



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 362 051**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08386023 .9**

96 Fecha de presentación : **13.10.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2053407**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.04.2009**

54 Título: **La proteína componente de amiloide P de suero (SAP, SAMP) como marcador de pronóstico y diagnóstico para el diagnóstico prenatal de la trisomía 21 (síndrome de Down).**

30 Prioridad: **26.10.2007 GR 070100651**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.06.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.06.2011**

73 Titular/es: **Foundation of Biomedical Research of the Academy of Athens  
Soranou Tou Efessiou 4  
115 27 Athens, GR  
George Tsangaris**

72 Inventor/es: **Tsangaris, George;  
Vougas, Konstantinos;  
Kolialexi, Aggeliki;  
Mavrou-Kalpini, Ariadni y  
Antsaklis, Aristidis**

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

**ES 2 362 051 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

La proteína componente de amiloide P de suero (SAP, SAMP) como marcador de pronóstico y diagnóstico para el diagnóstico prenatal de la trisomía 21 (síndrome de Down)

### B. Campo de la invención

La presente invención se refiere a la proteína componente de amiloide P de suero (SAP, SAMP) que se podría convertir en una diana y usarse como un marcador para el diagnóstico prenatal y evaluación de la trisomía 21 (síndrome de Down) por métodos no invasivos. Más específicamente, en la sangre periférica de mujeres embarazadas de fetos con trisomía 21 (síndrome de Down), se encuentra que el componente del amiloide P en suero (SAP, SAMP) muestra diferencias cuantitativas comparadas con embarazadas con fetos cromosómicamente normales.

### C. Antecedentes de la invención

Hoy la metodología usada para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas fetales incluye técnicas invasivas y no invasivas. Los procedimientos invasivos (amniocentesis, biopsia del trofoblasto y sangre fetal) tienen un riesgo significativo para la madre y el feto y por esta razón solo se recomiendan en mujeres embarazadas en las que el riesgo de tener un hijo cromosómicamente anormal es mayor que el riesgo de pérdida fetal debido a la técnica invasiva.

Puesto que el riesgo para anomalías cromosómicas aumenta con la edad materna, el diagnóstico prenatal está recomendado para mujeres mayores de 35 años de edad. Como resultado, nacen menos niños con síndrome de Down de mujeres mayores. Sin embargo, el 70% de los niños con esta anomalía cromosómica nacen de mujeres de 35 años de edad para las que no está recomendado el diagnóstico prenatal. Los métodos de diagnóstico prenatal no invasivos usados de forma rutinaria hoy para anomalías cromosómicas están recomendados para embarazos de poco riesgo. Estos métodos incluyen marcadores tanto bioquímicos como ultrasonográficos que se usan después de una estimación algorítmica solo para evaluar el riesgo de anomalías cromosómicas. En casos con marcadores bioquímicos o ultrasonográficos anormales se recomienda investigación adicional mediante diagnóstico prenatal invasivo. Además, estos marcadores no son específicos para la trisomía 21 y están asociados con una tasa de detección de falsos positivos del 5%, lo que produce un aumento en el número de mujeres que se someten a diagnóstico prenatal.

Las nuevas técnicas no invasivas para el diagnóstico prenatal basadas en el aislamiento de células fetales o ADN fetal sin células de sangre periférica materna parecen ser difíciles de aplicar en la práctica clínica debido a la falta de las características específicas para distinguir entre material fetal y materno. En la actualidad, el análisis proteómico se usa ampliamente para la detección de marcadores biológicos relacionados con enfermedades. Esta tecnología puede usar todos los tipos de líquidos y tejidos biológicos así como sangre periférica, lo que produce el desarrollo de pruebas clínicas rápidas, exactas y económicas que pueden alterar drásticamente los procedimientos diagnósticos y planteamientos terapéuticos actuales.

Un número limitado de datos publicados sobre el análisis proteómico del líquido amniótico y sangre periférica de mujeres embarazadas está relacionado con la detección de proteínas y péptidos durante la gestación como resultado de las alteraciones moleculares a nivel de ADN o ARN [documento WO2005/0217 A (Pantherhei Biosciences BV [NL] et al)]. Estos estudios muestran que el análisis proteómico es un planteamiento versátil para la detección de marcadores relacionados con afecciones patológicas durante el embarazo y estas proteínas/péptidos se pueden usar como marcadores de estas afecciones.

