(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 902 019**

(21) Número de solicitud: 202131032

(51) Int. CI.:

G01N 33/487 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación:

03.11.2021

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

24.03.2022

(71) Solicitantes:

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA (40.0%)
Servicio de Promoción y Apoyo a la Investigación, Innovación y Transferencia - i2T, Edificio 8G - Acceso A/B, - Planta 3, Camí de Vera, s/n
46022 Valencia (Valencia) ES;
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (30.0%) y
FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE LA COMUNITAT VALENCIANA (30.0%)

(72) Inventor/es:

MARTÍNEZ BISBAL, María Carmen;
PINAZO DURÁN, María Dolores;
MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón;
BOTELLO MARABOTTO, Marina Dolores y
SANZ GONZÁLEZ, Silvia María

(74) Agente/Representante:

CUETO PRIEDE, Sénida Remedios

(54) Título: **MÉTODO DE DETECCIÓN DEL GLAUCOMA PRIMARIO DE ÁNGULO ABIERTO MEDIANTE TÉCNICAS METABOLÓMICAS**

(57) Resumen:

Método de detección del Glaucoma Primario de Angulo Abierto mediante técnicas metabolómicas.

La invención se refiere a un método in vitro para la detección precoz, diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de la GPAA en un sujeto, caracterizado porque comprende las siguientes etapas: realización de un análisis metabolómico mediante espectroscopia de RMN de alto campo de una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto, y procesado del espectro obtenido para obtener un resultado que indique si el sujeto será positivo o negativo para GPAA.

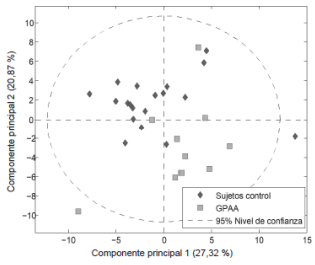

Fig 1

ES 2 902 019 A1

DESCRIPCIÓN

Método de detección del Glaucoma Primario de Angulo Abierto mediante técnicas metabolómicas

La presente invención se encuadra dentro del campo de la oftalmología y la medicina, específicamente dentro de los métodos de detección de glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) en un sujeto en base al análisis de su perfil metabolómico particular. La aplicación del método de la presente invención permite la detección o diagnóstico precoz de la enfermedad en sujetos con GPAA, así como su monitorización.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El glaucoma (GL) es una enfermedad neurodegenerativa multifactorial cuyo mecanismo celular y molecular se desconoce e incluye un conjunto de neuropatías ópticas que conducen a la ceguera irreversible y con ello, pérdida de la calidad de vida. Se caracteriza por la pérdida progresiva de células ganglionares de la retina, responsables de transducir la información de la retina al cerebro. Esta enfermedad afecta a 66,8 millones de personas en el mundo y a 1 millón de personas en España. El principal factor de riesgo de la enfermedad es la hipertensión ocular (HTO), y el único tratamiento es el hipotensor, aunque no previene la progresión de esta neuropatía. El GPAA es la forma más común de glaucoma.

El principal factor de riesgo del glaucoma es el aumento de la presión intraocular, y el mecanismo patogénico es la lesión y muerte de las células ganglionares retinianas y pérdida de sus axones (las fibras del nervio óptico). Es por ello, que el glaucoma implica una degeneración del nervio óptico en el contexto de la hipertensión ocular y otros factores de riesgo coadyuvantes, principalmente el envejecimiento, los antecedentes familiares en primer grado del glaucoma, la miopía y la diabetes mellitus. El tratamiento del GPAA se dirige a disminuir la hipertensión ocular, mediante colirios hipotensores, láser o cirugía, lo que no revierte la neurodegeneración, ni la pérdida de visión, al carecer de tratamiento neuroprotector-neurorregenerador. Las previsiones en todo el mundo para el año 2020 fueron de 76 millones de personas afectadas de glaucoma de edades comprendidas entre los 40 y 80 años, estimando para 2040 los 111 millones de afectados. Además, debido a su carácter asintomático, menos del 50% de las personas que lo padecen lo saben, y de ahí su gran peligrosidad, ya que estos pacientes se encuentran en el camino a la ceguera.

A diferencia del glaucoma, el síndrome de ojo seco (o disfunción de la superficie ocular) es una enfermedad multifactorial, compleja y crónica que afecta a la superficie ocular, constituida por las siguientes estructuras: la córnea, la conjuntiva, los párpados, el sistema lagrimal y la película lagrimal superficial, y esta unidad anatomo-funcional tiene como principales funciones las de proteger, nutrir y lubrificar dichas estructuras. La disfunción de la superficie ocular cursa con escasa secreción de lágrimas o su evaporación, lo que induce una falta de lubrificación de las estructuras del segmento anterior ocular resultando en molestias, problemas visuales y, en algunos casos, lesiones cicatriciales de la córnea y desestructuración de la conjuntiva bulbar y tarsal. Esta patología afecta a millones de personas en todo el mundo, con una incidencia superior en individuos mayores de 50 años (incidencia del 30 % en población dentro de esa franja etaria), en relación con disfunción hormonal, y/o ciertos tratamientos oculares o generales (como los antiespasmódicos o antidepresivos). Se trata de un síndrome crónico, que requiere un diagnóstico y tratamiento personalizados. Existen varias causas y tipos de ojo seco en función de los cuales varía el grado de severidad y la estrategia terapéutica para obtener los mejores resultados en cada paciente. El tratamiento más usual es a base de colirios de lágrimas artificiales y de geles y pomadas hidratantes y lubrificantes.

La evidencia científica indica que las causas y los mecanismos por los que aparece el glaucoma o el síndrome de ojo seco son totalmente distintos. No hay ningún mecanismo común. Etiopatogénicamente hablando no existen nexos entre ambas enfermedades, bien distinguidas entre sí, por los oftalmólogos y especialistas en ciencias de la visión.

Ambas enfermedades pueden coexistir porque afectan preferentemente a personas mayores de 40-50 años de edad, y es por ello, que de igual forma pueden coexistir las cataratas con el glaucoma y/o el síndrome de ojo seco; la degeneración macular y el glaucoma o el síndrome de ojo seco; e incluso la artritis reumatoide o la osteoporosis con el glaucoma, las cataratas o el síndrome de ojo seco, sin que ninguno de ellos tenga origen ni mecanismos patogénicos mínimamente parecidos. Se conoce la coexistencia de muchos procesos oculares y sistémicos, lo que no quiere decir que glaucoma y síndrome de ojo seco deban aparecer al mismo tiempo, (lo que ocurre de forma ocasional, en relación con la edad del sujeto) ya que ambos pueden también aparecer por sí solos.

El GPAA es el tipo más común de GL, cuyas características son: 1) mecánicamente: presión intraocular alta (PIO), 2) morfológicamente: alteración de la cabeza del nervio óptico, y 3) funcionalmente: progresiva pérdida de campo visual y, consecuentemente, de visión. El GPAA es asintomático en sus primeras etapas. Desde un punto de vista médico, lo único posible es detectar la PIO, así como los cambios en el campo visual y tomografía de coherencia óptica (OCT), y tratar la HTO tan pronto como sea posible. Es por eso que el diagnóstico temprano es esencial para prevenir la progresión glaucomatosa.

La técnica del análisis metabolómico se ha dirigido hacia el diagnóstico y pronóstico de las enfermedades oculares desde hace dos décadas con especial énfasis en el glaucoma por ser ésta una enfermedad muy grave como se ha indicado.

La metabolómica es el estudio de las rutas metabólicas y procesos químicos presentes en un sistema vivo que involucran moléculas bioquímicas o metabolitos, es decir, es el estudio del perfil de los metabolitos presentes en una muestra biológica. Las alteraciones en los metabolitos presentes en una muestra biológica aislada del individuo que presenta una patología con respecto a un sujeto sano informan sobre los efectos bioquímicos inducidos por una enfermedad y facilitan así la intervención terapéutica y la identificación de biomarcadores diagnósticos asociados a la misma. La metabolómica es, por tanto, una potente herramienta que permite obtener un perfil bioquímico preciso del organismo, tanto en el proceso patológico como en el estado de salud o control. Los métodos para identificar y cuantificar metabolitos incluyen técnicas como la cromatografía líquida de alto rendimiento, la cromatografía de gases, la electroforesis capilar, la espectrometría de masas, la espectroscopía Raman, la espectroscopía de infrarrojo cercano y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN). Entre estas técnicas, la espectroscopía de RMN puede utilizarse, para cuantificar metabolitos en un biofluido. Se trata de una tecnología útil ya que proporciona medidas tanto cualitativas como cuantitativas con alta reproducibilidad, permite estudiar simultáneamente un elevado número de compuestos en el mismo fluido biológico, y es una técnica no destructiva, por lo que la muestra podría analizarse posteriormente mediante otras técnicas para obtener información complementaria.

Las lágrimas se han comenzado a usar para diagnóstico de enfermedades oculares y enfermedades sistémicas desde hace pocos años. Una ventaja del empleo de lágrimas es que son muestras relativamente fáciles de obtener (incluso en la propia consulta),

con un procedimiento indoloro, y fáciles de almacenar y transportar en comparación con otras muestras biológicas.

