

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 426**

21 Número de solicitud: 201431366

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN PREVIO

B2

22 Fecha de presentación:

19.09.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

22.03.2016

Fecha de la concesión:

05.09.2016

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.09.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO (50.0%)
C/ San Francisco, 5
33003 Oviedo (Asturias) ES y
FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN
OFTALMOLÓGICA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**QUIRÓS FERNÁNDEZ, Luis Manuel;
MERAYO LLOVES, Jesús;
VÁZQUEZ VALDÉS, Fernando;
GARCÍA FERNÁNDEZ, Beatriz;
GARCÍA SUÁREZ, Olivia;
ALFONSO SÁNCHEZ, José Fernando;
ALCALDE DOMÍNGUEZ, Eugenio Ignacio y
MEANA INFIESTA, Álvaro**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **Marcador de patologías oculares**

57 Resumen:

Marcador de patologías oculares.

La presente invención se refiere a un método in vitro para diagnosticar o para determinar el grado de una patología de superficie ocular, a un método in vitro para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de superficie ocular y a un método in vitro para seleccionar a un sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal basado en la determinación de la actividad heparanasa en una muestra de dicho sujeto. La invención también se relaciona con el uso de la actividad heparanasa como marcador diagnóstico de una patología de superficie ocular, como marcador para determinar el grado de dicha patología, como marcador para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de superficie ocular y al uso de la actividad heparanasa para seleccionar a un sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal.

ES 2 564 426 B2

DESCRIPCIÓN

Marcador de patologías oculares

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de los métodos de diagnóstico de patologías oculares.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La córnea es parte transparente del ojo que sirve para dejar pasar la luz y enfocar las imágenes del mundo exterior en la retina.

15

El queratocono es una enfermedad degenerativa de la córnea que cursa con adelgazamiento y alteración de la forma corneal, con lo que pierde su función de dejar pasar la luz y enfocar las imágenes en la retina, haciendo que el paciente tenga una mala visión incluso con la mejor corrección de gafas o lentes de contacto de la córnea. En muchas ocasiones el paciente necesita cirugía (entrecruzamiento del colágeno con luz ultravioleta, segmentos de anillos intraestromales o trasplante de córnea) y a pesar de ésta el paciente puede tener una disminución permanente de la visión que afecta su calidad de vida y actividad laboral.

20

El diagnóstico de queratocono se hace en la actualidad con técnicas de análisis de imagen (videoqueratoscopia) pero no existen marcadores biológicos que permitan realizar un diagnóstico precoz antes incluso que el paciente tenga síntomas de alteración de la visión.

25

El diagnóstico precoz es muy importante de cara a realizar medidas preventivas y tratamientos para evitar la evolución de la enfermedad. También es muy importante ya que

30

la gran mayoría de los pacientes con queratocono son miopes y padecen astigmatismo por lo que son posibles candidatos a la cirugía refractiva corneal, que de realizarse agravaría la enfermedad y aceleraría la progresión del queratocono.

Existe por tanto una necesidad en el estado de la técnica de proporcionar marcadores biológicos para el diagnóstico y detección del desarrollo de una patología ocular, especialmente de queratocono.

5 COMPENDIO DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el grado de una patología de la superficie ocular en un sujeto que comprende:

- 10 (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho sujeto; y
 - (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;
- 15 en donde, un aumento en dicha actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto sufre una patología de la superficie ocular o de un avance en el grado de una patología de la superficie ocular.

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de la

- 20 superficie ocular que comprende:
- (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho paciente; y
 - (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de
- 25 referencia;
- en donde, un estancamiento y/o un descenso en dicha actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo del efecto positivo de dicha terapia.

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un

- 30 sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal que comprende:
- (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho sujeto; y

- (ii) comparar dicha actividad heparanasa obtenida en la etapa (ii) con un valor de referencia;

en donde, un aumento en la actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto no es candidato a someterse a cirugía refractiva corneal.

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de la actividad heparanasa como marcador diagnóstico de una patología de superficie ocular, como marcador para determinar el grado de una patología de superficie ocular, como marcador para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de la superficie ocular o como marcador para seleccionar a un paciente para someterse a cirugía refractiva corneal.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Modelo de la estructura en dominios de la molécula del heparán sulfato.