Estudios de los cerebros de fetos y adultos con síndrome de Down mostraron alteraciones de enzimas que participan en el metabolismo de glucosa, lípidos, purinas, ácido fólico y metionina, N-metiltransferasa de histamina disminuida, y alteraciones en la expresión de PRXIII del cerebro, lo que implica que más de un gen codifica proteínas relacionadas con el fenotipo del síndrome. En la presente invención se detectó e identificó una proteína, que como total o fragmentos de su secuencia, pueden ser dianas y usarse originalmente como marcador para el diagnóstico prenatal no invasivo del síndrome de Down, de todas las mujeres independientemente del riesgo de tener feto cromosómicamente anormal.

### D. Descripción de la invención

Se analizaron muestras de plasma de sangre periférica obtenidas de mujeres embarazadas que portaban fetos con trisomía 21 (síndrome de Down) y de casos que los portaban cromosómicamente normales usando técnicas proteómicas como se describe en detalle a continuación.

#### Métodos

El análisis proteómico incluye separación de proteínas por electroforesis en gel bidimensional e identificación de proteínas por espectrometría de masas. El procedimiento de identificación de proteínas, aparte de las técnicas analíticas, incluye software específico que se usa para analizar los geles bidimensionales y para almacenar la información obtenida en bases de datos.

#### 5 A. Separación de proteínas mediante electroforesis en geles bidimensionales

La técnica se basa en la separación simultánea de proteínas por su carga y peso molecular lo que produce el aislamiento en el gel de cientos de proteínas. De esta manera, tal estudio incluye la separación de proteínas por su carga (isoelectroenfoque, IEF) seguido por separación adicional basada en su peso molecular.

15 El IEF es un procedimiento de equilibrio por el cual las proteínas se mueven por la acción de un campo eléctrico de alto voltaje, a través de un gel de acrilamida con pH diferencial, que contiene inmobilinas (recubrimiento de tiras IPG). Durante su movimiento a través de la tira las proteínas se estabilizan y enfocan en áreas de la tira en la su carga se neutraliza. Las tiras IPG están disponibles en un gran intervalo de pH (tal como 3-10) y tamaño (7-24 cm), así como a intervalos de pH más cerrados (tal como 4,5-5,5). Las tiras IPG tienen la ventaja de analizar una cantidad relativamente alta de muestra. Las condiciones de electroforesis para el IEF están relacionadas con la cantidad de la muestra, el método usado para la aplicación de la muestra en la tira, el voltaje y tiempo del enfoque.

20 En la segunda dimensión, la separación de proteínas se basa en el peso molecular. Tiene lugar en un gel de poli(acrilamida) constante o en gradiente dependiendo del tamaño aproximado de las proteínas. Normalmente se usan geles constantes de acrilamida al 12% y gradientes de acrilamida del 9-16% para la separación de proteínas entre 5-200 kDa.

25 Por último, los geles se tiñen con colorantes. Normalmente se selecciona azul de Coomassie cuando las proteínas se tienen que identificar adicionalmente por espectrometría de masa.

30 Dada la heterogeneidad de las proteínas, cada proteína puede estar representada en el gel bidimensional por más de una mancha, lo que produce la identificación de un número mayor de productos génicos (proteínas) que el de los genes codificados. En eucariotas, se sabe que de 5-20 proteínas pueden estar traducidas por el mismo gen.

#### B. Espectrometría de masa

35 Después de la separación por electroforesis en geles bidimensionales, las proteínas se identifican mediante 1) espectrometría de masa (desorción-ionización de laser asistida por matriz, MALDI-TOF-EM) o 2) técnicas de spray iónico.