En el contexto de esta invención, con la hipótesis de que la actividad metabólica de pacientes de GPAA difiere de la de los individuos no afectados por esta enfermedad, el perfil metabolómico de una muestra biológica relacionada con la patología y aislada de un paciente de GPAA es distinto al de un sujeto que no padezca dicha patología.

Existen antecedentes de estudios metabolómicos en relación con el contexto de esta invención, ya sea porque se centran en la misma enfermedad o bien en la misma muestra biológica:

Galbis-Estrada C. *et al.* (*Differential effects of dry eye disorders on metabolomic profile by ^{1}H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. *Biomed Res. Int.* 2014, 542549 (2014)) utilizaron espectroscopía de RMN de protón para determinar el perfil metabólico en lágrimas de pacientes con ojo seco, pero en ningún momento divulgan si padecen glaucoma ya que, no todos los pacientes con ojo seco presentan glaucoma, ni viceversa. El método de la presente invención se ha obtenido con pacientes que no presentan ojo seco. Además, en el trabajo de Galbis-Estrada la validación del modelo se realiza con validación cruzada de datos que han participado en la elaboración del modelo, es decir, que las muestras que se han utilizado en la validación son parte de las muestras con las que se ha construido el modelo, y no con un conjunto adicional como en el caso de la patente que se presenta. Adicionalmente, sólo se indican los metabolitos que participan en el modelo, pero no indican los coeficientes con los que participan. Además, ese modelo estaría diseñado para la discriminación de ojo seco frente a controles, y no de Glaucoma frente a controles. En consecuencia, el modelo obtenido por Galbis-Estrada es menos robusto y con distinto fin que el modelo obtenido con el método de la presente invención.

El modelo de la publicación de Galbis-Estrada puede estar sobreentrenado para las muestras con las que ha sido generado y dar buenos resultados para estas muestras, y a la vez no dar buen resultado cuando se aplica a muestras en las mismas condiciones pero que no han participado en el modelo. Por tanto, la fiabilidad del modelo para discriminar ojo seco frente a controles presentado en el trabajo de Galbis-Estrada es mucho menor.

Debido a que no todas las personas que presentan ojo seco presentan también glaucoma, el método divulgado por Galbis-Estrada no serviría para detectar y/o monitorizar GPAA. La prevalencia del GPAA en la población global es del 0,38% y de un 3,54% para individuos entre 40 y 80 años, mientras que un 10-20% de la población general sufre síndrome de ojo seco, y un 54,3% en edad superior a 40 años.

Rossi C. *et al.* (*Multi-omics approach for studying tears in treatment-naïve glaucoma patients. Int. J. Mol. Sci.* ***20****, 4029 (2019)*) realizaron un estudio metabolómico mediante HPLC MS/MS y proteómico dirigido con lágrimas de pacientes de GPAA, y se presentaba una combinación final de moléculas (biomarcadores) con diferencias significativas en las concentraciones medias en alanina, arginina, lisina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, valina, acilcarnitinas y lisofosfatidilcolina, entre GPAA y control para 33 pacientes.

El artículo de Mayordomo-Febrer A. *et al.* (*Metabolomics of the aqueous humor in the rat glaucoma model induced by a series of intracamerular sodium hyaluronate injection. Exp. Eye Res. 131, 84 (2015)*) analiza el perfil metabolómico del humor acuoso en ratas, y su utilidad en el diagnóstico del glaucoma, así como en la evaluación de la respuesta al tratamiento. Sin embargo, la presente invención emplea lágrimas humanas como muestra biológica frente al humor acuoso de rata utilizado en el trabajo de Mayordomo-Febrer, lo que supone una ventaja ya que se obtienen de forma mucho más sencilla que una intervención para obtener una muestra de humor acuoso.

A pesar de los resultados obtenidos en estos trabajos, ninguno ha sido ensayado en cohortes diferentes y más amplias; y, por tanto, sigue existiendo la necesidad de disponer de nuevos métodos y herramientas, alternativas o mejoradas y no invasivas basadas en el análisis de los perfiles metabolómicos de los individuos, que permitan la identificación del sujeto más vulnerable a padecer el glaucoma o progresar en la enfermedad. Todos estos aspectos han sido solucionados con la presente invención, facilitando así, la actuación terapéutica temprana necesaria para evitar, frenar o retrasar el comienzo de la enfermedad.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención describe un método para la detección precoz de GPAA, que comprende un algoritmo o modelo obtenido mediante el análisis multivariante de perfiles

metabolómicos de una muestra biológica de sujetos con GPAA y de sujetos control (voluntarios sanos que no padecen GPAA ni ninguna otra patología ocular). Ni los sujetos de GPAA ni los sujetos control con los que se ha desarrollado el método padecen ojo seco.

El término “biomarcador”, en relación a esta patología, se refiere a cualquier molécula, metabolito o analito (por ejemplo, pero sin limitarnos, proteínas, polipéptidos, azúcares, colesterol, lípidos, aminoácidos, péptidos, nucleósidos, nucleótidos, moléculas de tamaño pequeño derivadas de las rutas metabólicas, etc.) cuya presencia y/o cantidad esté implicada, y se pueda utilizar, para la detección, diagnóstico, pronóstico y/o monitorización del GPAA en un sujeto.

Las muestras biológicas referidas en la presente invención pueden ser opcionalmente pretratadas, por ejemplo, por filtración, concentración, centrifugación, inactivación de componentes que interfieren con el posterior análisis, adición de sueros, tampones o reactivos, etc., antes de ser analizadas según se describe en esta memoria. Las muestras biológicas, preferiblemente lágrimas pueden ser pretratadas mediante la adición de tampón fosfato previamente a su análisis.

Se entiende por “análisis metabolómico” el estudio global, cualitativo y cuantitativo, de los metabolitos o biomoléculas presentes en una muestra biológica. En la presente invención, dicho análisis se puede realizar mediante espectroscopía de RMN de alto campo.

Los términos “detección” y “diagnóstico” tienen el significado habitual en el área y se refieren al proceso mediante el cual se identifica la presencia o ausencia de la enfermedad y, preferiblemente, además su grado o estadio, en un sujeto, preferiblemente de forma precoz.

El término “pronóstico”, tal y como se emplea aquí, se refiere al diagnóstico precoz del GPAA, es decir, a determinar o predecir, antes de la aparición de los síntomas clínicos característicos de la enfermedad, si el sujeto padecerá GPAA.

El término “monitorización” o “seguimiento” se refiere al proceso mediante el cual se establece una predicción de los sucesos o eventos que ocurrirán en el desarrollo o curso de una enfermedad, en el contexto de la presente invención de la GPAA, incluyendo,

pero sin limitarnos, recaída, mejora (regresión de la enfermedad), empeoramiento (progresión de la enfermedad), y/o respuesta a un determinado tratamiento o terapia.

El término “precoz” tal y como se emplea aquí, se refiere a que el método de la invención es capaz de detectar cambios metabólicos en aquellos sujetos con mayor riesgo: (edad >40 años, antecedentes familiares, miopía, diabético, etc.) de padecer GPAA, y/o en cualquier momento una vez detectada la HTO y antes de la aparición de los signos o síntomas de neurodegeneración.

El paciente con GPAA no presenta síntomas. De ahí la importancia de un diagnóstico precoz basado en biomarcadores moleculares, como el que nos ocupa. El método de la presente invención presenta la ventaja de que comprende un análisis bioquímico y molecular de la muestra biológica, ya que ésta es la única manera de detectar los cambios de forma precoz, ya que las manifestaciones clínicas sólo a parecen cuando el GPAA (enfermedad neurodegenerativa irreversible) aparece, y el sujeto puede haber iniciado ya el camino a la ceguera. De ahí que sea esencial el método de la invención proporcione un diagnóstico molecular lo antes posible una vez que se ha detectado la hipertensión ocular.

La presente invención se refiere a un método *in vitro* para la detección, diagnóstico y pronóstico precoces de GPAA en un sujeto y/o su monitorización, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a. realizar un análisis metabolómico mediante espectroscopía de RMN de alto campo de la muestra biológica obtenida de un sujeto,
b. realizar el procesado del análisis de la etapa (a) mediante la transformada de Fourier, la corrección de la fase, la línea base y el desplazamiento químico de las señales del análisis obtenido en la etapa (a),
c. integrar el área bajo la curva de las señales presentes en los intervalos correspondientes a los metabolitos de interés, e indicados en la segunda columna de la Tabla 1, de este modo se obtienen los valores de las variables x_i para la muestra biológica, los metabolitos de interés comprenden leucina, N-acetil aspártico (NAA), taurina/glucosa, glicina, compuesto 1, urea, compuesto 2, fenilalanina, compuesto 3, compuesto 4 y ácido fórmico,
d. normalizar los datos de las integrales x_i calculadas para el espectro de la muestra en la etapa (c) dividiendo por la suma de todas las integrales de la muestra obteniendo las variables normalizadas $x_{i,norm}$ según la siguiente expresión:

$$x_{i,norm} = \frac{x_i}{\sum_{i=1}^{n} |x_i|}$$

e. introducir los datos de integración normalizados $x_{i,norm}$ obtenidos en la etapa (d) en la siguiente ecuación matemática para realizar el autoescalado de los datos obteniéndose los datos preprocesados $x_{i,p}$ según la siguiente expresión, en la que los valores de A_i y B_i se obtienen de la Tabla 1:

$$x_{i,p} = \frac{x_{i,norm} - A_i}{B_i}$$

f. introducir los datos obtenidos en la etapa (e) en el siguiente algoritmo, en la que los valores de w_i se obtienen de la tabla 1:

$$valor = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} x_{i,p} \cdot w_i + 2{,}214534}{6{,}6436044}$$

a partir del resultado en la etapa (f), si es inferior a 0,68, el sujeto será positivo para GPAA y si el resultado es superior o igual a 0,68 el sujeto será negativo para GPAA.