Figura 2: Cromatografía de exclusión molecular en columna de Superose 12 de [³H]-HS.

Las fracciones 23 a 29, correspondientes a moléculas con pesos moleculares superiores a 20 kDa, fueron aisladas y concentradas para ser utilizadas

Figura 3: Análisis de reacciones por cromatografía de exclusión molecular en columna de Superose 12. (●) Control negativo. (■) Reacción enzimática llevada a cabo con el extracto celular de EBNA-293 como control positivo.

Figura 4: Análisis de reacciones por ultrafiltración.

Figura 5: Actividad heparanasa en lágrima en función del grado de queratocono según Rabinowitz. Las barras verticales indican intervalos de confianza de 0.95.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han desarrollado un método para diagnosticar patologías de la superficie ocular, en concreto, queratocono. Los autores de la invención han observado que, sorprendentemente, existe una mayor actividad heparanasa en muestras de pacientes que padecen dicha patología cuando se compara con sujetos sanos tal y como se demuestra en los ejemplos. Dicha actividad, puede ser también empleada en métodos para monitorizar el efecto de una terapia en pacientes previamente diagnosticados con queratocono así como para seleccionar pacientes que son candidatos a someterse a cirugía refractiva corneal.

10 Primer método de la invención

En un primer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el grado de una patología de la superficie ocular en un sujeto, de aquí en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

15

- (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho sujeto; y
- (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;

20

en donde, un aumento en dicha actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto sufre una patología de la superficie ocular o de un avance en el grado de una patología de la superficie ocular.

El término “diagnóstico” como se usa en el presente documento, se refiere tanto al proceso de intentar determinar y/o identificar una posible enfermedad en un sujeto, es decir el procedimiento de diagnóstico, como a la opinión alcanzada por este proceso, es decir, la opinión diagnóstica. Como tal, también se puede considerar como un intento de clasificación del estado de un individuo en categorías separadas y distintas que permitan que se tomen decisiones médicas sobre el tratamiento y pronóstico. Como entenderá el experto en la materia, tal diagnóstico puede no ser correcto para el 100% de los sujetos a diagnosticar, aunque se prefiere que lo sea. Sin embargo, el término requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se puedan identificar como que padecen una enfermedad, particularmente una patología de la superficie ocular en el contexto de la

30

invención, o que tiene una predisposición a la misma. El experto en la materia puede determinar si una parte es estadísticamente significativa usando diferentes herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, mediante la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la de Mann-Whitney, etc. (véase, Dowdy y Wearden, 1983). Los intervalos de confianza preferidos son al menos del 50%, al menos del 60%, al menos del 70%, al menos del 80%, al menos del 90% o al menos del 95%. Los valores de p son preferiblemente, 0,05, 0,025, 0,001 o menores.

10 El término “patología de la superficie ocular” tal y como se usa aquí, incluye los procesos crónicos y progresivos que están caracterizados por una alteración de la estructura corneal o del limbo esclerocorneal provocando un deterioro de su transparencia lo que conlleva un daño visual. Dichas patologías incluyen pero no están limitadas a: queratocono, opacidad corneal, ojo seco, conjuntivitis, úlcera corneal y blefaritis.

15 En una realización particular y preferida de la invención, dicha patología de la superficie ocular es queratocono. El término “queratocono”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad progresiva de la córnea que causa mala visión en la que la córnea adopta una forma cónica irregular debido a la alteración de las fibras de colágeno en su estructura interna. Es bilateral en la mayor parte de los casos y su progresión es asimétrica. El principal síntoma anatómico del queratocono es el adelgazamiento de la córnea en su zona central o paracentral, es decir, la córnea se vuelve más fina conforme se va desarrollando el queratocono, lo cual conlleva un empeoramiento de la visión a medida que el queratocono avanza. El queratocono puede clasificarse en

20 grados atendiendo a la curvatura corneal: grado 1: cuando la curvatura corneal es menor o igual a 45D (dioptrías); grado 2: cuando la curvatura corneal está comprendida entre 45 y 52D; grado 3: cuando la curvatura corneal está comprendida entre 52 y 60D; y grado 4: cuando la curvatura corneal es mayor de 60D. La curvatura corneal puede determinarse empleando un tomógrafo corneal. Los tomógrafos corneales tienen incorporados algoritmos

25 que permiten determinar el grado de curvatura corneal mediante el cálculo del índice de Maloney, el índice medida de la irregularidad corneal, queratometría tórica media, el índice de irregularidad de la superficie, el índice de Rabinowitz, el índice KISA, el índice de predicción de queratocono, el índice de Z3 o combinaciones de los mismos.

