(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 380 664**

(21) Número de solicitud: 201031537

(51) Int. CI.:
G01N 33/53 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **19.10.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **17.05.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **17.05.2012**

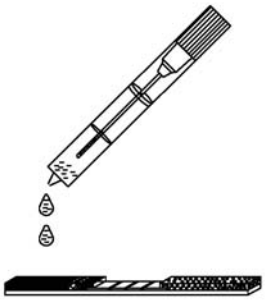
(71) Solicitante/s:
CERTEST BIOTEC, S.L.
MARIA DE LUNA N. 11 NAVE 16
50018 ZARAGOZA, ES

(72) Inventor/es:
GENZOR ASIN, CARLOS GUSTAVO;
LANDETA ELORZ, ÓSCAR y
VELASCO MICHELENA, BEATRIZ

(74) Agente/Representante:
No consta

(54) Título: **MÉTODO Y DISPOSITIVO PARA EL DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE ENFERMEDADES EN MUESTRAS FECALES.**

(57) Resumen:
Método de diagnóstico rápido y dispositivo para llevarlo a cabo que, mediante la aplicación de una muestra de heces dispersada en un diluyente, permite la detección simultánea y diferenciada de lactoferrina y calprotectina fecales mediante la formación de conjugados con partículas coloreadas y su captura en una membrana porosa.



1E

ES 2 380 664 A1

DESCRIPCION

Campo de la invención

La presente invención se encuadra dentro del área de la biotecnología y en concreto en el diagnóstico de enfermedades gastrointestinales. El objeto de la invención es un procedimiento rápido y sencillo de detección de lactoferrina (hLf) y calprotectina (hCp) fecales como marcadores para el diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), la diarrea infecciosa (ID) y el cáncer colorrectal (CRC).

Estado de la técnica

Enfermedad inflamatoria intestinal

Enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) es un término amplio para describir ciertas enfermedades que se caracterizan por una inflamación idiopática y crónica del tracto digestivo. La enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) incluye la enfermedad de Crohn (CD), colitis ulcerosa (UC) y un tipo no específico o indeterminado de colitis (IC).

En muchas ocasiones y debido a que presentan mucha similitud en sus síntomas, la IBD es muy difícil de distinguir del síndrome del intestino irritable (IBS). Éste último es una enfermedad benigna, en contraposición a la IBD pero cuyos síntomas son muy semejantes a las de la IBD.

Los procesos inflamatorios como la IBD suelen estar asociados a la presencia de leucocitos. Para un diagnóstico fiable se ha identificado diversos posibles marcadores de la enfermedad.

En la patente europea EP0641441 se describe una prueba in vitro para la determinación de leucocitos en muestras de heces utilizando un inmunoensayo con anticuerpos anti-lactoferrina. En la patente US7192724 ya se describe un método para diferenciar IBD de IBS midiendo la concentración de lactoferrina en heces utilizando un inmunoensayo tipo ELISA. Incluso se ha establecido que esa concentración puede ser útil para monitorizar el desarrollo de la enfermedad (Patente US7560240).

Por otra parte, la patente US5455160 revela un método inmunológico para el despistaje de la IBD y CRC usando un ensayo ELISA para determinar calprotectina en muestras de heces.

Se han descrito otros posibles marcadores para el diagnostico de la IBD entre los que destacan ANCA y ANSA aunque los mejores resultados se obtienen con lactoferrina y calprotectina fecales (Turkay, C. et Kasapoglu, B. CLINICS 2010; 65(2):221-31). Vieria, A. et al. (BMC Research Notes 2009, 2:221) indica que tanto la medida de la lactoferrina como de la calprotectina fecales por ELISA son marcadores altamente sensibles y específicos de la IBD y correlacionan con el grado de inflamación. Por último Gisbert, J. et al. (Inflamm Bowel Dis 2009; 15:1190-1198) determina que la medida por separado de ambos marcadores es útil en la predicción de una recaída en pacientes con CD o UC.

Acompañando a estas patentes y resultados experimentales existen en el mercado tanto pruebas ELISA como test inmunocromatograficos (IC) para la determinación por separado de lactoferina y calprotectina. El LEUKO EZ VUE™ de Techlab (Blacksburg, VA) es un test inmunocromatografico (IC) para la detección cualitativa de niveles elevados de lactoferrina en muestras de heces. El Prevent ID Caldetect de Preventis (Bensheim, Alemania) es un test IC semicuantitativo para la detección de calprotectina en heces para la diferenciación de IBD de IBS, al igual que el Quantum Blue Calprotectin Rapid Test de Bühlmann (Basilea, Suiza).

En todo lo descrito hasta ahora los inmunoensayos para calprotectina y lactoferrina son distintos, es decir, se hace por un lado un inmunoensayo para calprotectina y otro para lactoferrina, lo que significa que hay que preparar muestras distintas, en diluyentes distintos, y realizar ensayos distintos y esto implica:

a. Un mayor gasto de tiempo.

b. Un mayor número de manipulaciones con el inherente riesgo de error.

c. Los resultados obtenidos para los dos parámetros no se correlacionan directamente puesto que provienen de dos tomas de muestra diferentes.