Tabla 1: Metabolitos de interés incluidos en el método de la invención, intervalos de integración, y parámetros de la expresión matemática o algoritmo.

Metabolitos (variables)	**intervalo ppm**	**B**	**A**	**w**
Leucina	0,90-0,98	0,027214	0,228677	-0,352837
NAA (N-acetil aspártico)	1,96-2,10	0,043768	0,551905	-0,254529
Taurina/glucosa	3,38-3,43	0,032517	0,058106	0,331679
Glicina	3,50-3,56	0,023989	0,075923	0,314677
Glucosa	5,21-5,25	0,005202	0,003820	0,290779
Compuesto 1	5,29-5,33	0,002112	0,002807	0,190923
Urea	5,65-5,88	0,019413	0,020788	0,293599
Compuesto 2	7,20-7,27	0,005788	0,022571	-0,372590
Fenilalanina	7,27-7,33	0,005584	0,023478	-0,380536
Compuesto 3	7,81-7,87	0,002623	0,006813	-0,036737
Compuesto 4	8,32-8,38	0,001633	0,003284	-0,313980
Ácido fórmico	8,43-8,46	0,000852	0,001146	-0,179460

El compuesto 1, compuesto 2, compuesto 3 y compuesto 4 no han sido identificados, pueden ser cualquier compuesto que de una señal en los intervalos de ppm indicados para estos compuestos en la segunda columna de la Tabla 1.

Todas las variables de la Tabla 1 son imprescindibles para llevar a cabo el método de la invención. Integrando los diferentes intervalos del espectro y aplicando el cálculo indicado se obtiene una discriminación para la detección de la enfermedad de GPAA en una muestra biológica.

Si al integrar las distintas regiones del espectro en una muestra biológica, no se obtiene señal en alguno de los intervalos, entonces el valor correspondiente a ese metabolito debe ser 0 para esa muestra biológica.

La muestra biológica pueden ser lágrimas, humor acuoso, humor vítreo o cualquier otro tejido de los ojos, preferentemente lágrimas.

Una gran ventaja del empleo de lágrimas como muestra biológica de la presente invención es que supone la utilización de un biofluido de fácil acceso, obtenido de manera no invasiva y económica.

En una realización preferente, las lágrimas se obtienen mediante capilaridad. Se puede emplear una micropipeta Pasteur de vidrio o plástico. Ésta se coloca en el canto externo ocular (donde se une el párpado superior e inferior) en el menisco inferior del ojo en cuestión, y con unos leves toques de la punta de la micropipeta se estimula la secreción de la lágrima refleja que ascenderá por el capilar hasta obtener aproximadamente medio tubo que se depositará en un tubo eppendorf de 100 µL para etiquetar convenientemente y congelar a -80ºC.

En una realización particular la muestra biológica es de al menos 5 µl de lágrimas de un sujeto, preferentemente al menos 10 µl de lágrimas, más preferentemente al menos 15 µl de lágrimas.

En una realización particular la muestra biológica de la etapa (a) puede comprender un pretratamiento, por ejemplo, por filtración, concentración, congelación, centrifugación, inactivación de componentes que interfieren con el posterior análisis, adición de sueros, tampones o reactivos, etc., y combinaciones de los anteriores.

Las muestras biológicas, preferiblemente lágrimas pueden ser pretratadas mediante la adición de tampón fosfato previamente a su análisis.

El pretratamiento de la muestra puede comprender la adición de al menos una de las siguientes soluciones: tampón (por ejemplo tampón fosfato a pH entre 7,0 y 7,8, preferentemente 7,4 o disolución salina), agua deuterada (D_2O), u otro disolvente (por ejemplo cloroformo, dimetilsulfóxido, etanol, metanol, diclorometano, acetona), algún compuesto como referencia para el desplazamiento químico y/o como referencia de concentración (por ejemplo DSS, sal sódica de 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfonato; ácido trimetilsililpropanóico TSP o tetrametilsilano, TMS, u otro compuesto) y/o el procedimiento necesario para preparar la muestra para la siguiente etapa. Estos compuestos y procedimientos son habituales en el área y un experto en la materia sabría identificarlos.

El análisis metabolómico de la etapa (a) puede ser un espectro de RMN de alto campo o espectrometría de masas (MS) acoplada o no a un elemento de separación como HPLC (*High proficiency Liquid Chromatography*) o UPLC (*Ultra Performance Liquid Chromatography*).

El uso de espectrómetros de RMN de alto campo permite obtener una mayor sensibilidad y una mayor resolución en el espectro, pudiendo así por una parte observar sustancias que estén en menor concentración y por otra separar señales que a intensidades de campo inferiores estarían solapadas con señales de otras sustancias, y no permitirían su correcta identificación y cuantificación. Si no fuera RMN de alto campo probablemente no habría resolución o sensibilidad suficiente como para observar estas señales, dado que la concentración de los metabolitos en las muestras biológicas es baja y además la cantidad de muestra biológica es pequeña también.

En otra realización particular se emplea espectrometría de masas (MS) acoplada a una técnica de separación (HPLC-MS o UPLC-MS, por ejemplo). MS es más sensible y precisa de menor cantidad de muestra que la espectroscopía de RMN.

La espectroscopia de RMN hace uso de las propiedades de los núcleos atómicos en el seno de un campo magnético y su respuesta a la perturbación cuando se aplican pulsos de radiofrecuencia. Los núcleos atómicos se comportan como dipolos en el seno del campo magnético y se alinean con dicho campo. Ello permite estudiar la información estructural y bioquímica de la muestra.

En una realización particular se emplea la RMN de alto campo que comprende una radiofrecuencia de giro para el protón superior a 500 MHz (11,7 T), preferiblemente al menos de 600 MHz (14 T).

En una realización particular la espectrometría de RMN de alto campo comprende el uso de una criosonda para mejorar la sensibilidad de los experimentos de RMN.

En una realización particular se utilizan tubos de RMN 1,7 mm para albergar de manera adecuada la muestra junto con el tampón y/o resto de soluciones.

El espectro de RMN de alto campo puede ser de protón o carbono. En una realización particular el espectro de RMN de alto campo es de protón.

En otra realización particular el espectro de RMN de protón comprende una secuencia 1D de protón que es una secuencia “noesy”.

En una realización particular el espectro de la señal de RMN analizado es ente 0,1 y 10 ppm ambos extremos comprendidos, más preferentemente entre 0,5 y 4,7 ppm y 5,0 y 8,5 ppm ambos extremos comprendidos.

El uso de secuencias de protón permite obtener información metabólica con un menor tiempo de adquisición, dada la abundancia natural de este isótopo y su presencia en las moléculas orgánicas que están presentes en los sistemas biológicos. Ejemplos de secuencia monodimensional (1D) de protón son, pero sin limitarnos, secuencia CPMG, noesy 1D, o un pulso con presaturación en la señal de agua. La secuencia 1D de protón empleada en la presente invención puede ser una “secuencia noesy”, más preferiblemente con presaturación durante el tiempo de relajación y tiempo de mezcla, con, preferiblemente, más de 200 *scans* con una anchura espectral de entre 10 y 50 ppm, preferiblemente 30 ppm.

Como el experto en la materia conoce, la secuencia “noesy”, en una medición de RMN, es una secuencia de pulsos diseñada para optimizar la supresión de la señal del disolvente, en este caso del agua. En la presente invención, la secuencia de elección es una secuencia de protón monodimensional, preferiblemente la secuencia 1D-noesy. La secuencia 1D-noesy se puede programar en el espectrómetro de RMN de alto campo.

La determinación de los metabolitos implicados en la detección de la patología se puede realizar por medio de la identificación de las señales del espectro 1D-noesy incluidas en el modelo de clasificación, tras la aplicación del algoritmo de regresión multivariante PLS-DA (análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales). La identificación de dichas señales se puede realizar en base al desplazamiento químico, acoplamiento J e intensidad relativa de señales, y la consulta de bases de datos metabolómicas como HMDB (The human metabolome database, hmdb.ca) y MDL (The Magnetic Resonance Metabolomics Database, mdl.imv.liu.se). La adquisición de espectros 2D TOCSY permitió verificar la asignación de metabolitos.

