecen prediabetes mellitus, es decir, padecen intolerancia a la glucosa o glucemia alterada sin alimentación (Consoli A., Italian Barometer Diabetes Report 2013, Italian Barometer Diabetes Observatory Foundation) se estima en aproximadamente 2,6 millones.

40 La prevalencia de la diabetes mellitus aumenta con la edad y en las personas de 75 años de edad o más, adicionalmente, la diabetes mellitus en Italia alcanza el 20,3 %, de manera análoga a lo que ocurre en el resto del mundo (Istat, 2012).

Considerando la distribución geográfica en Italia, la prevalencia de diabetes mellitus aumenta de Norte a Sur: Un 4,9 % en Italia del Norte - un 5,5 % en el Centro de Italia - un 6,2 % en Italia del Sur y las Islas.

45 Se ha observado también que el sexo femenino y que pertenece a las clases sociales más bajas (indicador de obesidad y actividad física reducida) aumenta el riesgo de diabetes mellitus.

50 Las complicaciones degenerativas crónicas de la diabetes mellitus son predominantemente vasculares y neurológicas: macroangiopatía, microangiopatía y neuropatía. Entre ellas la microangiopatía es ciertamente la más sutil, que soporta todas las alteraciones anatómicas y funcionales que son la base del daño orgánico y que se materializa entonces clínicamente en un gran número de afecciones mórbidas más importantes, como el infarto de miocardio agudo, enfermedad cardíaca isquémica crónica, fallo cardíaco, ictus cerebral, fallo renal crónico, retinopatía, demencia

vascular, etc.

La retinopatía diabética es una complicación grave de la diabetes mellitus que afecta la retina y, en edad de trabajo, es la primera causa de hipovisión y ceguera en los países industrializados.

5 Se estima que se ha diagnosticado una retinopatía en aproximadamente un tercio de los diabéticos. Los síntomas relacionados con esto aparecen a menudo tarde, cuando las lesiones ya están avanzadas y a menudo limita la eficacia de los tratamientos relacionados.

La retinopatía diabética es una causa importante de ceguera y se produce como resultado de un daño acumulado por la carga de largo recorrido en los vasos sanguíneos pequeños de la retina. La retinopatía diabética es responsable de aproximadamente el 2 % de alteración visual (moderada o grave) y del 2,6 % de ceguera en 2010.

10 Se estima que la prevalencia de cada tipo de retinopatía en las personas que padecen de diabetes es del 35 % mientras que la forma proliferativa de la retinopatía diabética (la más peligrosa para la vista) es igual a aproximadamente un 7 % (Wong TY y col, MESA Study, AJO, 2006).

15 Los principales factores de riesgo asociados con una aparición más temprana y rápida de la retinopatía diabética son la duración de la diabetes mellitus, el fallo glucémico y la posible hipertensión arterial concomitante, tanto en pacientes que padecen diabetes tipo 1 como los que padecen diabetes tipo 2.

La ceguera producida por la retinopatía diabética podría evitarse en más de la mitad de los casos si se implementara una información correcta del paciente y formas adecuadas de educación sanitaria, que son fundamentales para el éxito de cualquier política de prevención del daño visual en pacientes afectados por diabetes mellitus.

20 La exploración de las complicaciones oftálmicas, con técnicas que han demostrado que tienen eficacia y utilizadas por personal entrenado, permite la detección precoz de la retinopatía diabética de alto riesgo y así prevenir la pérdida de visión. Sin embargo, el coste para realizar una exploración fiable es alto.

25 Recientemente, se han publicado los datos de los costes anteriores, de acuerdo con los cuales el coste por cada individuo analizado es aproximadamente de 100 \$ (dólares americanos), mientras que cada anomalía ocular reseñada afecta aproximadamente unos 200 \$, y la detección de un paciente que padece retinopatía diabética implica un coste de aproximadamente 500 \$ (Byrne MM, Parker DF, Tannenbaum SL, Ocasio MA, Lam BL, Zimmer-Galler I, Lee DJ. Cost of a community-based diabetic retinopathy screening program. Diabetes Care. 2014; 37: e236-7).

30 Estos costes son apenas sostenibles, también debido a que la exploración se debería repetir cada 2 años, en la población de ambos sexos desde los 40 años de edad (Lund SH, Aspelund T, Kirby P, Russell G, Einarsson S, Pálsson O, Stefansson E. Individualized risk assessment for diabetic retinopathy and optimization of screening intervals: a scientific approach to reducing healthcare costs. Br J Ophthalmol. 2016; 100: 683-7).

El objetivo de la exploración es anticipar el diagnóstico de la retinopatía diabética de manera que se mejore su pronóstico. Sin embargo, es una práctica cuya eficacia está fuertemente influenciada por el porcentaje de suscripciones, a su vez determinado también por el número de la población estudiada.

35 Cuanto más amplia sea la población más difícil será alcanzar altos porcentajes de suscripciones. Se utilizan grandes recursos para examinar mucha gente sana con el fin de encontrar los pocos que están enfermos. Por esta razón, incluso la más pequeña reducción de costes tiene un impacto significativo.

40 Una ayuda para este problema ha llegado con las recientes metodologías de telemedicina aplicadas a la oftalmología. La telemedicina consiste en el envío de fotos de los ojos de los pacientes a un centro de lectura manejado por un personal entrenado para el reconocimiento de los signos de retinopatía diabética, de manera que se detecten los sujetos que se someten a una evaluación en profundidad y para el posible inicio de los tratamientos relacionados.

45 Las metodologías de exploración automática anteriores para la retinopatía diabética, a pesar de representar una inmensa oportunidad para manejar la demanda creciente de diagnósticos retinianos, no está completamente validada aún por el mundo científico (Sim DA, Mitry D, Alexander P, Mapani A, Goverdhan S, Aslam T, Tufail A, Egan CA, Keane PA. The Evolution of Teleophthalmology Programs in the United Kingdom: Beyond Diabetic Retinopathy Screening. J Diabetes Sci Technol. 2016; 10: 308-17).

Además, siguen existiendo los problemas del coste de la cámara para la adquisición de imágenes, la lectura por personal especializado, y en último lugar, pero no menos importante, la seguridad y privacidad de la transmisión de datos.

50 Por lo tanto, actualmente, en la técnica conocida sigue estando esencialmente insatisfecha la necesidad de una solución rápida, barata y repetible para un diagnóstico precoz de la retinopatía diabética proliferativa.

El documento US 2011/269248 desvela bio-marcadores para el diagnóstico de la retinopatía diabética, el uso de proteínas, cuyo nivel de expresión está regulado negativamente o regulado positivamente en las lágrimas de un paciente con retinopatía diabética no proliferativa (NPDR), como bio-marcadores para el diagnóstico de la retinopatía

diabética y una composición y un kit para diagnosticar la retinopatía diabética que comprende anticuerpos contra dichas proteínas.