40 Las manchas de proteínas se cortan del gel de acrilamida, se destiñen y tratan con tripsina. Todos los péptidos que derivan de todas las manchas se recogen y analizan por espectrometría de masa y determinación de la secuencia de aminoácidos de cada péptido. Se usa un software sofisticado para comparar las masas de los péptidos detectados a las masas teóricas de todos los conjuntos de datos de proteínas disponibles de todas las especies. La identificación de las proteínas normalmente se basa en la detección de más de cinco péptidos que se ajustan para cada proteína (algunas veces se ajustan hasta veinte péptidos en casos de grandes moléculas de proteínas). De este modo la tasa de detección falsa se estima que es menos de  $10^{-6}$ .

45 La técnica de spray iónico puede proporcionar resultados seguros en la secuenciación de aminoácidos de péptidos con una probabilidad de tasa de falsos positivos de menos de  $10^{-10}$ , relacionado con el número de péptidos usados para el análisis.

50 En conclusión, la técnica de MALDI-TOF-EM permite el análisis rápido de un gran número de manchas de proteínas. Sin embargo, la técnica de spray iónico es más fiable para la identificación de proteínas. Esas dos técnicas se usan habitualmente de forma simultánea y en estrecha correlación entre sí para identificar diferencias significativas en la expresión de proteínas entre estado de salud y enfermedad y para determinar su uso como marcadores biológicos de dianas terapéuticas.

55 Todas las tecnologías mencionadas anteriormente, se usaron para analizar muestras de plasma de sangre periférica obtenida de embarazadas que portaban fetos con trisomía 21 (síndrome de Down) y de casos que los portaban cromosómicamente normales (**IMAGEN 1**). La comparación de los geles bidimensionales indicó una diferencia cuantitativa de la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** (**IMAGEN 2**). Es decir, en el plasma de mujeres embarazadas de fetos con trisomía 21 (síndrome de Down) la cantidad de la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** se encontró aumentada comparada con los casos que portaban fetos cromosómicamente normales. El resultado anterior se verificó adicionalmente mediante análisis por inmunotransferencia usando un anticuerpo especial (**IMAGEN 3**). Estos resultados sugerían que la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** podría ser un marcador y se podría usar para la comprobación prenatal (diagnóstico y/o evaluación) de la trisomía 21 (síndrome de Down) con métodos no invasivos. El **componente amiloide P (AP)** es una glicoproteína natural

que se encuentra en suero y membranas basales. AP también es un componente de todos los tipos de amiloide, incluyendo el encontrado en individuos que padecen enfermedad de Alzheimer y síndrome de Down. La estructura y función de los péptidos AP activos será útil para el desarrollo de agentes diagnósticos y terapéuticos dirigidos a amiloide (Heegaard N.H.H. et al: ligand-binding sites in human serum amyloid P component. Eur. J. Biochem. Vol. 239, p: 850-856, 1996).

Esa proteína se podría detectar en líquidos biológicos por inmunoensayo espectrométrico de masas (MSIA) (documento US 2003/027216A1 (Kiernan Urban [US] et al) y estudios recientes sugieren que la proteína SAP se podría detectar como marcador diagnóstico para cáncer (documento US 2007/172900 A1, Cahill Michael [DE] et al). Recientemente nuestro grupo ha publicado el artículo relevante acerca de la detección de SAP en el plasma materno de mujeres embarazadas de fetos con síndrome de Down (Kolialexi A et al: Application of proteomics for the identification of differentially expressed protein markers for Down syndrome in maternal plasma. Prenatal Diagn. Vol 28, p: 691-698, 2008).

### 15 E. Ventajas de la presente invención

La metodología actualmente usada para el diagnóstico prenatal de anomalías cromosómicas fetales incluye técnicas invasivas y no invasivas. Los procedimientos invasivos (amniocentesis, biopsia del trofoblasto y sangre fetal) conllevan un riesgo significativo para la madre y el feto y por esta razón solo se recomiendan en mujeres embarazadas en las que el riesgo de tener un niño cromosómicamente anormal es mayor que el riesgo de pérdida fetal debido a la técnica invasiva.