En una realización aún más particular y preferida de la invención, dicho queratocono es de grado 3.

5 El término “sujeto”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una persona, tal como un ser humano, un primate no humano (p. ej., chimpancés y otros simios y especies de monos), animales de granja, tales como aves, peces, ganado vacuno, ovejas, cerdos, cabras y caballos; mamíferos domésticos, tales como perros y gatos; animales de laboratorio incluyendo roedores, tales como ratones, ratas y cobayas. El término no denota una determinada edad o sexo. En una realización particular de la invención, el sujeto es un
10 mamífero. En una realización preferida de la invención, el sujeto es un humano.

La expresión “muestra que comprende una lágrima” tal y como se usa aquí, se refiere a cualquier muestra que se puede obtener de un sujeto en la que exista líquido corporal producido por la glándula lagrimal de dicho sujeto. La muestra puede obtenerse a través de
15 diversos métodos de extracción como la extracción mediante una pipeta o tubo capilar.

El primer método de la invención comprende en la etapa (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de un sujeto. El término “heparanasa”, también denominada HPSE, tal y como se usa en el presente documento, se
20 refiere a la proteína con que actúa tanto en la superficie de la célula como en dentro de la matriz extracelular degradando polímeros, preferiblemente polímeros de heparán sulfato, en oligosacáridos. La proteína se sintetiza inicialmente en un 65 kDa pro-heparanasa como una forma inactiva en el aparato de Golgi y se transfiere a través de los endosomas/lisosomas a la superficie celular. En el lisosoma se procesa proteolíticamente en su forma activa.
25 Mediante el procesamiento proteolítico de la heparanasa se obtienen tres productos: un péptido enlazador, un fragmento de 8 kDa (pro-heparanasa) y un fragmento de 50 kDa (pro-heparanasa). Los fragmentos de 8 kDa y 50 kDa forman un heterodímero que conforma la molécula de heparanasa activa. En una realización preferida, el término heparanasa se refiere a la molécula activa. La secuencia de la heparanasa humana se encuentra
30 depositada en la base de datos GenBank (versión del 11 de Mayo de 2014) bajo el número de acceso NP_001092010.

El término "actividad heparanasa", como se usa en el presente documento, se refiere al proceso enzimático regulado por la heparanasa en concreto a la escisión entre residuos de glucosaminoglicanos y glucosamina de heparán sulfato.

5 El experto en la materia reconocerá fácilmente que la determinación de la actividad heparanasa de acuerdo al primer método de la invención, se puede realizar mediante cualquier método o técnica conocida en el estado de la técnica apropiada para determinar dicha actividad enzimática. Ejemplos ilustrativos no limitativos para determinar la actividad heparanasa en una muestra se describen en los documentos WO 2000/03306 y WO
10 2000/77241. En una realización particular y preferida de la invención, la actividad heparanasa se determina de acuerdo al método para determinar la actividad heparanasa definido la presente invención y que se detalla más adelante en el presente documento.

La etapa (ii) del primer método de la invención comprende comparar la actividad heparanasa
15 obtenida en la etapa (i) de dicho primer método de la invención con un valor de referencia.

El término "valor de referencia", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un valor de laboratorio utilizado como referencia para los valores/datos obtenidos a partir de muestras obtenidas de los sujetos. El valor de referencia (o nivel de referencia) puede ser un
20 valor absoluto, un valor relativo, un valor que tiene un límite superior y/o inferior, una serie de valores, un valor promedio, una mediana, un valor medio, o un valor expresado por referencia a un valor de control o de referencia. Un valor de referencia puede estar basado en el valor obtenido a partir de una muestra individual, como por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto objeto de estudio pero obtenido en un punto anterior en el tiempo.