El objeto de la presente invención es un test rápido del tipo IC para la determinación simultánea y diferenciada de calprotectina y lactoferrina en muestras fecales que presenta las siguientes ventajas:

a. Se prepara una única muestra. Cuando ambas proteínas se analizan por separado hay dos muestras diferentes en diluyentes diferentes.

b. Se ensayan simultáneamente con lo que se reduce el tiempo de ensayo y el número de manipulaciones, reduciéndose así el riesgo de error. La determinación simultánea de dos marcadores hace que la prueba sea más sensible.

c. La determinación es diferenciada, es decir, se visualiza en una línea la presencia de lactoferrina y en otra línea distinta la presencia de calprotectina. La determinación diferenciada de dos marcadores hace que la prueba pueda ser más específica.

d. Se utiliza un vial específico que permite la toma de la muestra de forma cuantitativa y su dispersión en el diluyente de manera fácil e higiénica.

Diarrea infecciosa (ID)

Otro de los casos de aplicación de la presente invención es la gestión de la diarrea aguda. Aunque el origen de la diarrea puede ser muy diverso, es importante discernir si se trata de un proceso no invasivo (autolimitado, no inflamatorio) de un proceso invasivo (agresivo, inflamatorio). El tratamiento del primero se limita a una terapia de rehidratación y reposición de electrolitos mientras que el segundo requiere tratamiento especifico usualmente con agentes antimicrobianos.

Las diarreas con procesos inflamatorios suelen estar causadas por *Salmonella, Shigella, Campylobacter jejuni* o *Clostridium difficile*. El diagnóstico de estas se hace por cultivo de las heces e identificación de los patógenos. El cultivo es una técnica larga y costosa. Choi, S.W. et al. (Journal of Clinical Microbiology, 1996:928-932) proponen el uso de un látex de aglutinación para detectar la presencia de lactoferrina en muestras de heces como método de despistaje para evitar el cultivo en caso de diarreas agudas.

Shastri, Y.M., et al. (Am J Med. 2008, 121(12):1099-106) describen que la determinación de calprotectina fecal muestra una alta correlación con infecciones bacterianas que producen diarrea y propone su determinación como método de despistaje rápido de la diarrea infecciosa antes de proceder al cultivo.

En la patente US6727073 se describe un test IC para el diagnostico de la diarrea infecciosa que detecta simultáneamente lactoferrina y uno o varios antígenos de las bacterias que pueden causarla, a saber, *Salmonella, E. coli O157, Listeria, Yersinia, Shigella, Campylobacter jejuni* o *Clostridium difficile*.

El dispositivo de la presente invención permite la detección simultánea y diferenciada de lactoferrina y calprotectina fecales y constituye una herramienta en el diagnóstico y el manejo de los casos de diarrea aguda.

Cáncer colorrectal (CRC).

El cáncer colorrectal es una enfermedad en la que las células malignas se localizan en la porción intermedia y más larga del intestino grueso. Una de las herramientas diagnosticas más utilizadas para el despistaje del CRC es le detección de sangre oculta en heces (FOB). La forma más sensible y específica es un inmunoensayo para la detección de la hemoglobina ya sea en forma de ELISA o test rápido (IC).

La patente US5552292 muestra un método de diagnóstico del CRC consistente en un inmunoensayo tipo ELISA para la detección de lactoferrina o mieloperoxidasa en heces.

El documento WO 2009/065551 A1 revela un método de diagnóstico del cáncer colorrectal (CRC) a partir de muestras de heces usando como marcadores calprotectina y el complejo hemoglobina-haptoglobina.

El dispositivo de la presente invención que permite la detección simultánea y diferenciada de lactoferrina y calprotectina fecales, constituye una herramienta útil en el diagnóstico y el despistaje del cáncer colorrectal (CRC).

Descripción breve

El método de diagnóstico de la presente invención consiste en: la toma de una porción representativa de la muestra de heces, su dispersión en un diluyente específico, la aplicación de esta dispersión de la muestra en un dispositivo inmunocromatográfico específico, la formación de complejos entre los anticuerpos del dispositivo y los antígenos de la muestra y la visualización de estos complejos en la membrana del dispositivo.

El dispositivo inmunocromatográfico utilizado es de un solo uso. No se requiere ningún tipo de instrumentación para llevar a cabo el método o interpretar el resultado. Como muestra se utilizan heces.

El tiempo de preparación de la muestra son unos dos minutos y el tiempo de desarrollo de la prueba es de 5 a 10 minutos, lo que significa entre 10 y 20 veces menos que los ensayos EIA (ELISA), mucho más complejos de llevar a cabo y necesitan de instrumentación de laboratorio.

Por su sencillez la prueba se puede llevar a cabo en la consulta del médico, e incluso, con las instrucciones adecuadas, por el propio paciente.

El método de la invención es útil para el diagnostico de la IBD y su diferenciación de la IBS. Éste último es una enfermedad benigna cuyos síntomas son muy semejantes a las de la IBD.

Ante un caso de diarrea aguda, el método de la invención es útil para determinar de forma rápida si ésta tiene carácter inflamatorio e invasivo y lo tanto hay que proceder al cultivo y/o a un tratamiento con agentes antimicrobianos.