Puesto que el riesgo de anomalías cromosómicas aumenta con la edad materna, el diagnóstico prenatal está recomendado para mujeres mayores de 35 años de edad. Como resultado, nacen menos niños con síndrome de Down de mujeres mayores. Sin embargo, el 70% de los niños con esta anomalía cromosómica nacen de mujeres de 35 años de edad para las que no está recomendado el diagnóstico prenatal. Los métodos de diagnóstico prenatal no invasivos usados de forma rutinaria hoy para anomalías cromosómicas están recomendados para embarazos de poco riesgo. Estos métodos incluyen marcadores tanto bioquímicos como ultrasonográficos que se usan después de una estimación algorítmica solo para evaluar el riesgo de anomalías cromosómicas. En casos con marcadores bioquímicos o ultrasonográficos anormales se recomienda investigación adicional mediante diagnóstico prenatal invasivo. Además, estos marcadores no son específicos para la trisomía 21 y están asociados con una tasa de detección de falsos positivos del 5%, lo que produce un aumento en el número de mujeres que se someten a diagnóstico prenatal.

Las nuevas técnicas no invasivas para el diagnóstico prenatal basadas en el aislamiento de células fetales o ADN fetal sin células de sangre periférica materna parecen ser difíciles de aplicar en la práctica clínica debido a la falta de las características específicas para distinguir entre material fetal y materno.

En la presente invención se detectó e identificó la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** en el plasma de sangre periférica de mujeres embarazadas de fetos con trisomía 21 (síndrome de Down) comparado con el plasma materno de fetos normales. Esa proteína mostró diferencia en la cantidad en el plasma materno de fetos con trisomía 21 comparados con normales. Esa proteína como molécula entera o la proteína modificada como resultado de modificaciones postraduccionales puede ser una diana y usarse originalmente como marcador para diagnóstico prenatal no invasivo de trisomía 21 (síndrome de Down) para todas las mujeres independientemente del riesgo de tener un feto cromosómicamente anormal al contrario que los métodos disponibles.

### F. Descripción de las imágenes

**IMAGEN 1.** Imágenes representativas de geles bidimensionales de poliacrilamida de plasma de sangre periférica, producidas por la aplicación de las metodologías relevantes. Cada mancha en el gel representa una proteína. **(A)** Gel de plasma de sangre periférica materna de una mujer embarazada de un feto normal, **(B)** gel de plasma de sangre periférica materna de una mujer embarazada de un feto con trisomía 21 (síndrome de Down).

**IMAGEN 2.** Comparación de un gel bidimensional de poliacrilamida de líquido amniótico obtenido de la gestación de un embrión cromosómico normal **(A)** y de un gel bidimensional de poliacrilamida obtenido de una gestación de un embrión patológico con trisomía 21 **(B)**. 1A y 1B indican las regiones de importancia que se analizaron adicionalmente en detalle. Las flechas indican las manchas que muestran diferencias entre los geles y en las se identificó el **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** por espectrometría de masa.

**IMAGEN 3.** Análisis por inmunotransferencia de la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** en el plasma materno de mujeres embarazadas. Se sometieron a electroforesis 10 µg de proteína total y la detección de la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** se realizó por el anticuerpo contra SAP clon E-14. Se analizaron cuatro plasmas de sangre periférica materna de mujeres embarazadas de fetos con trisomía 21 (síndrome de Down) (carriles 1-4) y cuatro plasmas

maternos de mujeres con embriones normales (carriles 5-8). El **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** se encontró aumentado en los casos de embriones con trisomía 21 comparados con los normales.

#### 5 **G. Descripción detallada de una aplicación**

La sangre periférica obtenida de mujeres de la 15<sup>a</sup> a la 18<sup>a</sup> semana de gestación se centrifuga a 3000 rpm durante 15 minutos para precipitar todos los componentes celulares y para obtener el sobrenadante (plasma) para análisis adicional. El sobrenadante de la muestra también se puede almacenar a -80°C hasta su procesamiento adicional. A  
10 continuación, sigue la medida de la concentración de proteína usando el ensayo de Bradford y a través de electroforesis nanocapilar en nanocartuchos usando Bioanalyzer 2100 (Agilent Tech).