La etapa de realización del análisis metabolómico de la muestra problema se lleva a cabo bajo las mismas condiciones de preparación de muestra biológica de lágrimas y de adquisición de los espectros, que se utilizaron con las muestras usadas para la obtención del algoritmo matemático.

La etapa (b) del método divulga procedimientos básicos y habituales en el tratamiento de datos obtenidos por RMN. Cualquier software de tratamiento de datos de RMN tiene implementadas estas etapas de procesado y un experto en la materia sabría cómo aplicarlas.

En una realización particular, en la etapa de integración de las señales (b) se selecciona, en el espectro de RMN obtenido para la muestra problema, las mismas regiones que fueron seleccionadas en la etapa de integración de señales para las muestras utilizadas en la obtención del algoritmo o modelo. Preferiblemente, se lleva a cabo posteriormente a esta etapa de integración de las señales de la muestra problema, el mismo protocolo de procesado y normalización usado con las muestras utilizadas para la obtención del algoritmo matemático.

La aplicación a los datos de integración de la muestra biológica problema de un individuo permite obtener una clasificación de la muestra problema como control o bien como GPAA.

En la presente invención se realiza una cuantificación relativa individualizada de los metabolitos o biomarcadores. Para ello se realiza la integración de las señales del espectro de RMN de entre 0,1 y 10 ppm ambos extremos comprendidos, más

preferiblemente entre las regiones 0,5 y 4,7 ppm y 5 y 8,5 ppm, ambos extremos comprendidos, dejando fuera la región correspondiente a la señal del agua. La integración de señales a lo largo del espectro permite considerar, para la identificación de biomarcadores, tanto la región alifática como la región aromática del espectro. Las señales relevantes para el algoritmo o modelo son las indicadas en la Tabla 1.

La integración de señales se refiere a calcular el área bajo la curva para cada una de las señales entre los límites indicados para cada intervalo.

Para aumentar la sensibilidad y robustez del método de la invención su realizó un análisis de componentes principales (PCA) que permitió determinar si existen agrupaciones entre los grupos de muestras, así como detectar la presencia de *outliers* o muestras cuyos valores se encuentran estadísticamente fuera de rango para el conjunto de muestras. Una vez detectados posibles *outliers*, se puede lograr un mayor peso estadístico en futuros análisis realizados en el conjunto muestral resultante.

El algoritmo de regresión multivariante permite calcular el grado de participación, o peso, que cada una de las señales de integración tienen en el modelo desarrollado para discriminar entre muestras de sujetos control y muestras de paciente de GPAA, en nuestro caso, y se indica en la columna w de la Tabla 1. Las señales de integración que participan en el modelo, se identifican posteriormente como pertenecientes a diferentes metabolitos en función de su desplazamiento químico, multiplicidad y acoplamiento J (asignación).

Así, el método de la invención que comprende un algoritmo de regresión multivariante usado permite identificar, a partir de las muestras de lágrimas previamente analizadas por RMN, perfiles metabolómicos que correlacionan con fenotipos clínicos de GPAA. En otra realización preferida, el algoritmo de regresión multivariante empleado es un análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Éste es un algoritmo versátil y bien conocido que se utiliza para la generación de modelos predictivos o descriptivos, así como para la selección de variables discriminantes. PLS-DA combina reducción en la dimensionalidad y análisis discriminante en un algoritmo, y permite especialmente el análisis de datos con una alta dimensionalidad (un gran número de variables respecto al número de muestras en estudio).

En una realización particular el método de estadística multivariante puede ser: un algoritmo clasificador del grupo seleccionado entre un clasificador de árbol de decisión, clasificador de regresión logística, clasificador de vecino más cercano, clasificador de red neuronal, modelo de mezcla gaussiano (GMM), Máquina de Vector de Soporte (SVM) clasificador, clasificador de centroide más cercano, clasificador de regresión lineal, clasificador lineal de análisis discriminante (LOA), clasificador de análisis discriminante cuadrático (QDA), clasificador de bosque aleatorio y análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales o PLS-DA, preferentemente análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales o PLS-DA.

La Tabla 2 recoge las "puntuaciones VIP" para el modelo, esto es el grado de participación de cada metabolito en el modelo. A mayor puntuación, más relevantes son en el método.

Tabla 2: puntuaciones VIP de cada metabolito

Metabolito	**Desplazamiento químico (ppm)**	**Puntuación VIP**
Leucina	0,90…0,98	1,209459924
NAA	1,96…2,10	0,872477944
Taurina/glucosa	3,38…3,43	1,136932205
Glicina	3,50…3,56	1,078653934
Glucosa	5,21…5,25	0,99673594
Compuesto 1	5,29…5,33	0,654447342
Urea	5,65…5,88	1,006402729
Compuesto 2	7,20…7,27	1,277169359
Fenilalanina	7,27…7,33	1,304404152
Compuesto 3	7,81…7,87	0,125927523
Compuesto 4	8,32…8,38	1,07626458
Ácido fórmico	8,43…8,46	0,615154059370

El método de la invención comprende al menos los siguientes metabolitos: leucina, NAA, taurina/glucosa, glicina, glucosa, Compuesto 1, urea, Compuesto 2, fenilalanina Compuesto 3, Compuesto 4 y ácido fórmico.

El espectro recoge todas las señales entre 0,1 y 10 ppm y es por ello que con un solo espectro se obtiene la información de todos los intervalos lo que supone una ventaja adicional del método de la invención. Si hay alguna señal que no aparece, su integral será 0.

El método de la invención presenta una elevada sensibilidad (del 100%) y especificidad (del 83,3%) para la determinación de GPAA. Cabe destacar que, hasta la fecha, no se había conseguido alcanzar una sensibilidad y especificidad tan altas como las de la presente invención. (Rossi, C. *et al.* Multi-omics approach for studying tears in treatment-naïve glaucoma patients. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, (2019)).

Por otro lado, el coste de aplicación del método de la invención es muy bajo, y es mínimamente invasivo lo cual resulta también ventajoso. La adquisición de los datos puede protocolizarse de manera que sea sumamente reproducible y comparable dentro del mismo paciente y entre diferentes individuos. Esto permite realizar el estudio tanto en el diagnóstico como en el seguimiento de la enfermedad, y se puede implementar como una estrategia de cribado entre individuos sanos y pacientes de GPAA por su bajo coste y por ser mínimamente invasiva. Para el diagnostico de GPAA es necesaria la presencia de los signos de discos ópticos y alteraciones consistentes del campo de visión. Sin embargo, esta enfermedad es asintomática, y la pérdida de campo de visión no es evidente hasta que se pierden al menos un 30% de las células ganglionares de la retina. Es por eso que el diagnóstico de GPAA frecuentemente ocurre tarde, siendo necesario el desarrollo de estrategias para un diagnóstico precoz.

En una realización particular, el método de la invención se puede combinar con los datos sociodemográficos del sujeto. Por ejemplo, los datos obtenidos de las lágrimas se pueden integrar con datos sociodemográficos (edad y sexo), antecedentes familiares de GPAA, otras comorbilidades que podrían favorecer su aparición (diabetes, miopía, apnea del sueño, etc.), y sobre todo con resultados del examen oftalmológico sistematizado (agudeza visual mejor corregida, gonioscopía, biomicroscopía del segmento anterior ocular, presión intraocular, examen del nervio óptico en el fondo de ojo, exploración del campo visual, tomografía de coherencia óptica).

En una realización particular se puede emplear un *software* para llevar a cabo al menos una de las etapas b-f del método de la invención. Dicho *software* comprenderá, preferiblemente, las instrucciones para llevar a cabo dicho método. Ejemplos de estos

programas pueden ser Topspin, MNova NMR, Chenomx, Amix, ACD/Sectrus Processor, SpinWorks, etc.

El método de la invención también puede trasladarse al diseño de prototipos, en los cuales se pueden utilizar estos metabolitos para detectar aquellos sujetos cuya muestra biológica experimente cambios compatibles con GPAA según el modelo determinado y que por tanto poseen mayor riesgo de padecer el GPAA, y con ello el oftalmólogo obtendrá una información adicional para valorar al paciente (que no se podría obtener por otras vías). Por otra parte, el método de la invención tiene también capacidad pronóstica, puesto que, si estos metabolitos están implicados en el GPAA, tanto en su desarrollo como en su progresión, se pueden utilizar para prever o estimar la posibilidad de este paciente de progresar en el GPAA y de perder su visión.

El término "sujeto", tal y como se utiliza en la memoria, es sinónimo de “individuo” y se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos. El término "sujeto" no pretende ser limitativo en ningún aspecto, pudiendo ser éste de cualquier edad, sexo y condición física.

En una realización particular, los sujetos son mamíferos, más preferiblemente humanos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1. **Representación de las componentes principales 1 y 2 para todo el conjunto de datos.** Se representan en un espacio bidimensional las dos componentes principales. Se puede observar una elipse como un intervalo de confianza del 95% y como una de las muestras de sujeto control y del sujeto con GPAA se desvían del resto. Se indica para cada componente principal el porcentaje de varianza de cada una de las componentes principales que se representan en cada eje.