En el caso del diagnostico de CRC, la prueba de la invención es adecuada para establecer procedimientos de vigilancia precoz de aparición de la enfermedad especialmente en grupos de alto riesgo (edad, antecedentes familiares,…).

Descripción de la figuras

Figura 1: Esquema de las etapas del método de diagnóstico. El dispositivo o vial específico para la toma de muestras fecales (Figura 1A) es un vial de plástico de unos 2 mL de capacidad, en el que previamente se ha dispensado 1 ml de diluyente, con un tapón a rosca que dispone de un vástago cuyo extremo, diseñado al efecto, permite la recolección cuantitativa de una muestra de heces (Figura 1B) sólidas o semisólidas y su introducción en el vial. Tras esto, se cierra y se agita vigorosamente (Figura 1C) hasta la completa dispersión de la muestra. Por último, se rompe la parte opuesta del dispositivo (Figura 1D) y se añaden unas gotas sobre el lugar de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico (Figura 1E).

Figura 2: Vistas del dispositivo inmunocromatográfico.

Figura 2A: Vista superior del dispositivo inmunocromatográfico en formato tira. Dicha tira incluye los siguientes elementos: un material absorbente (1), una membrana porosa (2) con una línea de control (3), una línea para la detección de calprotectina (4) y otra línea para la detección de lactoferrina (5), un lugar de aplicación de la muestra (6) y un lugar para el conjugado anticuerpo-marcador (7).

Figura 2B: Vista de la sección del dispositivo inmunocromatográfico en formato tira en la que se distinguen además de los elementos descritos en la Figura 2A, el soporte plástico (8).

Figura 2C: Vista proyectada del dispositivo inmunocromatográfico, en la que se distinguen los elementos descritos en la Figuras 2A y 2B.

Descripción detallada

Los dispositivos inmunocromatográficos para la detección tanto de antígenos como de anticuerpos han sido descritos anteriormente (por ejemplo, en la patente EP 1248112).

En la presente invención se trata de una prueba de de tres líneas: una de control, otra para la detección de lactoferrina y otra para la detección de calprotectina.

En una realización preferente se utiliza un único anticuerpo monoclonal anti –calprotectina. Este anticuerpo monoclonal (CA1) se ha desarrollado utilizando calprotectina altamente purificada. El anticuerpo monoclonal obtenido presenta una elevada afinidad y especificidad frente al complejo formado por las dos subunidades de la calprotectina mientras que apenas se une a cada una de las subunidades por separado.

También en una realización preferente, se utilizan anticuerpos policlonales de conejo anti-lactoferrina humana. Estos anticuerpos se han obtenido inmunizando conejos con lactoferrina humana purificada y posteriormente han sido purificados por cromatografía de afinidad frente al mismo antígeno (lactoferrina humana purificada).

Con los anticuerpos descritos, se preparan, por separado, conjugados con nanopartículas coloreadas. Estas nanopartículas son depositadas en uno de los materiales del dispositivo inmunocromatográfico y actúan como fase móvil. Los mismos anticuerpos son inmovilizados por separado sobre la membrana porosa que actúa como fase fija y en la que se produce la captura inmunológica por separado de la lactoferrina y calprotectina humanas. La membrana y el material con el conjugado son montados con la ayuda de otros materiales sobre un soporte plástico que se corta en forma tira.

Para la realización del ensayo se resuspende la muestra de heces en el diluyente de dispersión de la muestra en una proporción aproximada 1/100. Si la muestra es liquida 10 µL de muestra se mezclan con 1 mL del diluyente. Si la muestra es sólida se separan 10 mg de muestra con la ayuda de una espátula y se dispersan en 1 mL de diluyente. Resulta muy

conveniente la utilización del vial de toma de muestra en el se introduce la muestra con la ayuda de un vástago tras lo que se cierra con el tapón a rosca y se agita vigorosoramente para posteriormente romper la parte superior del tapón y añadir 4-5 gotas sobre el punto de aplicación de la muestra del dispositivo inmunocromatográfico. El diseño del vástago es tal que al pasar por el orificio reductor del vial permite la introducción de una cantidad predeterminada de la muestra de heces, en este caso 10 mg.

Tras la aplicación de la muestra se esperan 10 minutos para visualizar las líneas y se interpreta el resultado. El test se considera negativo si solo aparece una sola línea, la de control (por ejemplo, verde) en la ventana de resultados; positivo para calprotectina si además de la línea de control aparece una línea en la posición de la calprotectina (por ejemplo, azul); positivo para lactoferrina si además de la línea de control aparece una línea en la posición de la lactoferrina (por ejemplo, roja); y positivo para ambas (hLf y hCp) si aparecen tres líneas (por ejemplo, una verde, una roja y una azul)

Ejemplos de realización:

Ejemplo 1:

Preparación y purificación de anticuerpos monoclonales anti-calprotectina

El anticuerpo monoclonal CA1 se obtuvo a partir del hibridoma del mismo nombre. La obtención del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal CA1 se realizo mediante protocolos conocidos según el método de fusión celular y selección de los clones obtenidos que fue inicialmente descrito por Kohler y Milstein en 1975 (Köhler G, Milstein C. *Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity*. Nature. 1975 Aug 7;256 (5517):495-7).