Es posible detectar la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** en la sangre periférica de mujeres embarazadas mediante inmunotransferencia. En ese caso, se someten a electroforesis  
15 10 µg de proteína total de plasma materno en un gel de acrilamida al 12% durante 1 hora a 150 V. Las proteínas se transfieren a una membrana de nitrocelulosa a 290 mA durante 1,5 horas a 4°C y la membrana se trata con el anticuerpo policlonal E-14 específico para la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)**, diluido 1:200 en solución salina tamponada con Tris pH 7,4 con leche desnatada al 5% durante  
20 18 horas a 4°C. Después la membrana se trató con el anticuerpo secundario (dilución 1:70000) y el anticuerpo unido se detectó por quimioluminiscencia en una película de rayos X durante diferentes tiempos de exposición.

En el caso de que una mujer embarazada porte un embrión con trisomía 21 la mancha correlacionada con la proteína **componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743)** aparece en la película de rayos X más intensa que en los casos con embriones normales (IMAGEN 3).  
25

## REIVINDICACIONES

1. Un método para pronóstico y/o diagnóstico de trisomía 21 (síndrome de Down) en fetos que incluye:
  - 5 a. la detección cuantitativa de la proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) en sangre periférica, suero y/o plasma de una mujer embarazada, y
  - 10 b. la comparación del valor cuantitativo de esa proteína obtenido en la fase (a) con el valor cuantitativo de esa proteína en el mismo líquido biológico de mujeres portadoras de fetos cromosómicamente normales.
  - 15 c. el pronóstico y/o diagnóstico es positivo si el valor cuantitativo de la proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743), es mayor que el valor cualitativo de esa proteína en el mismo líquido biológico de mujeres portadoras de fetos cromosómicamente normales.
2. Un método que, según la reivindicación 1, se **caracteriza por** la detección de la proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) completa o de la proteína modificada como resultado de modificaciones postraduccionales.
- 20 3. Un método que, según la reivindicación 1 o 2, se **caracteriza por** el hecho que el resultado para el pronóstico y/o diagnóstico es positivo si la cantidad de proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) o de la proteína modificada es mayor que su cantidad mencionada como normal.
- 25 4. Un método que, según las reivindicaciones 1 a 3, se **caracteriza por** el hecho de que el resultado para el pronóstico y/o diagnóstico es positivo si la cantidad de proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) o de la proteína modificada es mayor que su cantidad en el mismo líquido biológico de mujeres portadoras de un feto normal.
- 30 5. Un método que, según las reivindicaciones 1 a 4, se **caracteriza por** el hecho de que el resultado para el pronóstico y/o diagnóstico es positivo si la cantidad de proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) o de la proteína modificada es mayor que la cantidad de una proteína de referencia.
- 35 6. Un método que, según cada una de las reivindicaciones 1 a 5, se **caracteriza por** el hecho de que el análisis cuantitativo se realiza usando uno de los siguientes métodos: nanotecnología, electroforesis nanocapilar en un microchip, electroforesis (de una o dos dimensiones), inmunotransferencia, microtitulación (ELISA simple y/o múltiple), cromatografía (HPLC, LC, nanoLC, GC, etc.), espectrometría de masa [huella de masa de péptidos, descomposición posfuente, MALDI EM, MALDI EM-EM, LC-EM, LC-EM-EM, TANDEM-EM, TANDEM EM-EM, SELDI EM, etc.] o combinación de estas técnicas.
- 40 7. Un método que, según cada una de las reivindicaciones 1 a 6, se **caracteriza por** el hecho de que el análisis cuantitativo se realiza usando sustancias fluorescentes o isótopos o anticuerpos u oligonucleótidos o una combinación de estas sustancias.
- 45 8. El uso de la proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) para el pronóstico y/o diagnóstico de la trisomía 21 (síndrome de Down) durante el embarazo.
- 50 9. El uso, según la reivindicación 8, de la proteína componente de amiloide P en suero (SAP, SAMP, Swiss Prot No: P02743) o de la proteína modificada, para el pronóstico y/o diagnóstico de la trisomía 21 (síndrome de Down) durante el embarazo por métodos no invasivos.