25 El valor de referencia puede estar basado en un elevado número de muestras, tales como los valores obtenidos en una población de los sujetos del grupo de edad cronológica coincidente con la del sujeto objeto de estudio o basado en un conjunto de muestras de inclusión o exclusión de la muestra a analizar. El valor de referencia puede estar basado en los valores de expresión de los marcadores que se desean comparar obtenidos a partir de
30 muestras de sujetos sanos que no tienen un estado de enfermedad o un fenotipo particular. En el contexto de la presente invención, el valor de referencia se refiere al valor de la actividad heparanasa obtenido a partir de muestras que comprenden lágrimas de sujetos que no sufren una patología de superficie ocular, (sujeto control) particularmente, de sujetos

que no sufren queratocono. Métodos para obtener dicha muestra han sido mencionados anteriormente. Es preferible que la técnica o método empleado para determinar la actividad heparanasa en la muestra obtenida de dicho sujeto control sea la misma que la técnica empleada para determinar la actividad heparanasa en el sujeto cuyo diagnóstico se desea determinar.

Una vez que se ha establecido el valor de referencia, se compara el valor obtenido de dicha actividad heparanasa en la muestra del sujeto bajo estudio con el valor de referencia. Como consecuencia de esta comparación, la actividad heparanasa determinada en la muestra del sujeto puede estar “aumentada”, “disminuida” o “igual a” dicho valor de referencia. En el contexto de la presente invención, se considera que la actividad heparanasa “está aumentada” en la muestra del sujeto con respecto al valor de referencia cuando la actividad heparanasa en la muestra del sujeto aumenta, por ejemplo, un 5%, un 10%, un 25%, un 50%, un 100% o incluso más cuando se compara con el valor de referencia, o cuando aumenta, por ejemplo, al menos 1,1 veces, 1,5 veces, 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 30 veces, 40 veces, 50 veces, 60 veces, 70 veces, 80 veces, 90 veces, 100 veces o incluso más cuando se compara con el valor de referencia. Asimismo, en el contexto de la presente invención, se considera que la actividad heparanasa “está disminuida” en la muestra del sujeto cuando la actividad heparanasa en la muestra del sujeto disminuye, por ejemplo, un 5%, un 10%, un 25%, un 50%, un 75%, o incluso un 100% cuando se compara con el valor de referencia para dicha actividad en el sujeto control.

Asimismo, en el contexto de la presente invención, se considera que la actividad heparanasa en la muestra del sujeto es “igual al” valor de referencia para dicha actividad cuando el valor obtenido en la determinación de la actividad heparanasa en el sujeto bajo estudio está sustancialmente inalterado con respecto al valor de referencia; por ejemplo, se considera que la actividad heparanasa determinada en la muestra del sujeto bajo estudio se considera que es “igual al” valor de referencia cuando los niveles se diferencian en no más del 0,1%, no más del 0,2%, no más del 0,3%, no más del 0,4%, no más del 0,5%, no más del 0,6%, no más del 0,7%, no más del 0,8% no más del 0,9%, no más del 1%, no más del 2%, no más del 3%, no más del 4%, no más del 5%, o no más del valor porcentual que es el mismo que el error asociado al método experimental usado en la determinación.

Una vez efectuada la comparación entre el valor obtenido en la determinación de la actividad heparanasa en muestra del sujeto y el valor de referencia para dicha actividad, el primer método de la invención permite diagnosticar si un sujeto padece una patología de la superficie ocular, particularmente queratocono, basado en si el la actividad heparanasa determinada en la muestra del sujeto bajo estudio está aumentada con respecto al valor de referencia.

En otra realización particular, el primer método de la invención permite determinar el grado de una patología de la superficie ocular en un sujeto, particularmente queratocono. En este caso, el valor de referencia empleado para tal fin es el valor de la actividad heparanasa determinado en una muestra de un sujeto que no sufre una patología de superficie ocular, (sujeto control), particularmente queratocono, o, preferiblemente, el valor de la actividad heparanasa determinado en una muestra de un sujeto que padece dicha patología de superficie ocular en un estadio temprano del desarrollo de la misma. En este caso, una vez efectuada la comparación entre el valor obtenido en la determinación de la actividad heparanasa en muestra del sujeto y el valor de referencia para dicha actividad, el primer método de la invención permite determinar un avance en el grado de una patología de la superficie ocular, particularmente queratocono, basado en si la actividad heparanasa determinada en la muestra del sujeto bajo estudio está aumentada con respecto al valor de referencia.