5 WANG JHIH-CHENG Y COL: "Detection of low-abundance biomarker lipocalin 1 for diabetic retinopathy using optoelectrokinetic bead-based immunosensing", BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, ELSEVIER BV, NL, vol. 89, 10 de noviembre de 2016 (2016-11-10) páginas 701-709, el documento XP029844943, desvela una técnica de inmunosensibilización basada en perlas optoelectrocínicas para detectar el biomarcador LCN1 de la retinopatía diabética.

10 CSOSZ EVA Y COL: "Diabetic retinopathy: Proteomic approaches to help the differential diagnosis and to understand the underlying molecular mechanism", JOURNAL OF PROTEOMICS, vol. 150, páginas 351-358, el documento XP029814809, desvela la administración de técnicas proteómicas avanzadas utilizadas en estudios de biomarcadores en las lágrimas y los biomarcadores identificados con potencial para mejorar los procedimientos de exploración ya existentes para la detección de retinopatía diabética.

Sumario de la invención

15 El problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar los medios para la detección de la retinopatía diabética en un paciente, o cualquier medio para una exploración de la retinopatía diabética proliferativa, capaz de superar uno o más de los obstáculos mencionados anteriormente con respecto a la técnica conocida.

Dentro del ámbito de algunas realizaciones de la presente invención, el problema mencionado anteriormente se resuelve mediante un procedimiento para la detección de la retinopatía diabética en un paciente que comprende las etapas de:

20 proporcionar una muestra biológica de un paciente, en el que dicha muestra se toma del fluido lagrimal de dicho paciente;
 verificar si los valores de umbral predeterminados de las tres proteínas predeterminadas que se corresponden con: TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina, están en exceso en la muestra mencionada anteriormente, en la que el exceso de al menos dos de los tres de los valores del umbral mencionado anteriormente es indicativo de la
 25 presencia, o la posible presencia de retinopatía diabética proliferativa en el paciente mencionado anteriormente, en la cual la etapa de verificación de la muestra mencionada anteriormente no se lleva a cabo en el cuerpo del mencionado paciente, es decir, no se lleva a cabo en el cuerpo humano.

Se ha detectado que los valores del umbral mencionado en el fluido lagrimal del paciente son los siguientes valores preferidos: 3 pg/ml para el TNF-alfa, 1,6 mg/ml para la Lipocalina-1 y 2,7 mg/ml para la lactoferrina.

30 De hecho, los autores de la presente invención han descubierto, en el fluido lagrimal de una muestra de pacientes afectados por diabetes mellitus, que las concentraciones de las proteínas TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1 son mayores en una población de la muestra mencionada afectada por retinopatía diabética proliferativa, y han determinado adicionalmente valores de umbral de la concentración para cada una de las proteínas mencionadas, por encima de los cuales, o mejor por encima de al menos alguno de ellos, se puede considerar que un determinado
 35 paciente está afectado por una retinopatía diabética proliferativa, con una sensibilidad del procedimiento igual al 85 % y una especificidad del mismo igual al 70 % con respecto a la población no afectada por retinopatía proliferativa.

En particular, para un determinado paciente, el exceso de al menos dos de los valores del umbral mencionados, independientemente uno del otro, es un signo de la probable presencia en el paciente mencionado de la retinopatía diabética proliferativa, mientras que el exceso de los tres valores de umbral mencionados es un signo de que el
 40 paciente casi seguramente, si no con total seguridad, está afectado por retinopatía diabética proliferativa.

Dentro del ámbito de otras realizaciones de la presente invención, el problema mencionado se resuelve mediante un dispositivo médico que comprende tres vías, en el que cada vía se extiende entre una primera zona concebida para la recepción de la muestra en forma líquida y una zona final que tiene una parte absorbente, en el que cada vía comprende las siguientes zonas, que se extienden entre la primera zona mencionada y la zona final mencionada:

45 una zona intermedia, o zona de captura, cargada con una cantidad predeterminada de una proteína predeterminada, estando la proteína mencionada constituida por TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1 en las vías mencionadas respectivamente;
 una zona dispuesta corriente arriba de la zona intermedia mencionada, o zona de conjugado, cargada con un anticuerpo respectivo unido a un medio indicador, en el que el anticuerpo mencionado es específico para las
 50 proteínas TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1 en las vías mencionadas, respectivamente;
 una zona dispuesta corriente abajo de la zona intermedia mencionada, o zona de control, cargada con un anticuerpo anti-inmunoglobulina específico de la especie.

Preferentemente, el dispositivo mencionado comprende un soporte en el que se limitan y combinan las tres vías mencionadas.

55 Preferentemente, las tres vías mencionadas son vías capilares.

Preferentemente, las tres vías mencionadas son vías de flujo lateral.

Preferentemente, las tres vías mencionadas comprenden una capa de nitrocelulosa.

Preferentemente, el medio indicador mencionado comprende microperlas coloreadas.

Preferentemente, la proteína respectiva mencionada se carga en fase sólida en la zona de captura mencionada.

5 Preferentemente, el anticuerpo respectivo mencionado se carga en fase sólida en la zona de control mencionada.

Preferentemente, en la zona de captura mencionada de cada una de las rutas mencionadas, la proteína mencionada está presente respectivamente en cantidades mayores que las esperadas, excediendo así los valores de umbral mencionados.

10 Dentro del ámbito de otras realizaciones de la presente invención, el problema anterior se resuelve mediante un ensayo de inmunoensayo de las proteínas TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina para la detección de la retinopatía diabética en un paciente, que comprende:

proporcionar una muestra de fluido lagrimal de un paciente;

cargar la muestra mencionada en un dispositivo médico mencionado anteriormente;

15 verificar si los valores de umbral predeterminados de las tres proteínas predeterminadas que se corresponden con: TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina, están en exceso en la muestra mencionada anteriormente, en la que el exceso de al menos dos de los tres de los valores del umbral mencionado anteriormente es indicativo de la presencia, o la posible presencia de retinopatía diabética proliferativa en el paciente mencionado anteriormente, en la cual la etapa de verificación de la muestra mencionada anteriormente no se lleva a cabo en el cuerpo del mencionado paciente, es decir, no se lleva a cabo en el cuerpo humano.

20 Se ha detectado que los valores del umbral mencionados, particularmente en el fluido lagrimal de la muestra mencionada son los siguientes valores preferidos: 3 pg/ml para el TNF-alfa, 1,6 mg/ml para la Lipocalina-1 y 2,7 mg/ml para la lactoferrina.

Preferentemente, la muestra mencionada cargada en el dispositivo mencionado se toma de saliva, suero, plasma, orina, fluido lagrimal del paciente mencionado.