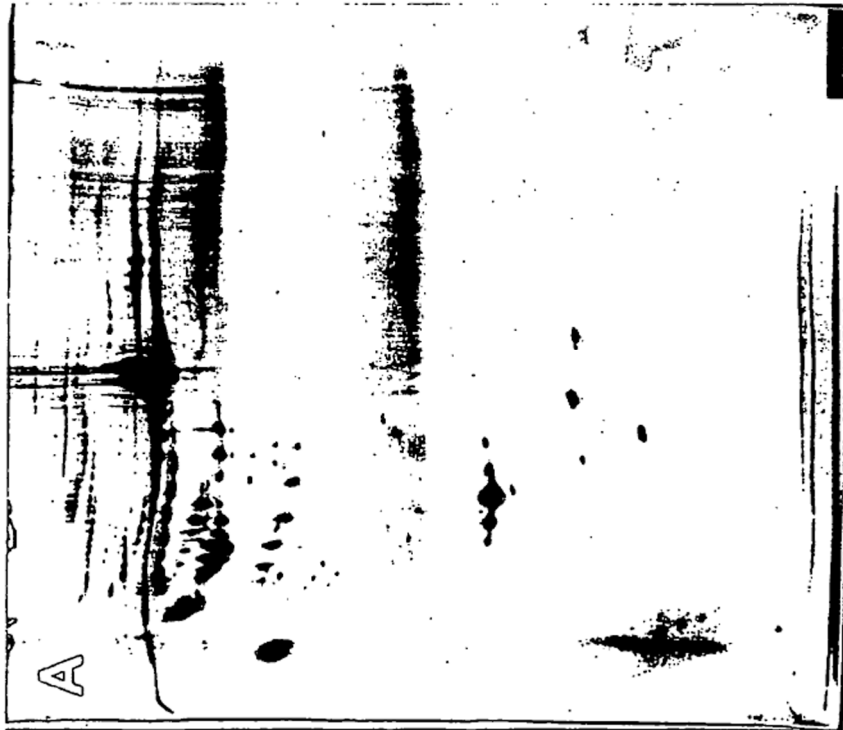
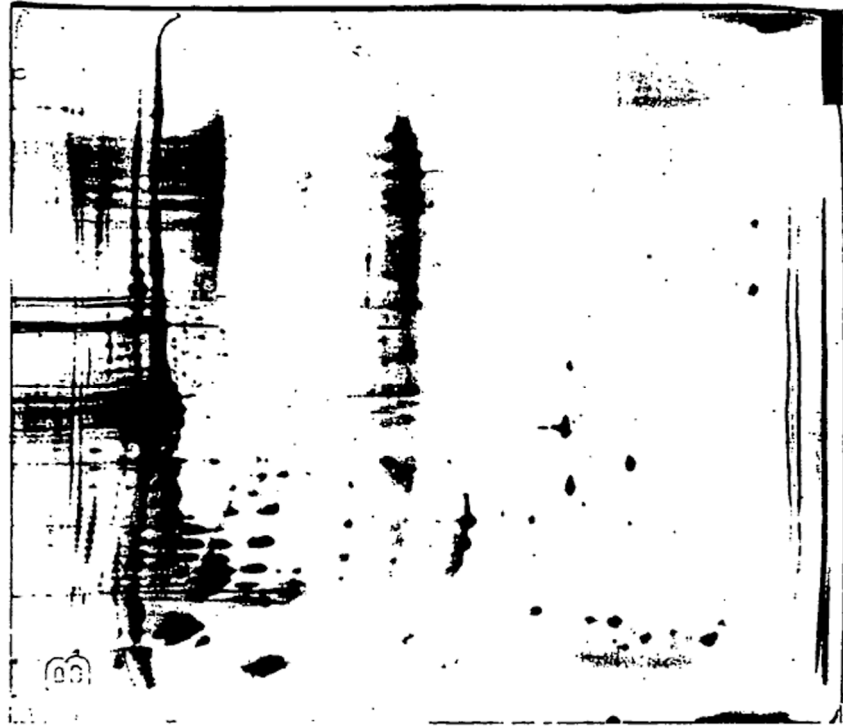