FIG. 2. Representación del conjunto de entrenamiento y validación en el análisis de PLS-DA. Esta figura representa, en un espacio bidimensional de las dos primeras variables latentes, cada una de las muestras del conjunto de entrenamiento. Se observa la distribución diferenciada de ambos conjuntos de muestras. Una vez realizado el entrenamiento, se aplicó al tercio restante de las muestras para su validación externa, y se seleccionaron las variables de forma iterativa en función del nivel de aportación al modelo hasta lograr su optimización. La predicción en el conjunto de validación externa resultó en una sensibilidad de 100% y una especificidad del 83,3%.

FIG. 3. Curva ROC del algoritmo o modelo. Se representa un espacio bidimensional donde se puede observar la especificidad frente a la sensibilidad del método de la invención.

FIG. 4: Espectro obtenido de la muestra biológica del sujeto A. Se incluyen las regiones integradas. Los valores para cada integral están en la Tabla 3.

FIG. 5: Espectro obtenido de la muestra biológica del sujeto B. Se incluyen las regiones integradas. Los valores para cada integral están en la Tabla 3.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Obtención del método de la invención

Se obtuvo un conjunto de datos metabolómicos obtenidos a partir de muestras de lágrimas de dos grupos de sujetos: con GPAA y de sujetos control, para después tratar estadísticamente dichos datos y generar así un algoritmo o modelo para ser aplicado a un perfil metabolómico obtenido mediante RMN de una muestra problema, teniendo en cuenta el peso que cada uno de los biomarcadores implicados e identificados tiene en dicho algoritmo o modelo. Este algoritmo tiene en cuenta un conjunto de biomarcadores (Tablas 1 y 2) con diferente grado de participación en la enfermedad, entre los cuales se encuentran, leucina, taurina, glicina, glucosa, urea, fenilalanina, ácido fórmico, ácido N-acetil aspártico y otros compuestos que pueden ser lípidos (compuesto 1, compuesto 2 compuesto 3 y compuesto 4). Estos biomarcadores han sido obtenidos mediante

técnicas de análisis metabolómico, que clasifican pacientes con GPAA y sujetos sanos con una elevada sensibilidad y especificidad.

El proceso de generación del algoritmo o modelo del método de la invención comprendió las siguientes etapas:

a. realizar un análisis metabolómico de una pluralidad de muestras biológicas aisladas de lágrimas, de sujetos que padecen GPAA y de sujetos que no padecen GPAA, donde dicho análisis se realiza mediante espectroscopía de RMN en un espectrómetro de alto campo y con una secuencia monodimensional (1D) de protón, preferiblemente una secuencia noesy con presaturación durante el tiempo de relajación y tiempo de mezcla, obteniendo señales de RMN para cada muestra,
b. realizar la integración de las señales, más preferiblemente entre las regiones 0,5 y 4,7 ppm y 5,0 y 8,5 ppm, del espectro metabolómico de RMN obtenido en la etapa (a),
c. utilizar un algoritmo de regresión multivariante por componentes principales (PCA) para la identificación y eliminación de muestras *outliers*,
d. analizar las señales de integración del espectro de RMN de las muestras resultantes de la etapa (c) mediante un algoritmo de regresión multivariante,
d1 obtener el algoritmo o modelo en base al análisis aplicado en la etapa (d) y
d2 mejorar el algoritmo o modelo por medio de selección de las señales que más aportan al algoritmo (VIP).

Concretamente, se seleccionaron pacientes diagnosticados de GPAA (11 pacientes) y sujetos control (19 sujetos) (sanos sin patología ocular, ni GPAA ni otra diferente) y se obtuvieron muestras de lágrimas de estos sujetos. En total se analizaron 30 muestras biológicas de lágrimas que es un número mínimo razonable para poder realizar un estudio. Se utilizaron un 66% de las muestras para obtener el método de la invención y se aplicó sobre el 33% restante para validarlo, de manera que las muestras de la validación del método no habían participado en su elaboración.

Las lágrimas se obtuvieron por capilaridad y se congelaron para su conservación a -80 ºC hasta el momento de su estudio mediante espectroscopía de RMN para obtener un perfil metabólico lo más detallado posible, con el objetivo de encontrar un biomarcador o conjunto de biomarcadores que permita discriminar lágrimas de sujetos de ambos grupos. Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se tomaron 20 µl de lágrima, junto con 40 µl de tampón fosfato, se introdujeron en un tubo capilar de 1,7 mm

de diámetro para RMN. Se realizó la adquisición de espectros de RMN en un espectrómetro de 600 MHz a una temperatura de 310 K. Se programaron, entre otros experimentos, secuencias monodimensionales de protón, noesy con presaturación durante el tiempo de relajación y tiempo de mezcla. Se programaron 200 barridos (scans) con una anchura espectral de 30 ppm. Después de la adquisición de los espectros se realizó el preprocesado de los datos consistiendo este en una apodización, transformada de Fourier, corrección de fase, de línea base y de desplazamiento químico con el programa Mestrenova. Se realizó la integración de las señales del espectro en los intervalos 0,5 - 4,7 ppm y 5,0 - 8,5 ppm.

Se reservaron dos tercios de las muestras para calcular el algoritmo o modelo que mejor realizara la discriminación entre lágrimas de GPAA y lágrimas control. Todos los espectros: los que se incluyen en el conjunto de calibración, los que se incluyen en el conjunto de validación y los que se incluyen en conjuntos posteriores con propósito de averiguar el diagnóstico, deben presentar el mismo procedimiento de preparación de muestra, adquisición de espectros, preprocesado de espectros, y preprocesado de los datos para el análisis de estadística multivariante.

De ese modo, el conjunto de datos inicial es el conjunto de señales de integración obtenidas del espectro de RMN para una determinada muestra biológica (lágrima). Previo a la generación del modelo, con el conjunto de variables para todas las muestras se realizó un análisis de componentes principales (PCA), para identificar "*outliers*". De este modo se eliminaron dos muestras (una de un sujeto con GPAA y otra de un sujeto control). Esto se puede observar en la figura 1.

Los datos metabolómicos resultantes del estudio mediante RMN se sometieron a análisis estadístico multivariante mediante PLS-DA (análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales). El análisis PLS-DA se realizó con las muestras restantes después de suprimir los "*outliers*". Cada variable fue normalizada respecto a la suma del resto de variables, y autoescalada. Se establecieron conjuntos de calibración (66% de las muestras) y validación (33% de las muestras) y se realizó una selección iterativa de variables en función del nivel de aportación al modelo, hasta conseguir la optimización del mismo (Tabla 2, puntuaciones VIP), rechazando aquellas variables que empeoraban su capacidad predictiva. De este modo el modelo generado discriminó en calibración las lágrimas de pacientes con diagnóstico de GPAA de las lágrimas de sujetos control, con una sensibilidad de 83,3%, y una especificidad del 100%. En validación cruzada para

establecer el número de variables latentes se obtuvo una sensibilidad del 83,3% y una especificidad del 91,67%. En el conjunto de validación, se obtuvo una sensibilidad del 100% y una especificidad del 83,3% para la discriminación de lágrimas de pacientes con GPAA frente a lágrimas de sujetos control. En este modelo se obtuvo un número óptimo de variables latentes de 1.

La validez del método se estima con el grado de aciertos sobre el conjunto de datos que ha servido para generarlo (calibración), con el grado de aciertos de diferentes combinaciones de esas mismas muestras (validación cruzada) y con el grado de aciertos sobre muestras que no han participado en la elaboración del modelo (validación o validación externa).

Posteriormente, se procedió a identificar las variables de mayor importancia en el modelo y a identificar los biomarcadores correspondientes a las señales de integración aplicadas al modelo, de acuerdo con el valor de su desplazamiento químico, y acoplamiento J. Los metabolitos que participan en el modelo son: leucina, taurina, glicina, glucosa, urea, fenilalanina, ácido fórmico, ácido N-acetil aspártico y otros compuestos (compuestos 1 a 4).

Se observa en la figura 2 cómo el algoritmo o modelo proporciona un número muy bajo de falsos positivos y falsos negativos, proporcionado por tanto una elevada sensibilidad y especificidad en la predicción (sensibilidad de 100 % y especificidad de 83,3 % para la predicción del conjunto de validación final).

La obtención del algoritmo o modelo, preferentemente, además comprende una etapa (d1) de normalización, y más preferiblemente posterior autoescalado (d2), de los datos de los espectros obtenidos tras la etapa (d). La “normalización” permite minimizar las diferencias debidas a diferente dilución y existen diferentes métodos para llevarla a cabo, por ejemplo, dividiendo por el área o altura de todas las señales en el espectro, o sólo por alguna señal de referencia, utilizando otros métodos como MSC (Multiplicative Signal Correction), PQN (Probabilistic Quotient Normalization), SNV (Standard Normal Variate scaling), entre otros. Preferentemente, se utiliza en esta invención la normalización de las áreas de las diferentes regiones integradas respecto a la suma total de las áreas consideradas para su estudio (en valor absoluto). Más preferentemente, con posterioridad a la normalización se realizará el autoescalado de

los datos normalizados, realizando un centrado en la media y una división de cada columna de datos (variable) por la desviación estándar de esa columna.