En una realización particular y preferida de la invención, la actividad heparanasa determinada en la etapa (i) del primer método de la invención, se determina mediante un método, de aquí en adelante “método para determinar la actividad heparanasa de la invención”, que comprende:

- (i) poner en contacto dicha muestra con un sustrato de la heparanasa;
- (ii) mantener la muestra de la etapa (i) en condiciones adecuadas para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa; y
- (iii) detectar los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii).

La etapa (i) de dicho método comprende poner en contacto la muestra en donde se desea determinar la actividad heparanasa, es decir la muestra que comprende una lágrima de un

sujeto bajo estudio, con un sustrato de la heparanasa. El término “sustrato de la heparanasa” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a polímeros que contienen unidades de glicosaminoglicanos. El término “glicosaminoglicanos” o “mucopolisacáridos”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a cadenas largas y no ramificadas de heteropolisacáridos, compuestas generalmente por una unidad repetitiva de disacárido con la fórmula general (azúcarácido - amino azúcar)_n, en donde n hace referencia al número de repeticiones. El azúcar amino puede ser D-glucosamina o D-galactosamina, en el que el grupo amino está normalmente acetilado con el fin de eliminar su carga positiva, y también puede llevar un grupo sulfato en el carbono 4 o 6 o en un nitrógeno no acetilado. Los más habituales son la N-acetilglucosamina o la N-acetilgalactosamina. El azúcar ácido puede ser un ácido D-glucurónico o bien L-idurónico, salvo en el queratán sulfato, en el que lo normal es que haya una galactosa. La carga negativa de estos azúcares ácidos prevalece sobre los otros. Cada dímero está unido al siguiente por otro enlace glucosídico, pero en este caso en posición beta 1-4. Este tipo de conformación confiere una estructura resistente.

En una realización particular y preferida de la invención, dicho sustrato es heparán sulfato. El término “heparán sulfato” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un heteropolisacárido cuya estructura se fundamenta en la repetición del disacárido formado por ácido glucurónico (GlcA) y N-acetil-glucosamina (GlcNAc), dando lugar a cadenas largas y no ramificadas con tamaños variables, comprendidos entre 5 y 70 kDa. En diferentes posiciones, la molécula se modifica por una serie de reacciones enzimáticas interdependientes que incluyen la N-deacetilación de GlcNAc, habitualmente seguida de N-sulfatación, para producir GlcNSO₃, lo que origina dominios sulfatados en la molécula (NS), dentro de los cuales el GlcA puede ser epimerizado a iduronato (IdoA), y se pueden añadir grupos O-sulfato al C-6 de la glucosamina y al C-2 del IdoA. También pueden ocurrir, aunque con menor frecuencia, adiciones de grupos O-sulfato al C-3 de los residuos GlcN y al C-2 de los de GlcA. La modificación de la cadena origina regiones flexibles, altamente sulfatadas, ricas en IdoA (regiones NS), separadas por regiones más rígidas de baja sulfatación (regiones NA). En la confluencia de ambos tipos de dominios existen regiones mixtas NA/NS.

La expresión “poner en contacto con”, tal y como se usa en el presente documento, hace referencia a cualquier proceso por el cual una muestra que comprende una lágrima de un sujeto entra en contacto con un sustrato de la heparanasa. Esta expresión incluye cualquier proceso *in vitro* de poner en contacto tal muestra con dicho sustrato según la invención. En el contexto de la presente invención, es suficiente con añadir dicho sustrato a la muestra que comprende una lágrima de un sujeto y cuya actividad heparanasa desea ser determinada.

La etapa (ii) del método para determinar la actividad heparanasa de la invención comprende mantener la muestra de la etapa (i) en condiciones adecuadas para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa. El término “condiciones adecuadas para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a las condiciones requeridas para que se produzca la interacción entre dicho sustrato y dicha heparanasa y tenga lugar la hidrólisis del sustrato por acción de la heparanasa. El experto en la materia entenderá que las condiciones adecuadas para que la heparanasa hidrolice dicho sustrato incluyen una proporción adecuada entre el sustrato y el enzima en términos de concentración, y condiciones adecuadas de sal, temperatura, pH y tiempo de reacción.