25 En la práctica, la presente invención proporciona: un medio que permite una exploración a gran escala para la detección en una etapa temprana, rápidamente y de manera repetida y con bajo coste, de la retinopatía diabética proliferativa.

Dentro del ámbito de la presente invención las expresiones: paciente, sujeto e individuo son intercambiable y significan un ser vivo, por ejemplo, un ser humano, del que proviene la muestra biológica mencionada.

30 **Breve descripción de las figuras**

Serán evidentes características y ventajas adicionales de la invención revisando la siguiente descripción detallada de algunas realizaciones preferidas, pero no exclusivas, representadas solo con fines de ilustración y sin limitación, con la ayuda de los dibujos adjuntos, en los que;

- 35 - la figura 1 representa esquemáticamente una vista desde arriba de una realización de un dispositivo médico para el diagnóstico de la retinopatía diabética proliferativa en un paciente, de acuerdo con la presente invención;
 - la figura 2 representa esquemáticamente un detalle a mayor escala del dispositivo de la figura 1;
 - la figura 3, en las imágenes a-f, muestra el análisis logístico, la curva ROC y la comparación de los valores descubiertos de un ensayo de inmunoensayo ELISA sobre placas multipocillo para la proteína TNF-alfa;
 - 40 - la figura 4, en las imágenes a-f, muestra el análisis logístico, las curva ROC y la comparación de los valores descubiertos de un ensayo de inmunoensayo ELISA sobre placas multipocillo para la proteína Lipocalina-1;
 - la figura 5, en las imágenes a-f, muestra el análisis logístico, las curva ROC y la comparación de los valores descubiertos de un ensayo de inmunoensayo ELISA sobre placas multipocillo para la proteína Lactoferrina;
 - la figura 6, en las imágenes a y b, muestra la especificidad y sensibilidad del ensayo de inmunoensayo para la detección de la retinopatía diabética proliferativa, llevándose a cabo el ensayo mediante un dispositivo médico de acuerdo con la presente invención, mediante tablas de contingencia a través de la comparación entre los sujetos sanos(control), sujetos diabéticos que no padecen la retinopatía diabética proliferativa, y los sujetos diabéticos que padecen la retinopatía proliferativa, en el que el dispositivo médico presenta una potencia diagnóstica igual a la de un ensayo ELISA.
- 45

Descripción detallada de la invención

50 En referencia a la figura 1, se señala un dispositivo médico de acuerdo con la presente invención como un todo por un 1.

El dispositivo 1 comprende un soporte 2 y tres vías 3, 4 y 5 combinadas entre ellas, y que se extienden sobre el soporte

2.

Las tres rutas **3**, **4** y **5** son esencialmente similares entre ellas y por lo tanto en la descripción relacionada se hace referencia solo a una vía, como se representa en el ejemplo de la figura 2.

5 En particular, el ejemplo de la figura 2 representa una vía que se extiende entre una primera zona **6** ideada para la recepción de una muestra en forma líquida, y una zona final **7**, en el que, para la recepción de la muestra en forma líquida, la primera zona **6** comprende una almohadilla porosa, mientras que, para completar la vía, la zona final **7** está equipada con una parte absorbente.

10 Entre la primera zona **6** y la zona final **7**, la vía representada en el ejemplo de la figura 2, y por lo tanto cada una de las vías **3**, **4** y **5** comprende una zona intermedia también identificada como la zona de captura y se señala mediante un **8**, que está cargada con una proteína predeterminada.

En detalle, en las vías **3**, **4** y **5** la zona de captura **8** está cargada respectivamente con TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1.

La cantidad de la proteína es: TNF-alfa no menos de 1 pg, Lactoferrina no menos de 200 µg y Lipocalina-1 no menos de 100 µg.

15 Entre la primera zona **6** y la zona de captura **8**, es decir, corriente arriba de la última, se incluye una zona de conjugado **9**, que está cargada con un anticuerpo respectivo unido a un medio indicador.

En detalle, en las vías **3**, **4** y **5** la zona de captura **9** está cargada respectivamente con un anticuerpo específico para la proteína TNF-alfa, proteína Lactoferrina y proteína Lipocalina-1, respectivamente.

20 Entre la zona de captura **8** y la zona final **7**, es decir, corriente abajo de la zona de captura **8**, se incluye una zona de control **10**, que está cargada con un anticuerpo anti-inmunoglobulina específico de la especie.

Además, se tiene que decir que preferentemente tanto las proteínas mencionadas como los anticuerpos mencionados se cargan en fase sólida en las zonas respectivas.

25 Como se representa en los ejemplos de las figuras, en cada ruta **3**, **4** y **5** se proporcionan adicionalmente zonas de separación y se representan mediante un **11**, que está dispuesta entre la primera zona **6** y la zona de conjugado **9**, entre la zona de conjugado **9** y la zona de captura **8**, entre la zona de captura **8** y la zona de control **10** y entre la zona de control **10** y la zona final **7**.

Además, en referencia a las tres vías **3**, **4** y **5** se tiene que añadir que preferentemente son vías capilares, e incluso más preferentemente son vías de flujo lateral.

30 Particularmente, las vías **3**, **4** y **5** comprenden, o están constituidas por una capa de nitrocelulosa que es ventajosa en la fabricación de rutas capilares, de flujo lateral.

35 En lo que se refiere al medio indicador mencionado, se tiene que decir que comprende preferentemente microperlas coloreadas, por ejemplo, del tipo de Estapor® Microspheres comercializadas por Merck Millipore, que son capaces - emitiendo un color - de resaltar la zona de captura y/o la zona de control. Si la zona de captura no se colorea y la zona de control se colorea, significa que la concentración de analito es mayor que la prefijada en el ensayo (ensayo positivo de retinopatía proliferativa); y viceversa, si ambas zonas de captura y control se colorean, el ensayo es negativo.

40 En la práctica, la realización representada en los ejemplos de las figuras 1 y 2 muestra un dispositivo médico que permite un diagnóstico precoz, o incluso un prediagnóstico, de la retinopatía diabética proliferativa mediante un procedimiento diagnóstico que tiene una alta sensibilidad y especificidad, simple de llevar a cabo y que tiene un bajo coste, que se puede utilizar para llevar a cabo una exploración a gran escala que consiste en un inmunoensayo rápido y simultáneo del fluido lagrimal o en otros fluido biológicos de las tres proteínas mencionadas, cuya concentración está relacionada con el progreso de la retinopatía diabética proliferativa, por lo que basándose en el exceso de los valores de umbral identificados adecuadamente, es posible identificar selectivamente, en un grupo de individuos, con una lectura instantánea como parte del examen clínico, los que se someterán a investigaciones oftalmológicas adicionales.