Ratones del tipo BALB/c fueron inmunizados con calprotectina purificada (ProtEra S.r.l., Florencia, Italia). Los linfocitos de los ratones inmunizados fueron fusionados con células mielómicas de la linea SP20 y los hibridomas obtenidos fueron seleccionados mediante técnicas ELISA de la siguiente manera: los pocillos de una placa microtiter de 96 pocillos fueron tapizados con anticuerpo policlonal de conejo anti-calprotectina en tampón carbonato 100 mM de pH 9 a 37 grados durante 2 h. A estos pocillos se añadió la calprotectina purificada. Tras su lavado se añaden las distintas muestras de cultivo de hibridomas y la presencia del

anticuerpo anti-calprotectina se revela utilizando un conjugado anti-mIgG con peroxidada y el sustrato correspondiente.

Se seleccionaron los hibridomas que mayor afinidad y mejor especificidad presentaron. Entre estos se seleccionaron los más productores y los que mejores prestaciones ofrecieron en los test de estrés térmico y velocidad de reacción frente al antígeno.

El hibridoma seleccionado CA1 fue cultivado en medio RPMI-HT durante varios días a 37 grados centígrados con 5% de CO2. A partir del medio de cultivo fue purificado el anticuerpo por cromatografía de afinidad a proteína A según las instrucciones del fabricante de la columna (GE Healthcare) tras lo que fue dializado en PBS de pH 7,4.

Ejemplo 2:

Preparación y purificación de anticuerpos policlonales anti-lactoferrina

La lactoferrina humana fue purificada a partir del producto comercial *Lactoferrin from human milk* (L0520 Sigma-Aldrich) por cromatografía de intercambio iónico hasta una pureza superior al 99% por SDS-PAGE.

Inmunización de conejos.

La inmunización se realiza por vía intradérmica (día 1), inoculando 250 µg de lactoferrina purificada en 0,5 mL de PBS al que se le añaden 0,5 mL de Adyuvante Completo de Freund. Después del la inmunización se administran dosis de recuerdo cada tres semanas hasta completar un total de tres. En cada dosis se administran 250 µg de antígeno en un volumen de 0,5 ml por vía intramuscular (al que se le añaden 0,5 mL de Adyuvante Incompleto de Freund).

Dos semanas después de la administración de cada dosis de recuerdo se procede a realizar la sangría para la obtención de los diferentes sueros. La sangre se extrae por punción de la arteria auricular. De cada sangrado se obtienen entre 15 y 30 ml de sangre completa (que equivalen a 7 y 15 ml de suero). Este suero se congela hasta su posterior purificación.

Purificación de los anticuerpos por afinidad.

Se prepara una columna HiTrap NHS-activated HP de 5 mL (GE Healthcare) con 5 mg de lactoferrina purificada según las instrucciones del fabricante. Por dicha columna se hacen pasar 10 mL de suero hiperinmune de conejo y se lava con PBS hasta que la absorbancia a 280 nm es inferior a 0.050. Los anticuerpos son eluídos en un tampón glicina 250 mM de pH 2,75 y se recogen fracciones que son inmediatamente neutralizadas con tampón fosfato y posteriormente dializadas en PBS. La concentración se determina por su absorbancia a 280 nm.

Ejemplo 3:

Preparación de los conjugados

Calprotectina

Se prepara un conjugado del anticuerpo CA1 con micropartículas de poliestireno. Se utilizan partículas coloreadas con grupos carboxilo en su superficie de 200 nm de diámetro nominal (K1 020 de la marca Estapor, Merck, Darmstadt, Alemania). 1 mL de partículas al 10 % se lavan por centrifugación y resuspensión en tampón MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico) 10 mM de pH 6 y se le añade EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) hasta una concentración de 5 mM. Se incuba 1h a 37 grados y se retira el exceso de reactivo por centrifugación. Las partículas así activadas se resuspenden en MES 10 mM de pH 6 y se les añade el anticuerpo monoclonal anti-calprotectina hasta una concentración superficial de 2 mg/m^2 tras lo que se incuban 18 h a 4 grados y posteriormente se lavan en Tween 20 al 0,1%.

Lactoferrina

De la misma manera, se prepara un conjugado del anticuerpo policlonal anti-lactoferrina purificado por afinidad con micropartículas de poliestireno. Se utilizan partículas coloreadas con grupos carboxilo en su superficie de 300 nm de diámetro nominal (K1 030 de la marca Estapor, Merck, Darmstadt, Alemania). Igualmente, 1 mL de partículas al 10 % se lavan por centrifugación y resuspensión en tampón MES (ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfónico) 10 mM de pH 6 y se le añade EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida) hasta una concentración de 5 mM. Se incuba 1h a 37 grados y se retira el exceso de reactivo por centrifugación. Las partículas así activadas se resuspenden en MES 10 mM de pH 6 y se les añade el anticuerpo policlonal anti-lactoferrina purificado por afinidad hasta una

concentración superficial de 1 mg/m^2 tras lo que se incuban 4 h a 37 grados y posteriormente se lavan en Tween 20 al 0,1%.