Las etapas (a) a (d2) permiten obtener, a partir de un conjunto de muestras biológicas llamadas “de entrenamiento”, un algoritmo o modelo útil para ser aplicado posteriormente en el diagnóstico, pronóstico y/o monitorización de la GPAA en muestras problema derivadas de cualquier sujeto que se pretenda diagnosticar, pronosticar y/o monitorizar.

Dicho “conjunto de entrenamiento” es el conjunto de muestras biológicas aisladas de lágrimas empleadas en la etapa (a). El algoritmo o modelo así generado para el conjunto de muestras de entrenamiento puede ser posteriormente validado para otras muestras distintas a las empleadas en la etapa (a), esto es muestras biológicas de sujetos sobre las que se realiza el método de la invención para detectar si padecerán GPAA.

Así, el algoritmo o modelo se ha mejorado mediante una etapa adicional (d2) de validación, junto a la etapa (d1). En dicha etapa de validación (d2) se vuelven a llevar a cabo las etapas (a) a (c) anteriormente descritas pero esta vez para un conjunto de muestras de validación, es decir, de muestras biológicas aisladas de lágrimas de sujetos que padecen GPAA y de sujetos que no padecen GPAA distintas a las empleadas previamente en el conjunto de entrenamiento. En esta etapa de validación se aplica el algoritmo o modelo, calculado, con el conjunto de entrenamiento según la etapa (d1), al conjunto de validación. Se obtendría pues el resultado de la predicción en un conjunto de muestras biológicas similares a las de calibración (entrenamiento) pero que no han participado en el entrenamiento, aunque sí participaron en la selección de metabolitos para la optimización del modelo. Los metabolitos más relevantes y su grado de aportación al algoritmo o modelo del método de la invención aparecen en las Tablas 1 y 2.

Además, a la validación se le aplica el test de permutaciones para constatar que los resultados obtenidos para la predicción del conjunto de validación eran robustos y no debidos a la casualidad. Se realizaron test de permutaciones con un elevado número de iteraciones (200) y se obtuvo una significación $p < 0,05$, por lo que se constata que los resultados obtenidos para la predicción del conjunto de validación son robustos y no debidos a la casualidad.

Finalmente, para concluir, se muestra en la figura 3 la curva ROC (del inglés *Receiver Operaton Characteristic* o Curva de eficacia diagnóstica), que representa gráficamente la sensibilidad frente a la especificidad para un sistema clasificador binario, con un área integrada bajo la curva (AUC) de 1,000. El elevado valor del AUC en la curva ROC, junto con los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en el entrenamiento y la validación, indican el gran potencial que el método de la invención tiene como una herramienta de detección precoz no invasiva del GPAA.

Ejemplo 2 Caso clínico de un sujeto

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad del método de la presente invención.

El método de la invención obtenido según el ejemplo anterior se aplica a dos muestras problema (muestra A, y muestra B) en las mismas condiciones que las utilizadas para la obtención del propio modelo, para poder determinar si el sujeto tendrá o no GPAA.

La detección de GPAA en la muestra biológica según el método de la invención comprende las siguientes etapas:

- el pretratamiento de las muestras biológicas, en este ejemplo se han pretratado 2 muestras de lágrimas, de dos sujetos, tomando 20 microlitros de lágrima por muestra y 40 microlitros de tampón fosfato con DSS y D_2O y se ha introducido cada muestra así preparada en un tubo de RMN de 1,7 mm
- la adquisición de los espectros de RMN (etapa a), se han realizado experimentos noesy 1D con la secuencia de pulsos Bruker noesygppr1d. Los espectros de estas dos muestras se pueden observar en las figuras 4 y 5
- la integración de las señales relevantes en los espectros (etapa c) tras realizar la transformada de Fourier, corrección de fase, de línea base y de desplazamiento químico (etapa b). En las figuras 4 y 5 se observan las diferentes regiones integradas. Los valores de integrales obtenidos para cada uno de los espectros se observan en la Tabla 3, junto con los resultados de aplicar el preprocesado (etapas d y e) y el resultado final (tras aplicar la etapa f).

Tabla 3: Valores de integrales, preprocesado y resultado para dos muestras A y B, de dos sujetos problema.

		Muestra biológica A			Muestra biológica B		
variable	intervalo ppm	Integrales (c)	Preproc (d y e)	Resultado	Integrales (c)	Preproc (d y e)	Resultado
Leucina	0,90-0,98	30771,62	-0,083	0,02927	30596,95	-2,240	0,79048
NAA	1,96-2,10	78807,22	0,639	-0,16261	99640,94	-0,132	0,03348
Taurina/glucosa	3,38-3,43	5329,88	-0,581	-0,19267	17386,33	1,144	0,37936
Glicina	3,50-3,56	9843,46	-0,146	-0,04584	23221,91	2,141	0,67373
Glucosa	5,21-5,25	174,46	-0,488	-0,14179	999,29	0,319	0,09262
Compuesto 1	5,29-5,33	98,97	-0,984	-0,18787	362,09	-0,389	-0,07429
Urea	5,65-5,88	3116,51	0,110	0,03242	4559,66	0,217	0,06358
Compuesto 2	7,20-7,27	2851,49	-0,275	0,10231	1791,38	-2,203	0,82082
Fenilalanina	7,27-7,33	2777,10	-0,545	0,20748	1996,16	-2,245	0,85441
Compuesto 3	7,81-7,87	1500,43	1,612	-0,05920	1200,13	-0,089	0,00328
Compuesto 4	8,32-8,38	558,73	0,507	-0,15910	306,58	-0,982	0,30832
Ácido fórmico	8,43-8,46	75,76	-0,691	0,12394	381,79	1,112	-0,19956
			(f) →	**0,73495**		(f) →	**0,10278**

Se obtiene finalmente un resultado en la etapa g de 0,73495 para la muestra A, al ser superior a 0,68, no se detecta GPAA en el sujeto A.

Para la muestra B se obtiene un resultado en la etapa g de 0,10278 inferior a 0,68, indicando una clasificación para la muestra B como paciente con GPAA.

Las etapas d, e y f se realizan usando el algoritmo o modelo obtenido descrito anteriormente.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para la detección precoz de GPAA en un sujeto y/o su monitorización, caracterizado porque comprende las siguientes etapas:

a. realizar un análisis metabolómico mediante espectroscopía de RMN de alto campo de una muestra biológica obtenida a partir de un sujeto,

b. realizar el procesado del análisis de la etapa (a) mediante la transformada de Fourier, la corrección de la fase, la línea base y el desplazamiento químico de las señales del análisis obtenido en la etapa (a),

c. integrar el área bajo la curva de las señales presentes en los intervalos correspondientes a los metabolitos de interés, e indicados en la segunda columna de la tabla 1, de este modo se obtienen los valores de las variables x_i para la muestra en estudio, los metabolitos de interés comprenden leucina, NAA, taurina/glucosa, glicina, compuesto 1, urea, compuesto 2, fenilalanina, compuesto 3, compuesto 4 y ácido fórmico,

d. normalizar los datos de las integrales x_i calculadas para el espectro de la muestra en la etapa (c) dividiendo por la suma de todas las integrales de la muestra obteniendo las variables normalizadas $x_{i,norm}$ según la siguiente expresión:

$$x_{i,norm} = \frac{x_i}{\sum_{i=1}^{n} |x_i|}$$

e. introducir los datos de integración normalizados $x_{i,norm}$ obtenidos en la etapa (d) en la siguiente ecuación matemática para realizar el autoescalado de los datos obteniéndose los datos preprocesados $x_{i,p}$ según la siguiente expresión, en la que los valores de A_i y B_i se obtienen de la Tabla 1:

$$x_{i,p} = \frac{x_{i,norm} - A_i}{B_i}$$

f. introducir los datos obtenidos en la etapa f en el siguiente algoritmo, en la que los valores de w_i se obtienen de la Tabla 1:

$$resultado = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n} x_{i,p} \cdot w_i + 2{,}214534}{6{,}6436044}$$

a partir del resultado en la etapa (f), si es inferior a 0,68, el sujeto será positivo para GPAA y si el resultado es superior o igual a 0,68 el sujeto será negativo para GPAA.

2. El método según la reivindicación anterior, en el que la muestra biológica se selecciona entre lágrimas, humor acuoso, humor vítreo y combinaciones de las anteriores, preferentemente lágrimas.

3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica son lágrimas y se obtienen mediante capilaridad con una micropipeta Pasteur de plástico o vidrio.

4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica son al menos 5 µl de lágrimas.

5. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la muestra biológica de la etapa a) comprende un pretratamiento seleccionado entre: filtración, concentración, congelación, centrifugación, inactivación de componentes que interfieren con el posterior análisis, adición de sueros, tampones o reactivos, y combinaciones de los mismos.

6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el pretratamiento comprende añadir a la muestra biológica al menos una de las siguientes soluciones:

- tampón,
- agua deuterada,
- un disolvente, y/o
- un compuesto de referencia para el desplazamiento químico y/o como referencia de concentración.