45 Por lo tanto, de acuerdo con lo anterior y de acuerdo con la presente invención, también se ha proporcionado un ensayo de inmunoensayo de las proteínas TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina para la detección de la retinopatía diabética proliferativa en un paciente, que comprende:

proporcionar una muestra de un líquido biológico de un paciente;
cargar la muestra en un dispositivo médico del tipo mencionado descrito en referencia a los ejemplos de las figuras 1 y 2;

50 verificar si los valores de umbral predeterminados de las tres proteínas predeterminadas que se corresponden con: TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina, están en exceso en la muestra, en la que el exceso de al menos dos de los tres de los valores del umbral mencionado anteriormente es indicativo de la presencia, o la posible presencia de retinopatía diabética proliferativa en el paciente, en la cual la etapa de verificación de la muestra no se lleva a cabo

en el cuerpo del paciente, es decir, no se lleva a cabo en el cuerpo humano.

Los tres valores de umbral preferidos, en particular en el fluido lagrimal del paciente, que se han detectado son: 3 pg/ml para el TNF-alfa, 1,6 mg/ml para la Lipocalina-1 y 2,7 mg/ml para la lactoferrina.

5 De cualquier manera, la muestra líquida puede estar constituida o tomarse, por ejemplo, de la saliva, suero, plasma u orina del paciente.

Se entiende que, de acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar dispositivos que sean diferentes de los representados en los ejemplos de las figuras 1 y 2, dado que la presente invención proporciona una correlación entre las concentraciones de las proteínas TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1 para la detección de sujetos (pacientes) que padecen una retinopatía diabética proliferativa, o si no, en riesgo de una retinopatía diabética proliferativa.

10 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, se proporciona también un procedimiento para la detección de la retinopatía diabética proliferativa en un paciente, que comprende las etapas de:

proporcionar una muestra biológica de un paciente, en el que dicha muestra se toma del fluido lagrimal de dicho paciente;

15 verificar si los valores de umbral predeterminados de las tres proteínas predeterminadas que se corresponden con TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina, están en exceso en la muestra mencionada, en la que el exceso de al menos dos de los tres de los valores del umbral mencionado anteriormente es indicativo de la presencia, o la posible presencia de retinopatía diabética proliferativa en el paciente mencionado, en la cual la etapa de verificación de la muestra no se lleva a cabo en el cuerpo del paciente, es decir, no se lleva a cabo en el cuerpo humano.

20 Los tres valores de umbral mencionados, en particular en el fluido lagrimal del paciente, que se han detectado son: 3 pg/ml para el TNF-alfa; 1,6 mg/ml para la Lipocalina-1 y 2,7 mg/ml para la Lactoferrina.

Para determinar los valores de umbral los inventores procedieron de la siguiente manera.

Ejemplo 1: Preparación de un ensayo de inmunoensayo ELISA en placas multipocillo para cada una de las proteínas TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina

- Preparación del inmunoensayo, ensayos, resultados.

25 Se han utilizado 90 pacientes diabéticos y 44 sujetos sanos. La clasificación de la retinopatía diabética se ha llevado a cabo de acuerdo con los criterios del ETDRS ("Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus-photographs-an extension of the modified Airlie House classification. Publicación de ETDRS número 10. Grupo de Investigación del Estudio de tratamiento precoz de la Retinopatía diabética", Ophthalmology, vol. 98, suplemento 5, pp. 786-806, 1991). Los pacientes diabéticos se dividieron en 2 grupos: 45 pacientes no presentaban retinopatía proliferativa, mientras que 45 pacientes se diagnosticaron como afectados por la retinopatía diabética proliferativa.

30 Se recolectó una secreción lagrimal de cada ojo de cada paciente utilizando una tira convencional de la prueba de Schirmer. La tira de papel graduado absorbente se posicionó en el fórnix conjuntival inferior, en el ángulo lateral, durante 5 minutos, a la espera que se humedeciera por capilaridad. Después de la retirada, la tira se transfirió inmediatamente a un tubo estéril marcado y congelado a -40 °C hasta el análisis. La parte húmeda de la tira de cada prueba de Schirmer se cortó entonces en pequeños trozos y se sumergió en 50 µl/5 mm de tampón salino (PBS) durante 3 h con el fin de eluir las proteínas lagrimales.

La proteína TNF-alfa se determinó utilizando una placa de 96 pocillos revestidos con un anticuerpo específico para el TNF-alfa humano (con una sensibilidad de 0,61 pg/ml), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ELISA de TNF-alfa humano SEA133Hu, USCN, distribuido por: DBA, Segrate-Milano, Italia).

40 La figura 3 muestra los análisis logísticos, la curva ROC y la comparación entre los promedios de los valores encontrados en los sujetos sanos (C), diabéticos afectados por retinopatía no proliferativa (NP) y diabéticos afectados por retinopatía proliferativa (P).

Se consideró normal un valor de TNF-alfa de hasta 3 pg/ml.

45 La proteína Lipocalina-1 se determinó utilizando una placa de 96 pocillos revestidos con un anticuerpo específico para la LCN1 humana (Lipocalina-1) (con una sensibilidad de 0,39 ng/ml), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ELISA CSB-EL012810, Cusabio, distribuido por: Space Import Export srl, Milano, Italia).

La figura 4 muestra los análisis logísticos, la curva ROC y la comparación entre los promedios de los valores encontrados en los sujetos sanos (C), diabéticos afectados por retinopatía no proliferativa (NP) y diabéticos afectados por retinopatía proliferativa (P).

50 Se consideró normal un valor de Lipocalina-1 de hasta 1,6 mg/ml.

La proteína Lactoferrina se determinó utilizando una placa de 96 pocillos revestidos con un anticuerpo específico para

la TFFL humana (Lactoferrina) (con una sensibilidad de 0,78 ng/ml), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (kit de ELISA CSB-E08831H, Cusabio, distribuido por: Space Import Export srl, Milano, Italia).

5 La figura 5 muestra los análisis logísticos, la curva ROC y la comparación entre los promedios de los valores encontrados en los sujetos sanos (C), diabéticos afectados por retinopatía no proliferativa (NP) y diabéticos afectados por retinopatía proliferativa (P).

Se consideró normal un valor de Lactoferrina de hasta 2,7 mg/ml.

Ejemplo 2: Preparación de tiras de nitrocelulosa para la dosificación simultánea de las tres proteínas TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina

- Preparación de las tiras, ensayos, resultados.

10 Se adaptaron tres ensayos sobre tira de nitrocelulosa (Millipore) que tenían flujo lateral para la detección de las tres proteínas TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina presentes en el fluido lagrimal a concentraciones por encima del límite mínimo identificado. La metodología se preparó en modo competitivo de acuerdo con el esquema posterior que proporciona el uso de una tira (vía) para los ensayos inmunológicos ("inmuntira"), preparada individualmente para cada una de las tres proteínas como se representó previamente en referencia al ejemplo de la figura 2 a cuya descripción se hace referencia.