IMAGEN 1

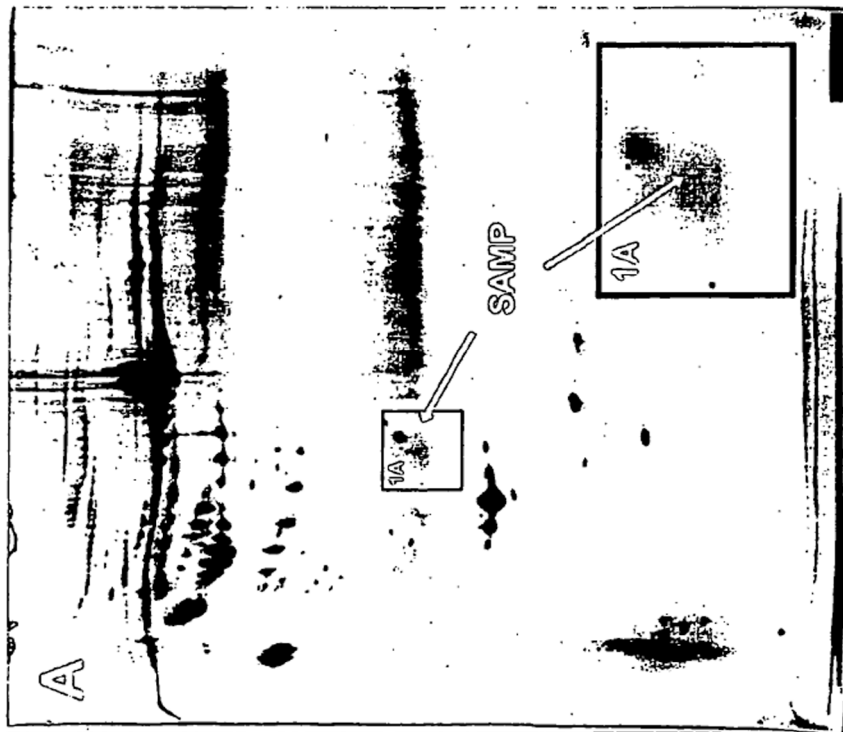
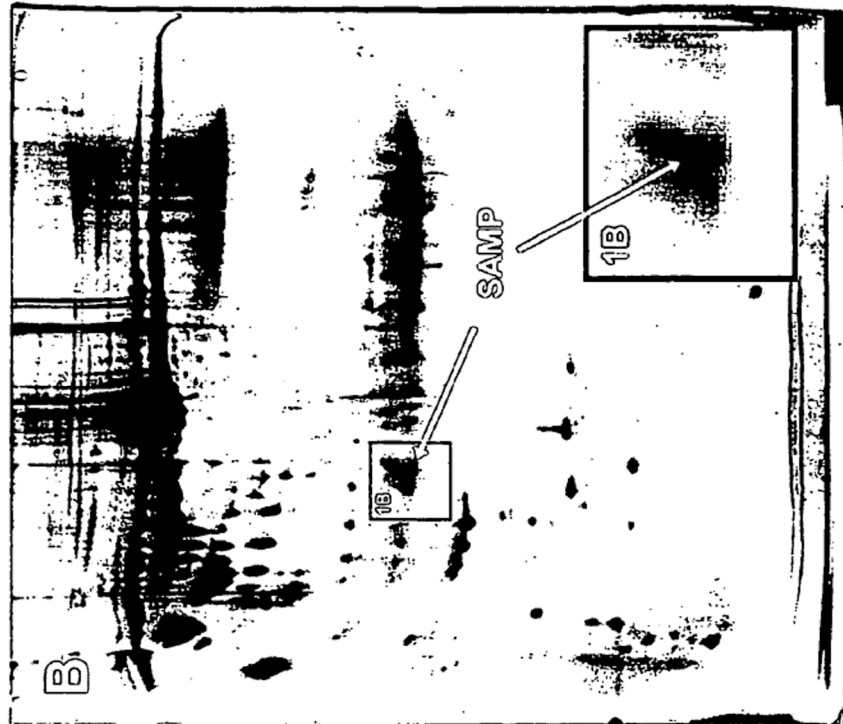


IMAGEN 2



**IMAGEN 3**