Los conjugados con partículas para línea de control se obtienen de la misma manera pero utilizando streptavidina (S4762, Sigma-Aldrich) a una concentración superficial final de 1 mg/m^2.

Una mezcla de los tres conjugados con partículas descritos en concentraciones de 0,02%, 0,04% y 0,05% respectivamente, se diluyen en una solución que contiene sacarosa 10%, caseína bovina 2%, PEG-6000 1% y Tween-20 2% en tampón TRIS (tris(hidroximetil)aminometano) de pH 8. Esta solución se deposita a razón de 15 uL/cm en un material bobinado de fibras de poliéster no entretejidas de 29 mm de ancho que se seca en corriente de aire a 45 grados tras la deposición (5 min) y durante 24 h en una cámara a 30 grados y 20 % de humedad relativa.

Ejemplo 4:

Preparación de las líneas de test y control.

Los anticuerpos anti-lactoferrina, anti-calprotectina y anti-streptavidina (para la línea de control) se dializan en PBS, se llevan a una concentración entre 0,5 y 1 mg/mL y se depositan linealmente de forma paralela sobre una membrana de nitrocelulosa laminada (Millipore Hi-Flow Plus) de 25 mm de ancho y de tamaño de poro entre 10 y 30 micrómetros a razón de 1 microL/cm tras lo cual se seca en corriente de aire a 45 grados tras la deposición (2 min) e inmediatamente después durante 24 h en una cámara a 30 grados y 20 % de humedad relativa.

Ejemplo 5.

Montaje del test inmunocromatografico.

El material con el conjugado, la membrana y el material absorbente se montan conforme indica la figura 2 sobre un soporte plástico con una lámina adhesiva y las tiras son cortadas transversalmente a su montaje a una anchura de 4 mm.

Se prepara una solución para la dispersión de las muestras de heces consistente en una disolución acuosa de cloruro de sodio 300 mM, Triton X-100 al 1%, anticuerpos IgG inespecíficos de ratón 100 microgr/mL y anticuerpos IgG inespecíficos de conejo a 200 microgr/mL en un tampón TRIS 200 mM a un pH de 9. Esta preparación de dispensa en viales para la toma de muestra a razón de 1 mL/vial.

Ejemplo 6.

Detección calprotectina y lactoferrina fecales

Para que el dispositivo de la invención tenga una adecuada utilidad diagnóstica es necesario utilizar unos valores de corte, es decir, la concentración de analito por encima de la cual el test es positivo y por debajo de la cual el test es negativo. En el caso de la calprotectina el valor de corte es 50 microgr hCp/gr de heces y para la lactoferrina es 10 microgr hLf/gr de heces.

Debido a la existencia del valor de corte, es necesario tomar la muestra de heces de forma cuantificada. Para ello se utiliza un vial especifico para la toma de muestra fecales que contiene un vástago con hendiduras para la muestra y un reductor para eliminar la muestra sobrante de manera que el sistema ha sido calibrado para que se introduzcan en el vial exactamente 10 mg de muestra fecal. Por otro lado, y puesto que el vial contiene 1 mL de diluyente, se puede cuantificar la concentración de la muestra.

Calprotectina:

Se prepararan diluciones seriadas 1/2 de calprotectina en el diluyente de dispersión de muestras descrito en el apartado anterior. 100 µL de estas diluciones se aplican a los dispositivos inmunocromatográficos de la invención y se deja progresar el ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 ºC) tras lo cual se procede a interpretar el resultado mediante apreciación visual de aparición de la línea de test. Se realiza la misma operación pero diluyendo la calprotectina en un pool de muestras de heces resuspendidas aprox. 1/100 en el mismo tampón. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

ngr hCp/mL	En diluyente	En heces	µgr hCp/gr heces
16000	+	+	1600

8000	+	+	800
4000	+	+	400
2000	+	+	200
1000	+	+	100
500	+	+	50
250	-	-	25
125	-	-	12,5
0	-	-	0

Lactoferrina:

Se prepararan diluciones seriadas 1/2 de lactoferrina en el diluyente de dispersión de muestras descrito en el apartado anterior. 100 microL de estas diluciones se aplican a los dispositivos inmunocromatográficos de la invención y se deja progresar el ensayo durante 10 minutos a temperatura ambiente (25 ºC) tras lo cual se procede a interpretar el resultado mediante apreciación visual de aparición de la línea de test. Se realiza la misma operación pero diluyendo la lactoferrina en un pool de muestras de heces resuspendidas aprox. 1/100 en el mismo tampón. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 2

ngr hLf/mL	**En diluyente**	**En heces**	**µgr hLf/gr heces**
3200	+	+	320
1600	+	+	160
800	+	+	80
400	+	+	40
200	+	+	20
100	+	+	10

50	-	-	5
25	-	-	2,5
0	-	-	0

Una muestra de heces que contenga una concentración de calprotectina fecal humana mayor o igual 50 µg/g heces y una concentración de lactoferrina igual o mayor que 10µg/g en heces, dan resultados positivos usando el test de la presente invención.

Ejemplo 7.

Evaluación de las prestaciones de la prueba.