15 Las tres tiras diferentes se pueden colocar juntas en un único soporte para utilizarse en conjunto para la dosificación y posterior lectura total de los resultados, como se ha representado anteriormente en referencia al ejemplo de la figura 1 a cuya descripción se hace referencia.

20 Las muestras de fluido lagrimal se colocan en una almohadilla porosa (primera zona) a partir de la cual comienza un flujo capilar lateral a través de la nitrocelulosa, que se genera por el mismo líquido de la muestra, en la dirección del otro extremo de la tira donde hay una almohadilla absorbente (zona final). De esta manera, los componentes de la muestra se transportan a la siguiente zona de la tira, en la que se han depositado conjugados constituidos por microperlas coloreadas unidas a anticuerpos específicos para la proteína que se ensaya (zona de conjugado). Estos conjugados ponen la solución según fluye en contacto con los componentes de los mismos. Por lo tanto, si existe la proteína en ensayo en la muestra, será capaz de formar un complejo con los conjugados coloreados y el flujo lateral transportará este material a una zona próxima donde existe una línea de captación (zona de captación). En la línea de captura existe, en fase sólida y fijado irreversiblemente a la nitrocelulosa, una cantidad definida de la proteína que se ensaya. Por lo tanto, si en la muestra existe tal cantidad de proteína como para saturar el anticuerpo relacionado con esta, conjugado con las microperlas coloreadas, no será capaz de unirse a la misma proteína de la fase sólida y continuará adicionalmente con el flujo lateral. En ausencia de la proteína derivada de la muestra, el conjugado se une a la proteína en la fase sólida a su vez, coloreando la línea de captura. Al alcanzar la siguiente área hay una tira de control (zona de control), un anticuerpo anti-inmunoglobulina específico de la especie (en el caso en particular, anti-inmunoglobulinas de conejo) que se adhieren aquí en la fase sólida, el complejo microperlas residuales-anticuerpo, si se ha unido ya una parte en la línea de captura total, si la muestra es positiva, entonces, si la concentración de los analitos es igual o mayor que la predeterminada, se unirá a la línea de control que se coloreará a su vez.

35 En la práctica, si en el fluido lagrimal hay una concentración de la proteína que se está ensayando mayor que un valor definido, la línea de captación no se coloreará por las microperlas conjugadas con los anticuerpos específicos, pero solo la siguiente línea de control se coloreará cuando el conjugado está unido de alguna manera (resultado positivo, se colorea solo la línea de control). Si a su vez la proteína está ausente o tiene menos concentración que el valor definido, el conjugado será capaz de colorear la línea de captura y también la siguiente línea de control (resultado negativo, coloreándose tanto la línea de captura y la línea de control).

40 Las microperlas se han utilizado de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Merck Millipore, Estapor® Microspheres). Los anticuerpos primarios que se utilizaron eran policlonales derivados de conejos (Sigma-Aldrich). Se pueden obtener los mismos con un ciclo de administraciones antigénicas en conejo, ratón o cabra, de cada una de las tres proteínas purificadas o fragmentos de las mismas. La calidad de los anticuerpos posiblemente puede aumentarse más mediante inmunoafinidad. El anticuerpo secundario (anti-inmunoglobulinas de conejo) se han utilizado de acuerdo con las especificaciones del fabricante (Sigma-Aldrich). La afinación de la preparación de las tiras se refiere esencialmente a ensayos comparativos con los inmunoensayos que se llevan a cabo en placas multipocillo con el fin de determinar las cantidades de reactivos, en particular los conjugados, que se van a añadir a las tiras de manera que sean capaces de obtener la positividad solo cuando se excedan los valores de corte establecidos, es decir, de al menos dos de los tres valores de umbral.

55 Los datos de los ensayos que se llevan a cabo con las tiras que tienen flujo lateral están solapados ampliamente con los derivados de los inmunoensayos sobre las multi-placas. De hecho, las tiras configuradas para detectar las tres proteínas a concentraciones por encima de los valores del umbral determinados previamente, se detectaron los mismos resultados en casi todos los casos (un 97,5 %) analizados, con la ventaja de que no necesitan dispositivos y equipamiento de laboratorio y necesitan una ejecución manual mínima para llevar a cabo los ensayos.

En particular, en los siguientes 90 pacientes diabéticos se detectaron valores por encima del corte:

- a) para la Lactoferrina: 53 por el ensayo de tira y 57 por ELISA;
- b) para la Lipocalina-1: 63 por el ensayo de tira y 73 por ELISA;
- c) para el TNF-alfa: 57 por el ensayo de tira y 59 por ELISA.

Comparando la metodología multipocillo total con el ensayo rápido:

- 5 ELISA: de los 45 pacientes de proliferativa, 29 tenían positividad triple; 11 doble positividad, haciendo un total de 40/45 pacientes identificados (un 88,8 %) y 22/90 de falsos positivos.
Tiras que tienen flujo lateral: de los 45 pacientes de proliferativa, 29 tenían positividad triple; 10 doble positividad, haciendo un total de 39/45 pacientes identificados (un 86,6 %) y 23/90 de falsos positivos.

- 10 Por lo tanto, por lo general con las tiras de flujo (Strip Tri-Test) es posible detectar un 97,5 % de positividad diagnóstica en comparación con la que se veía en el ELISA, como se ve en la figura 6.