7. El método según la reivindicación anterior, en el que el tampón es tampón fosfato con un pH entre 7,0 y 7,8.

8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la espectroscopía de RMN de alto campo comprende una radiofrecuencia de giro para el protón superior a 500 MHz, preferiblemente al menos de 600 MHz.

9. El método según la reivindicación anterior, en el que la espectroscopía de RMN de alto campo comprende el uso de una criosonda.

10. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 9, en el que la espectroscopía de RMN de alto campo es de protón.

11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 10, en el que el RMN de protón comprende una secuencia 1D de protón que es una secuencia noesy.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores 8 a 11, en el que se integran las señales entre las regiones 0,1 y 10 ppm.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde los sujetos son humanos.

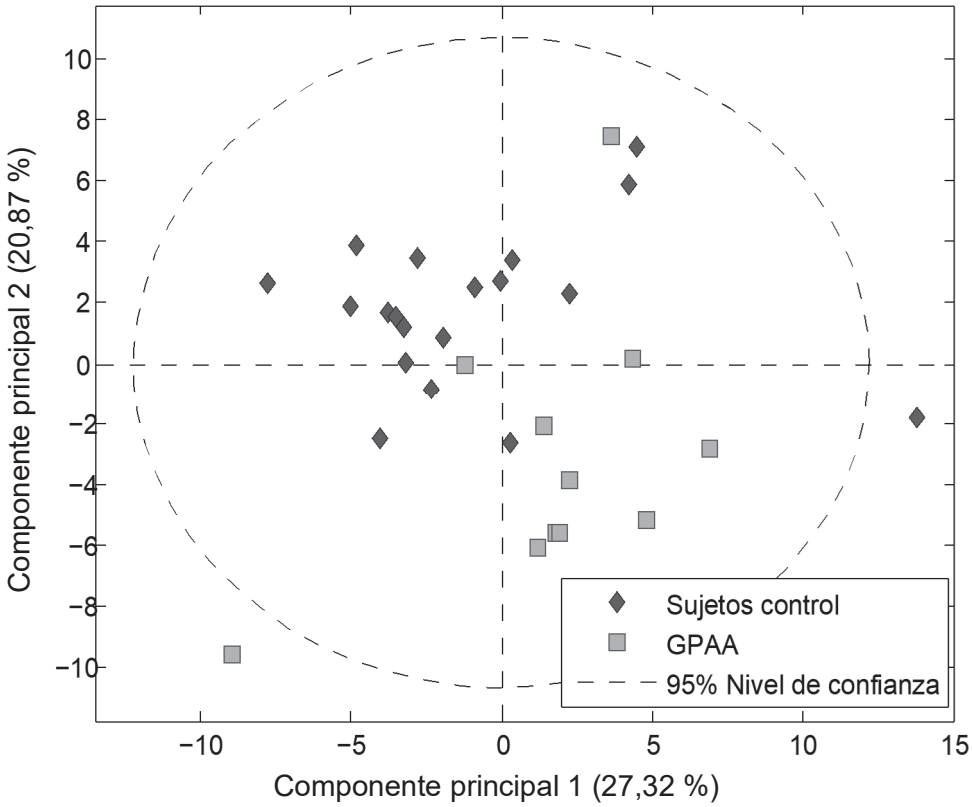
Componente principal 2 (20,87 %)
Componente principal 1 (27,32 %)
Sujetos control
GPAA
95% Nivel de confianza
10
8
6
4
2
0
−2
−4
−6
−8
−10
−10
−5
0
5
10
15

Fig 1

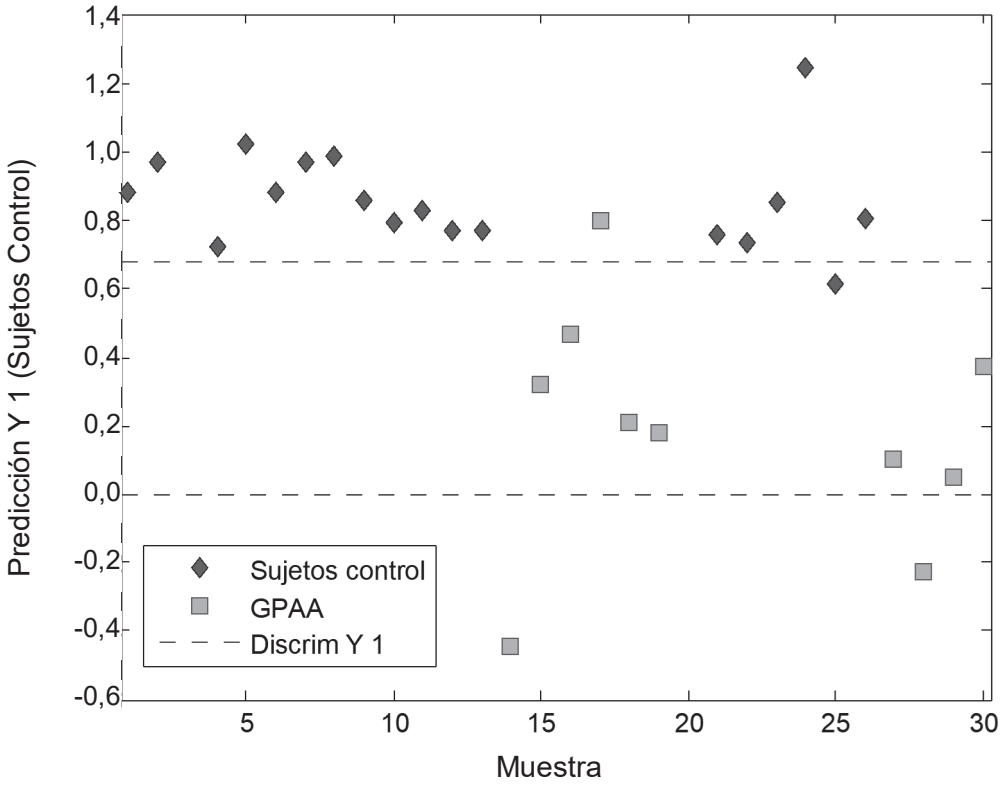
Predicción Y 1 (Sujetos Control)
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
-0,2
-0,4
-0,6
5
10
15
20
25
30
Muestra
Sujetos control
GPAA
Discrim Y 1

Fig 2

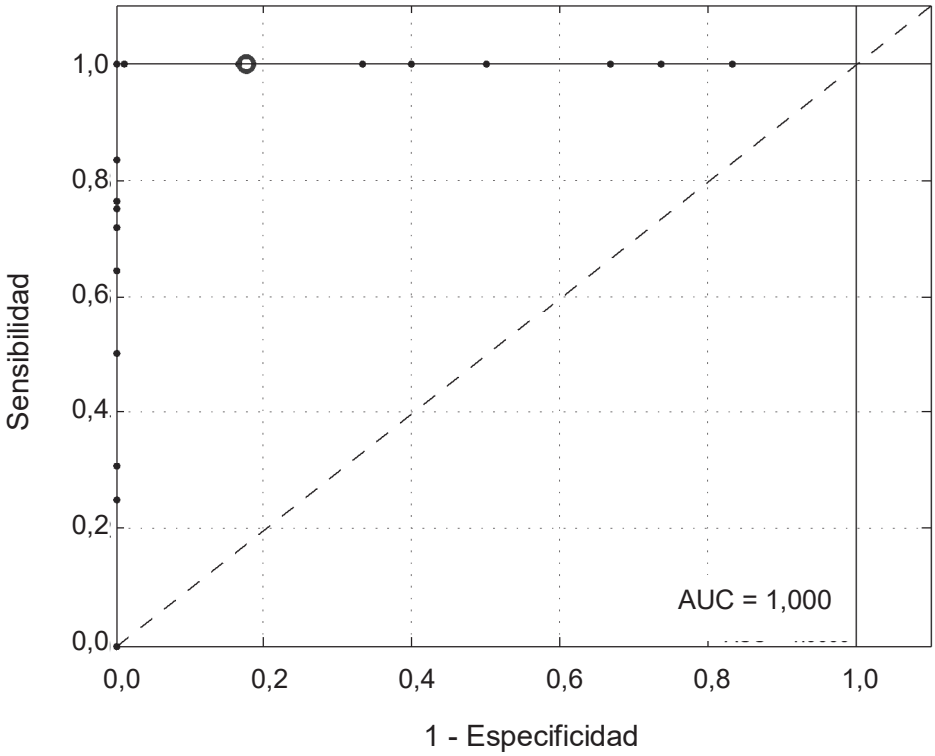
Sensibilidad
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0,0
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
1,0
1 - Especificidad
AUC = 1,000