Las prestaciones el dispositivo de diagnóstico de la invención fueren comparadas con sendos inmunoensayos para lactoferrina y calprotectina. Se realizó un estudio con 64 muestras fecales procedentes del Servicio de Microbiología de un hospital local (Zaragoza, España). Con dichas muestras se realizaron tres tipos de ensayos:

1. el método de la presente invención

2. el inmunoensayo tipo ELISA Calprest® (Eurospital Spa , Trieste, Italia), realizado según las instrucciones del fabricante.

3. la prueba rápida tipo IC IBD EZ VUE® (TechLab, Blacksburg, VA, EEUU), realizado según las instrucciones del fabricante.

La detección de calprotectina con el test de la presente invención presenta >94% de correlación en sensibilidad comparada con la prueba Calprest® (Eurospital). Y la detección de lactoferrina fecal humana usando test de la presente invención presenta >99% de correlación en sensibilidad comparada con la prueba rápida IBD EZ VUE® (TechLab).

La detección de calprotectina humana con de la presente invención presenta un 93% de correlación en especificidad comparada con Calprest® (Eurospital) y la detección de lactoferrina humana presenta >99% de correlación en especificidad comparada con IBD EZ VUE® (TechLab).

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo inmunocromatográfico para el análisis de muestras de heces caracterizado por que comprende:

a. Una ventana de resultados de tres líneas, una de control, otra para la detección de calprotectina y otra para la detección de lactoferrina, de manera que permite la identificación simultánea y diferenciada de calprotectina y lactoferrina fecales.

b. Una membrana porosa en la que se han inmovilizado separadamente anticuerpos anti-calprotectina y anti-lactoferrina

c. Un absorbente en el que se ha depositado conjugados de anticuerpos anti-calprotectina y anti-lactoferrina unidos a moléculas o partículas marcadoras.

2. Dispositivo inmunocromatográfico según la reivindicación 1 caracterizado por que los anticuerpos utilizados son policlonales o monoclonales tanto en la membrana como en los conjugados.

3. Método de diagnóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) caracterizado por que comprende:

a. La obtención de una muestra de heces,

b. La dispersión del material fecal de la muestra en un tampón o diluyente,

c. La aplicación de esta dispersión en la ventana de muestra del dispositivo de la reivindicación 1,

d. La interpretación del resultado según la aparición de bandas en la ventana de resultados.

4. Método de despistaje rápido de la diarrea infecciosa (ID) caracterizado por que comprende:

a. La obtención de una muestra de heces,

b. La dispersión del material fecal de la muestra en un tampón o diluyente,

c. La aplicación de esta dispersión en la ventana de muestra del dispositivo de la reivindicación 1,

d. La interpretación del resultado según la aparición de bandas en la ventana de resultados.

5. Método de ayuda al diagnóstico del cáncer colorrectal (CRC) caracterizado por que comprende:

a. La obtención de una muestra de heces,

b. La dispersión del material fecal de la muestra en un tampón o diluyente,

c. La aplicación de esta dispersión en la ventana de muestra del dispositivo de la reivindicación 1,

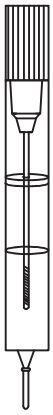
d. La interpretación del resultado según la aparición de bandas en la ventana de resultados.

6. Kit para llevar a cabo los métodos de diagnostico de las reivindicaciones 3, 4 y 5 caracterizado porque comprende:

a. Un dispositivo inmunocromatográfico según la reivindicación 1,

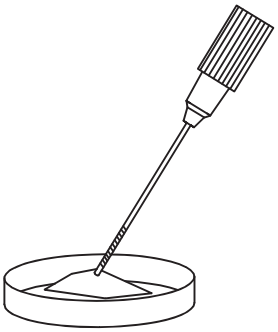
b. un diluyente adecuado para suspensión y dispersión del material fecal,

c. un vial para la toma de muestra y su manipulación.