En la presente invención, en las realizaciones ilustradas y descritas, con el fin de satisfacer las contingencias y necesidades específicas, un experto en la técnica puede hacer varias variaciones y cambios, por otra parte, todo lo contenido en el ámbito de la protección de la invención como se define en las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo médico (1) que comprende tres vías (3, 4, 5), en el que cada vía (3, 4, 5) de dichas tres vías se extiende entre una primera zona (6) ideada para recibir una muestra en forma líquida y una zona final (7) que tiene una parte absorbente, en el que cada una de dichas vías (3, 4, 5) comprende las siguientes zonas, que se extienden entre dicha primera zona (6) y dicha zona final (7):
- una zona intermedia, o zona de captura (8) cargada con una cantidad predeterminada de una proteína predeterminada, estando dicha proteína constituida por TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1 en dichas vías (3, 4, 5), respectivamente;
 - 10 una zona conjugada (9) dispuesta corriente arriba de dicha zona intermedia (8) y cargada con un anticuerpo respectivo unido a un medio indicador, en el que dicho anticuerpo es específico para las proteínas TNF-alfa, Lactoferrina y Lipocalina-1 en dichas vías (3, 4, 5), respectivamente;
 - una zona de control (10) dispuesta corriente abajo de dicha zona intermedia y cargada con un anticuerpo anti-inmunoglobulina específico de la especie.
- 15 2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un soporte (2) con el que se combinan dichas tres vías (3, 4, 5).
3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dichas tres vías (3, 4, 5) son vías capilares.
4. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas tres vías (3, 4, 5) son vías de flujo lateral.
- 20 5. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichas tres vías (3, 4, 5) comprenden una capa de nitrocelulosa.
6. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho medio indicador comprende microperlas coloreadas.
7. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha proteína está cargada en fase sólida en dicha zona de captación (8).
- 25 8. El dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho anticuerpo está cargado en fase sólida en dicha zona de control (10).
9. El procedimiento de detección de la retinopatía diabética proliferativa en un paciente, que comprende las etapas de:
- proporcionar una muestra biológica de un paciente, en el que dicha muestra es tomada del fluido lagrimal de dicho paciente;
 - 30 verificar si los valores de umbral predeterminados de las tres proteínas predeterminadas que se corresponden con: TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina, están en exceso en dicha muestra, en el que el exceso de al menos dos de tres de dichos valores de umbral es indicativo de la presencia, o la posible presencia, de retinopatía diabética proliferativa en dicho paciente, no llevándose a cabo la etapa de verificación en dicha muestra en el cuerpo del paciente.
- 35 10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dichos valores de umbral se corresponden con: 3 pg/ml para el TNF-alfa, 1,6 mg/ml para la Lipocalina-1 y 2,7 mg/ml para la Lactoferrina.
11. Un ensayo inmunoensayo de las proteínas TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina para la detección de una retinopatía diabética proliferativa en un paciente, que comprende:
- proporcionar una muestra de fluido lagrimal de un paciente;
 - 40 cargar dicha muestra en un dispositivo médico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
 - verificar si los valores de umbral predeterminados de las tres proteínas predeterminadas que se corresponden con: TNF-alfa, Lipocalina-1 y Lactoferrina, están en exceso en dicha muestra, en el que el exceso de al menos dos de tres de dichos valores de umbral es indicativo de la presencia, o la posible presencia, de retinopatía diabética proliferativa en dicho paciente, no llevándose a cabo la etapa de verificación en dicha muestra en el cuerpo del
 - 45 paciente.
12. El ensayo de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dichos valores de umbral se corresponden con: 3 pg/ml para el TNF-alfa, 1,6 mg/ml para la Lipocalina-1 y 2,7 mg/ml para la lactoferrina.