Fig 3

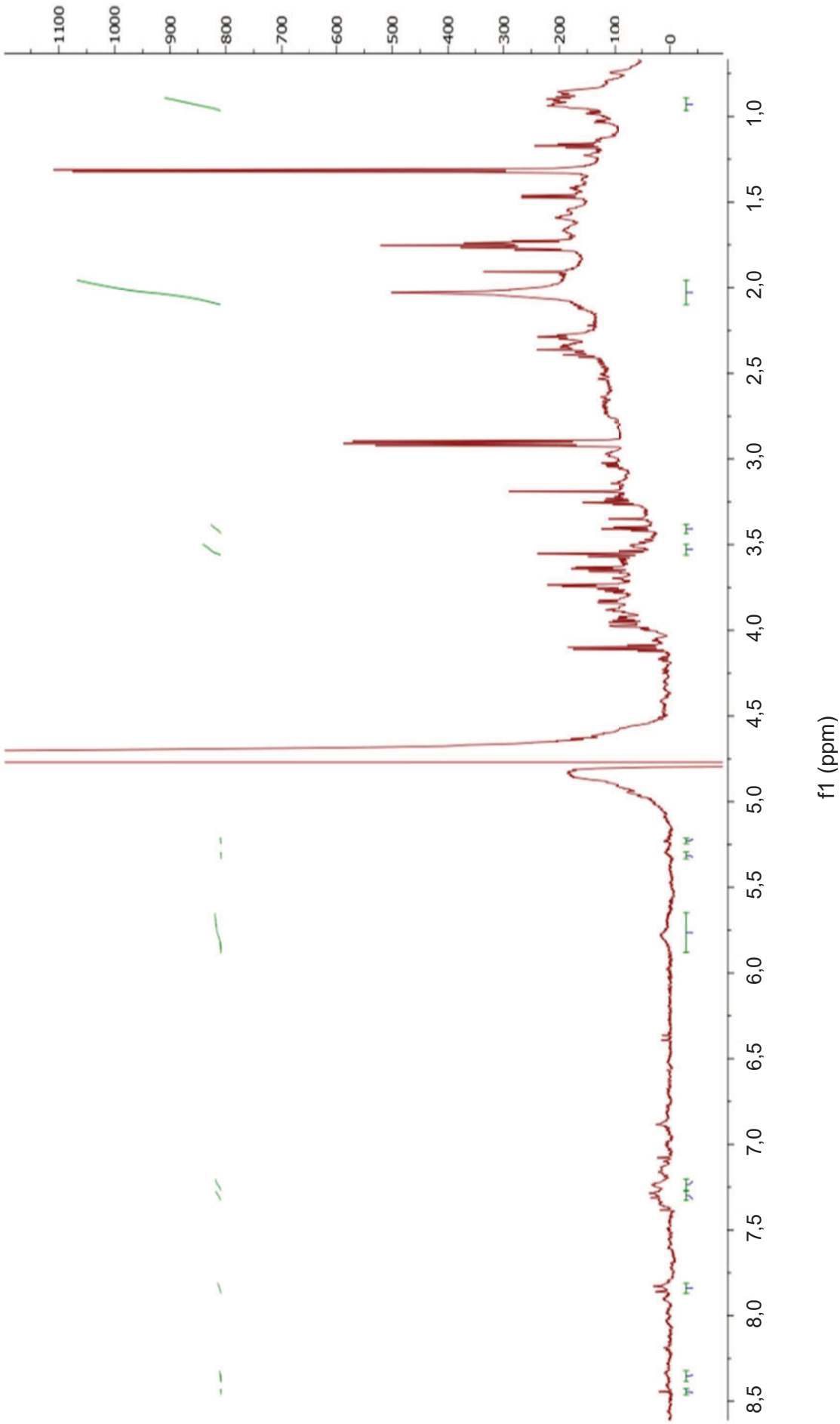
1100
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
1,0
1,5
2,0
2,5
3,0
3,5
4,0
4,5
5,0
5,5
6,0
6,5
7,0
7,5
8,0
8,5
f1 (ppm)

Fig 4

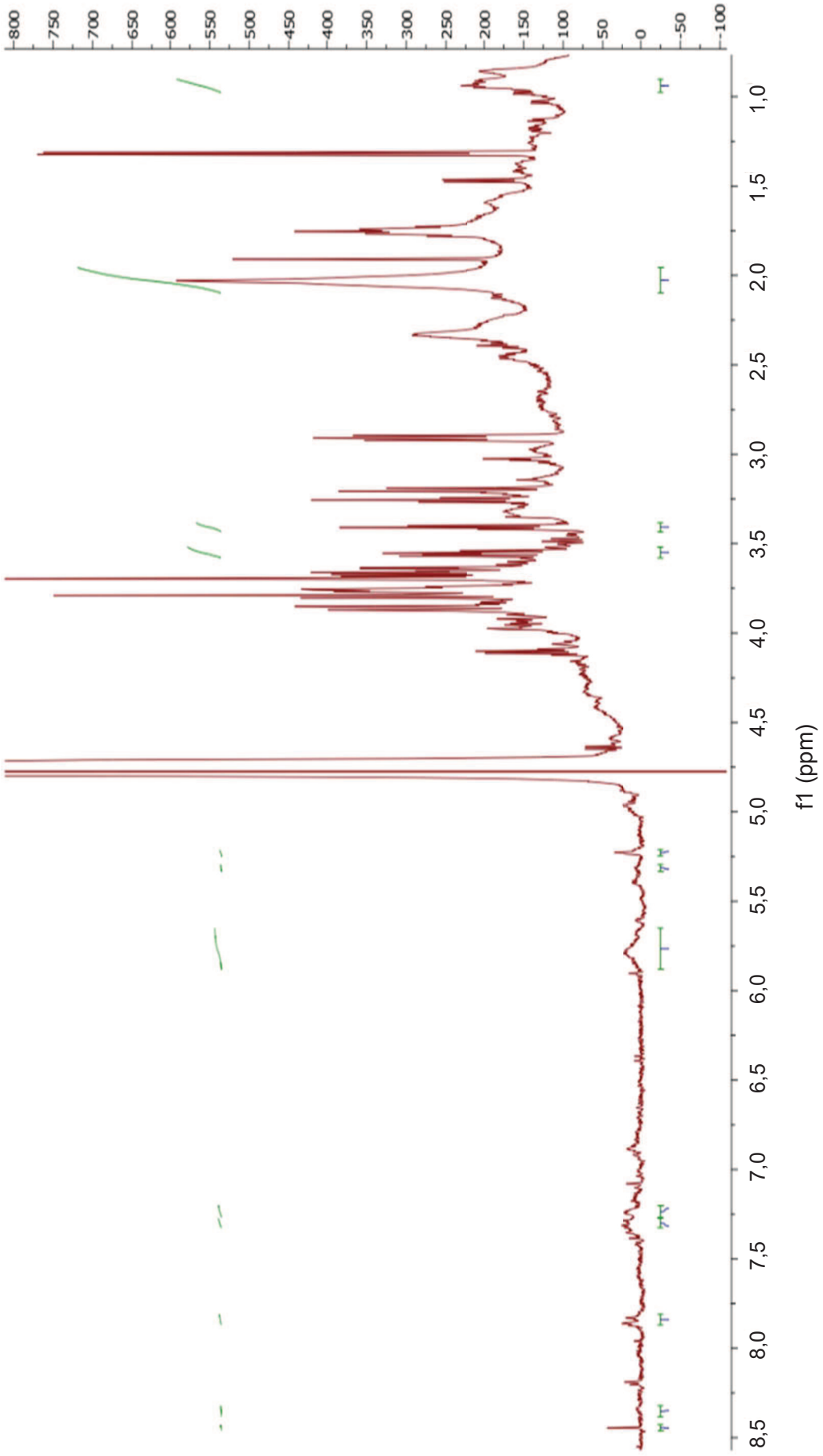

Fig 5

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 202131032

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 03.11.2021

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/487*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GALBIS-ESTRADA CARMEN et al. Differential Effects of Dry Eye Disorders on Metabolomic Profile by H-1 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. Biomed Research International 2014., 30/11/2013, Vol. 2014, Páginas Article No.: 542549 [en línea] [recuperado el 10/03/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/542549/>, ISSN 2314-6133(print) ISSN 2314-6141(electronic), <DOI: doi:10.1155/2014/542549>. Todo el documento.	1-13
A	MAYORDOMO-FEBRER A et al. Metabolomics of the aqueous humor in the rat glaucoma model induced by a series of intracamerular sodium hyaluronate injection. Experimental Eye Research, 20141203 ACADEMIC PRESS LTD, LONDON. Tamm Ernst R; Dowling John E, 03/12/2014, Vol. 131, Páginas 84 - 92 [en línea][recuperado el 10/3/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014483514003170?via%3Dihub>, ISSN 0014-4835, <DOI: doi: 10.1016/j.exer.2014.11.012>. Resumen. Sec. 3.2.	1-13
A	BARBOSA-BREDA JOAO et al. Clinical Metabolomics and Glaucoma. Ophthalmic Research 2018., 30/11/2017, Vol. 59, Páginas 1-6 [en línea] [recuperado el 10/3/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://www.karger.com/Article/FullText/479158>, ISSN 0030-3747(print) ISSN 1423-0259(electronic), <DOI: doi:10.1159/000479158>. Todo el documento.	1-13
A	WO 2019185918 A1 (UNIV ANGERS et al.) 03/10/2019, Resumen. Página 25, líneas 13-19. Figura 1	1-13

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
14.03.2022	F. Armero Abad	1/2

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

G01N2800, 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