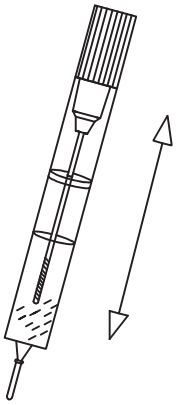


1A

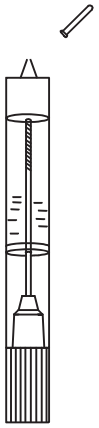




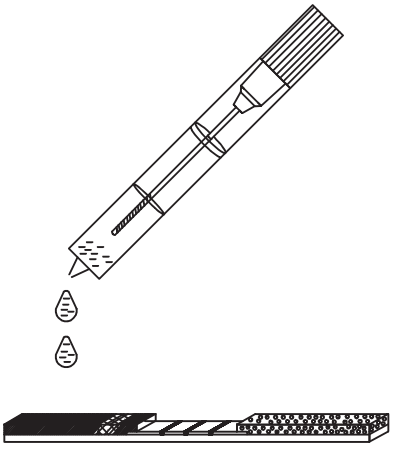
1B



1C



1D



1E

FIGURA 1

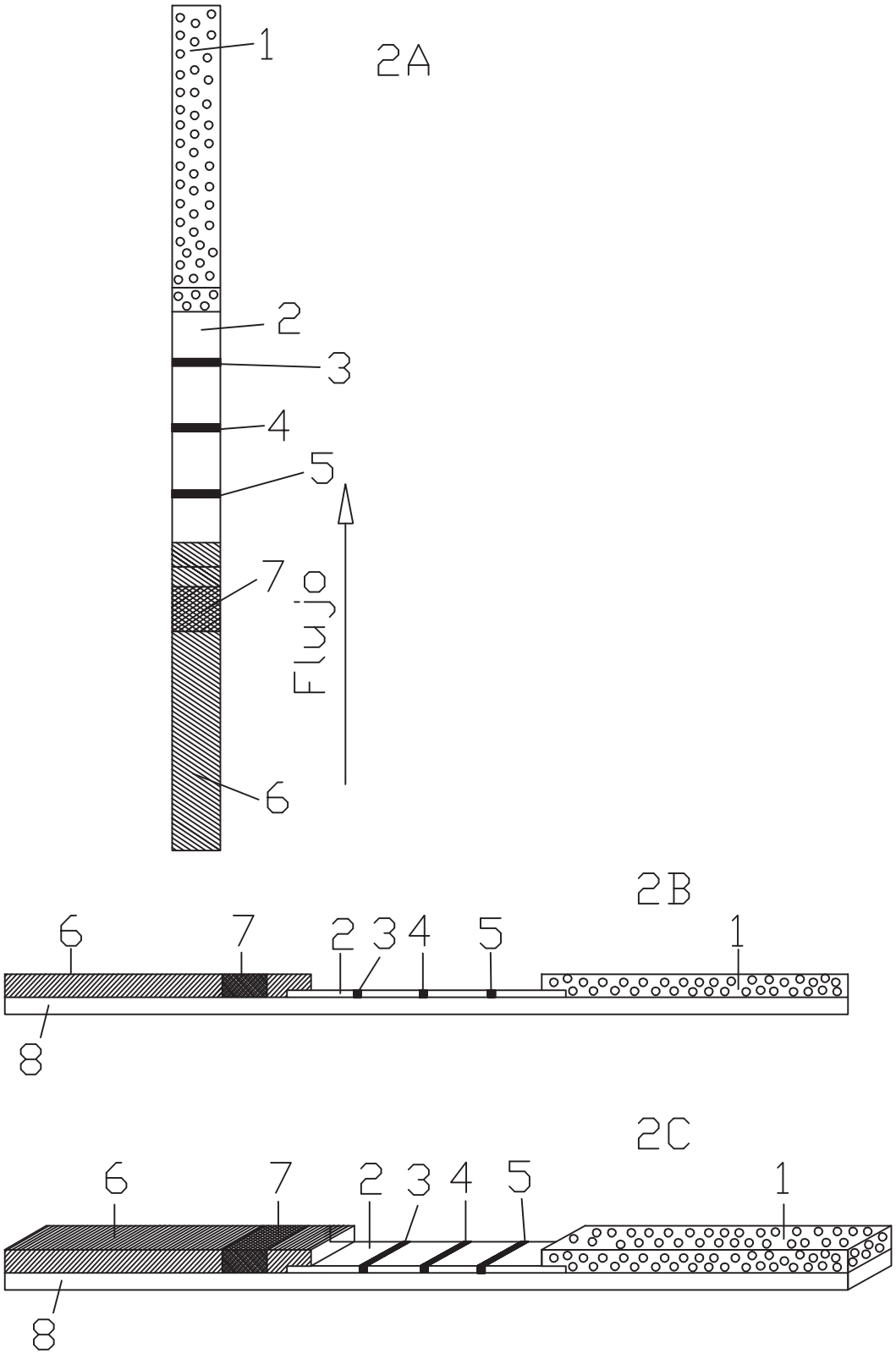


FIGURA 2

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031537

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 19.10.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/53*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0136975 A1 (BINAX, INC. [US/US]) 25.05.2001, página 3, línea 32 – página 4, línea 25; página 5, línea 29 – página 9, línea 9; reivindicaciones 1,3-5,7,8,11,12,15,17,21,25,26,29,31.	1-6
A	VIEIRA A. et al. Inflammatory bowel disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrina: correlation with laboratory parameters, clinical endoscopic and histological indexes. BMC Research Notes. 2009. Vol. 2:221, todo el documento.	1-6
A	SIPPONEN T. et al. Fecal Calprotectin, Lactoferrin, and Endoscopic Disease Activity in Monitoring Anti-TNF-alpha Therapy for Crohn's Disease. Inflammatory Bowel Diease. 2008. Vol. 14(10), páginas: 1392-1398, todo el documento.	1-6
A	EP 0884594 A2 (TORELLI G.) 16.12.1998, columna 2, línea 46 – columna 3, línea 34; reivindicaciones 1,6,10.	1-2
A	US 20090104630 A1(REITER PC.) 23.04.2009, página 3, párrafos 0032-0038; figura 2.	1-2

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
16.06.2011	M. García Grávalos	1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 16.06.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-6	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-6	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 0136975 A1	25.05.2001
D02	VIEIRA A. et al. BMC Research Notes. 2009. Vol. 2:221.	29.10.2009
D03	SIPPONEN T. et al. Inflammatory Bowel Diease. 2008. Vol. 14(10), páginas: 1392-1398.	2008
D04	EP 0884594 A2	16.12.1998
D05	US 20090104630 A1	23.04.2009