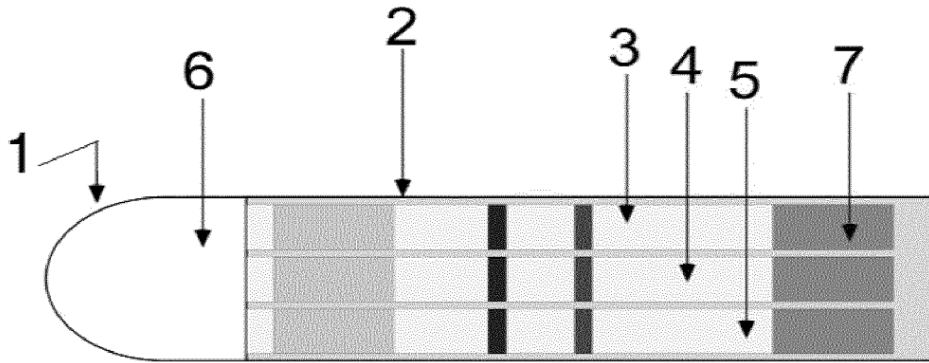


Fig. 1

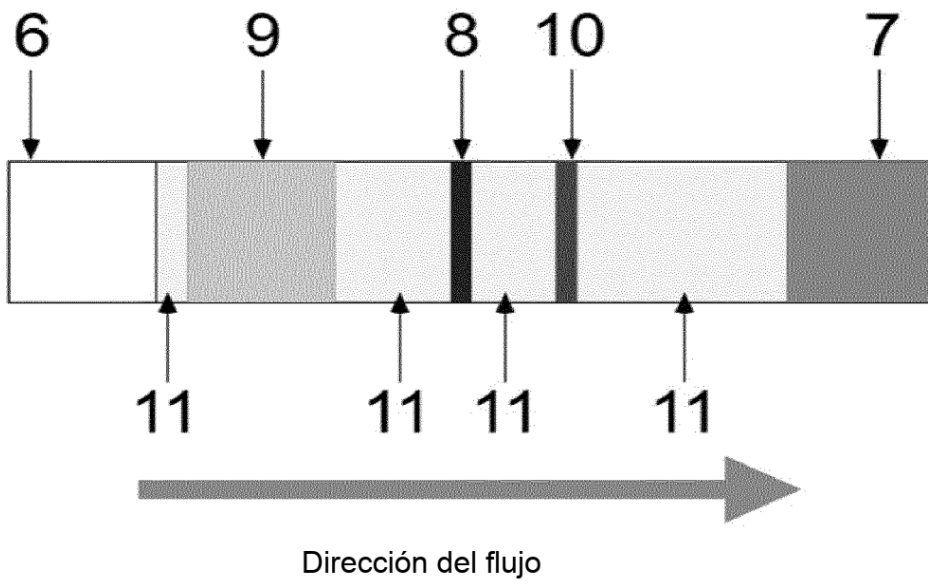


Fig. 2

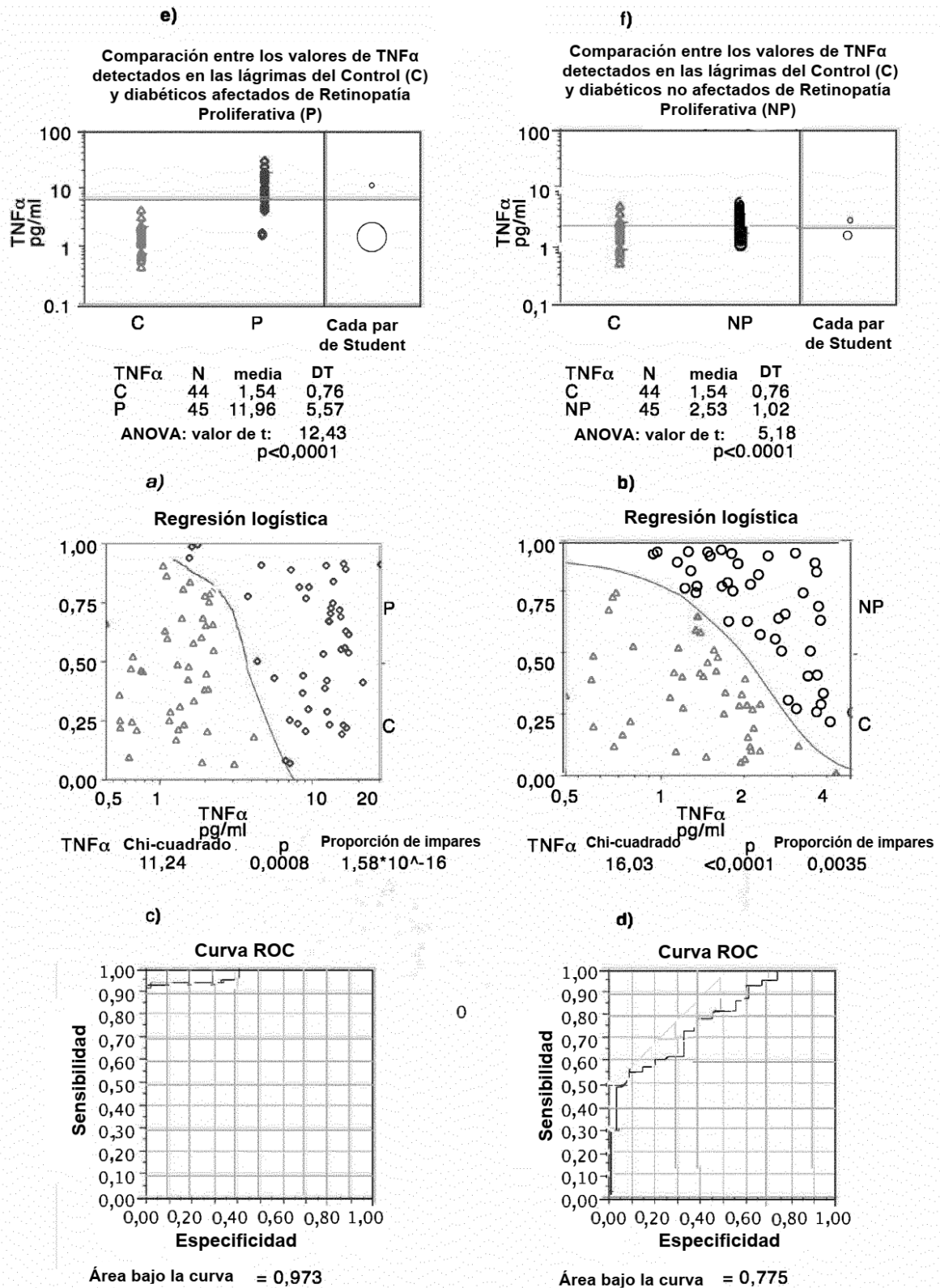


Fig. 3

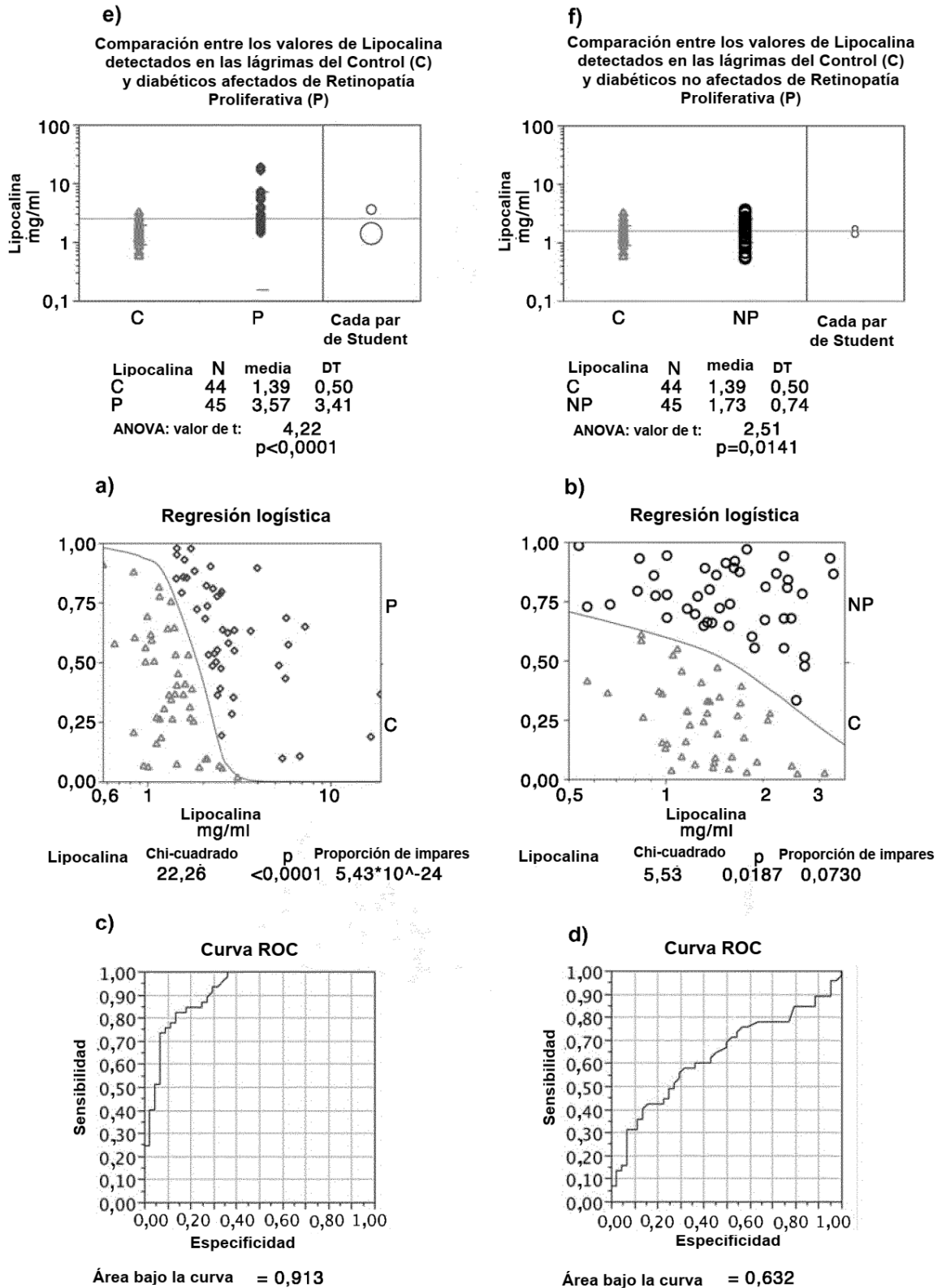


Fig. 4

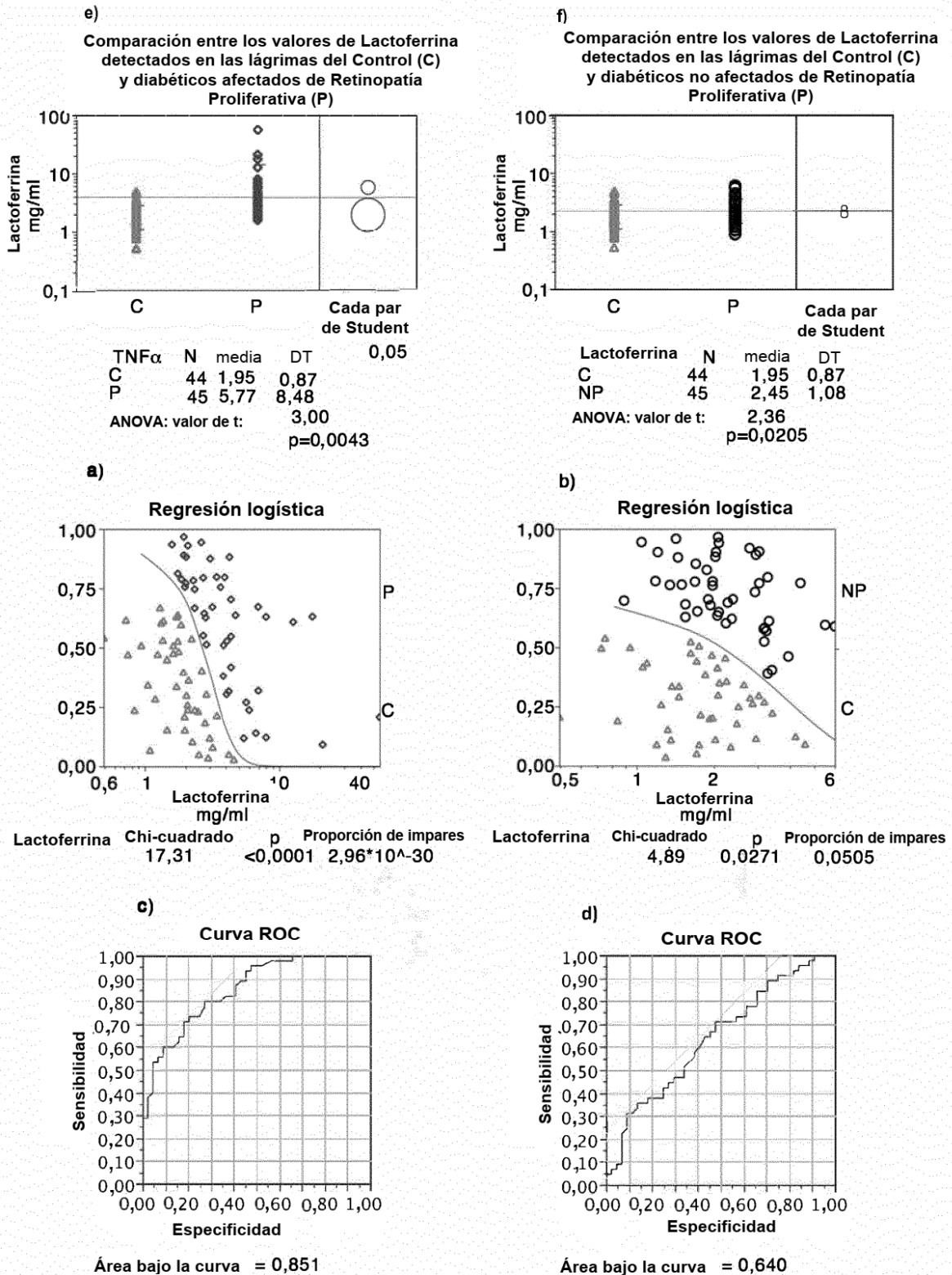


Fig. 5

Comparación entre el ensayo ELISA y el ensayo de Tira

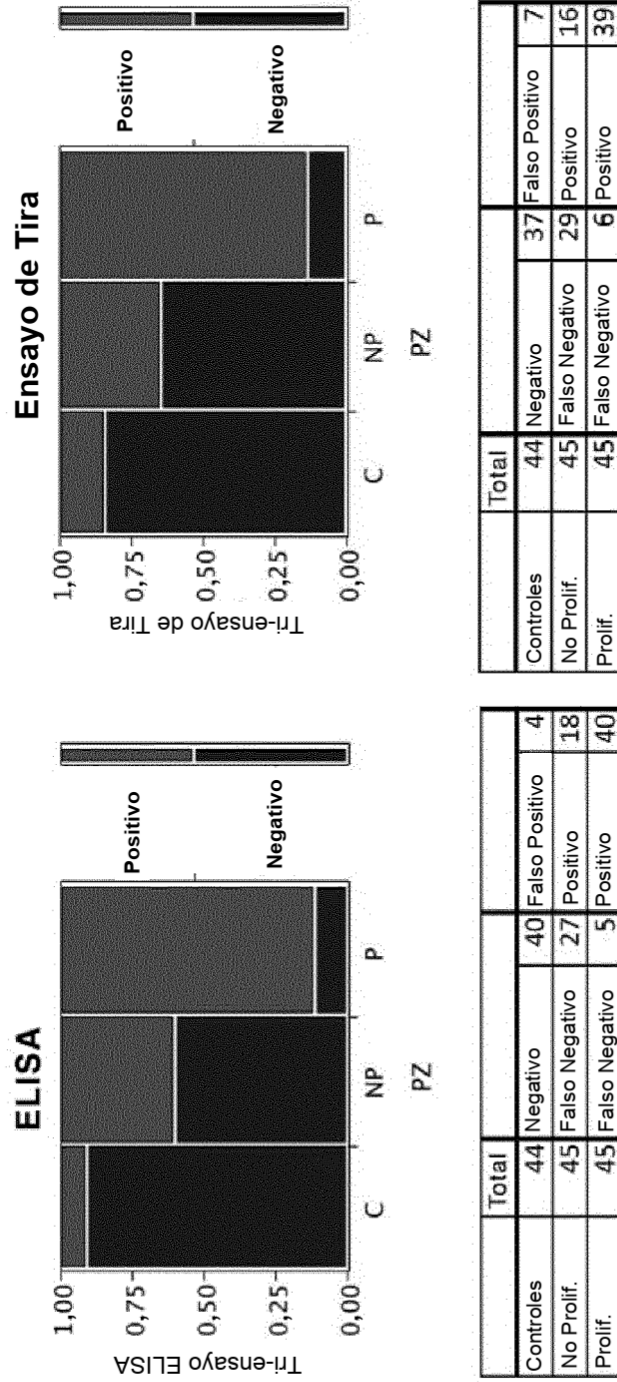


Fig. 6

b)

b)