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud divulga un dispositivo inmunocromatográfico que, mediante la aplicación de una muestra de heces dispersada en un diluyente, permite la detección simultánea de calprotectina y lactoferrina fecales, mediante la formación de conjugados de anticuerpos anti-calprotectina y anti-lactoferrina unidos a partículas coloreadas y su captura en una membrana porosa (reivindicaciones 1-2). Se refiere también a el uso de dicho dispositivo en un método de diagnóstico de de una enfermedad inflamatoria intestinal, de diarrea infecciosa o de cáncer colorectal (reivindicaciones 3-5), y a un kit para llevar a cabo dicho método que incluye el dispositivo de la invención, un diluyente adecuado y un vial para la recogida de muestra (reivindicación 6).

El documento D01 divulga un método rápido y económico para diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal, basado en un dispositivo inmunocromatográfico capaz de detectar al tiempo, en una muestra fecal, con anticuerpos específicos y conjugados de anticuerpos marcados, la presencia de un microorganismo patógeno y de lactoferrina como marcador de la enfermedad entérica. El dispositivo inmunocromatográfico consta de dos partes; una, con un pocillo para la depositar la muestra; otra, formada por una tira, donde fluye la muestra, uniéndose en una fase móvil a los conjugados anticuerpo-marcador, quedando posteriormente fijados en una membrana de nitrocelulosa con anticuerpos específicos dispuestos en paralelo, siendo identificados los positivos por sus correspondientes marcadores (ver página 3, línea 32 - página 4, línea 25; página 5, línea 29 - página 9, línea 9; reivindicaciones 1, 3-5, 7, 8, 11, 12, 15, 17, 21, 25, 26, 29, 31).

El documento D02 divulga un estudio sobre la detección de lactoferrina y calprotectina en muestras fecales, evaluando su utilidad como marcadores, muy sensibles y específicos, para detección y/o pronóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal (ver todo el documento).

El documento D03 divulga una evaluación de la lactoferrina y calprotectina fecales, como marcadores de pronóstico de la enfermedad de Crohn después del tratamiento con interferon-alpha (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un método para análisis de muestras biológicas, basado en un dispositivo inmunocromatográfico capaz de detectar al tiempo, de modo rápido y que precisa poca cantidad de muestra, más de una molécula de interés. Está formado por una membrana cromatográfica, inserta en un soporte, donde se deposita la muestra para analizar, aplicándose el agente marcador en un diluyente que se desplaza sobre la muestra mostrando el resultado del análisis en bandas paralelas (ver columna 2, línea 46 - columna 3, línea 34; reivindicaciones 1, 6, 10).

El documento D05 divulga un método y un dispositivo inmunocromatográfico para detectar el estado del sistema inmune en casos de SIDA, basado en la determinación de los niveles de células T CD4+, empleando equivalentes de estas células como el ligando soluble CD40/CD154. El dispositivo está formado por un material que permite el flujo lateral de la muestra, desde un extremo, pasando por una fase móvil donde se une al ligando detector formando un complejo que posteriormente es capturado por el agente específico, dejando una señal de identificación según el tipo de marcador empleado (ver página 3, párrafos 0032-0038; Figura 2).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente solicitud divulga un dispositivo inmunocromatográfico que permite la detección simultánea de calprotectina y lactoferrina fecales y a su uso en un método de diagnóstico de de una enfermedad inflamatoria intestinal, de diarrea infecciosa o de cáncer colorrectal.

1.1. REIVINDICACIONES 1-6

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa un método y un dispositivo inmunocromatográfico para diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal, detectando en una muestra fecal, mediante conjugados de anticuerpos marcados, la presencia de un microorganismo patógeno y de lactoferrina como marcador de la enfermedad entérica.

Aunque el dispositivo descrito en D01 es muy parecido al de la invención, anticipando el uso de conjugados anticuerpo-marcador en una fase móvil y la posterior captura e identificación de las moléculas por sus correspondientes marcadores, que pueden ser partículas coloreadas, sin embargo, en este documento no se menciona a la calprotectina como marcador de la enfermedad entérica.

En consecuencia, según lo divulgado en el documento D01, las reivindicaciones 1-6 cumplen el requisito de novedad (Art. 6.1 LP11/1986).

Los documentos D02 y D03 anticipan el uso de lactoferrina y calprotectina como marcadores específicos para detección y/o pronóstico de la enfermedad inflamatoria intestinal en muestras fecales, por lo que el uso de estos marcadores en un dispositivo inmunocromatográfico, para diagnóstico de una enfermedad inflamatoria intestinal podría resultar evidente para un experto en la materia. Sin embargo, se considera que el dispositivo de la presente invención aporta una serie de ventajas sobre lo divulgado en el estado de la técnica, como el vial para recogida de muestra y la detección y cuantificación simultánea de calprotectina y lactoferrina.

De acuerdo con lo expuesto, las reivindicaciones 1-6 cumplen con el requisito de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)

Los documentos D04 y D05 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.