Las condiciones de sal adecuadas para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa según la invención incluyen, sin limitación, cualquier tampón comúnmente conocido tal como tampón fosfato, un tampón bicarbonato, un tampón carbonato, tampón Tris, un tampón borato, un tampón succinato, un tampón histidina o un tampón citrato a concentraciones de al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 30 mM, al menos 40 mM, al menos 50 mM, al menos 60 mM, al menos 70 mM, al menos 80 mM, al menos 90 mM, al menos 100 mM, al menos 200 mM, al menos 300 mM, o más. En una forma de realización preferida, la degradación del sustrato por la heparanasa se lleva a cabo en tampón citrato 100 mM.

Los valores de pH adecuados para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa según la invención incluyen, sin limitación, valores de 4,5, 5, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6, 6,5, 7, 7, 5, 8, 8, 5. En una forma de realización preferida, dicho pH es 5,3.

Las condiciones de temperatura adecuadas para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa según la invención incluyen, sin limitación, aproximadamente 20°C,

aproximadamente 25°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 37°C. En una forma de realización preferida dicha temperatura es 37°C.

Los tiempos de reacción adecuados para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa según la invención incluyen, sin limitación al menos 1 hora, al menos 2 horas, al menos 3 horas, al menos 4 horas, al menos 5 horas, al menos 6 horas, al menos 7 horas, al menos 8 horas, al menos 9 horas, al menos 10 horas, al menos 11 horas, al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas o más. En una forma de realización preferida dicho tiempo de reacción es de 16 horas.

Las concentraciones adecuadas de sustrato para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa según la invención incluyen, sin limitación, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 5 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 20 nM, aproximadamente 30 nM, aproximadamente 40 nM, aproximadamente 50 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 500 nM, aproximadamente 1 µM, aproximadamente 10 µM, aproximadamente 20 µM, aproximadamente 30 µM, aproximadamente 40 µM, aproximadamente 50 µM, aproximadamente 100 µM, aproximadamente 500 µM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 100 mM o más. En una forma de realización preferida, dicha concentración de sustrato es de 500 nM.

Una vez transcurrido el tiempo adecuado para que la heparanasa degrade el sustrato, por ejemplo transcurridas 16 horas, es preferible detener la reacción para evitar obtener productos de reacción inespecíficos que puedan interferir en el resultado. La detención de dicha reacción puede llevarse a cabo alterando las condiciones óptimas en las que se lleva a cabo la misma, por ejemplo alterando la temperatura y/o añadiendo a la mezcla de reacción cualquier agente adecuado que interfiera en la reacción. Los agentes empleados para detener una reacción alteran las condiciones óptimas en las que se lleva a cabo dicha reacción pero, preferiblemente, sin modificar los productos obtenidos en la reacción. Por ejemplo, se pueden emplear agentes que modifiquen el pH óptimo de reacción, que modifiquen la concentración óptima de sales en la reacción, agentes que precipiten la enzima que lleva a cabo la reacción, agentes que secuestren el sustrato de la reacción, etc.

En una realización preferida de la invención, la reacción se detiene mediante la adición de un volumen de reacción de una solución de NaCl 2M y de un volumen de reacción de cloroformo para precipitar restos proteicos presentes en la muestra.

- 5 En una realización particular, el método para determinar la actividad heparanasa de la invención comprende el empleo de un sustrato marcado con una etiqueta detectable seleccionada de un grupo que consiste en una molécula marcada con un fluorocromo, una molécula marcada enzimáticamente y una molécula marcada radiactivamente. El término “etiqueta detectable”, tal y como aquí se utiliza, se refiere a una etiqueta molecular cuya
- 10 finalidad es la de permitir la visualización o detección de las moléculas a las que está anclada mediante procedimientos y equipamiento adecuados para la detección del marcaje. El marcaje del sustrato puede realizarse por métodos convencionales. Dicho marcaje puede ser directo, para lo cual pueden utilizarse fluoróforos, por ejemplo, Cy3, Cy5, fluoresceína, alexa, etc., enzimas, por ejemplo, fosfatasa alcalina, peroxidasa, etc., isótopos radiactivos,
- 15 por ejemplo, ^{33}P , ^3H , ^{125}I , etc., o cualquier otro marcador conocido por el experto en la materia.

En una realización todavía más particular, dicho sustrato, particularmente, heparán sulfato está marcado radiactivamente con tritio (^3H). El marcaje de heparán sulfato con tritio puede

20 llevarse a cabo mediante cualquier procedimiento convencional conocido por el experto en la materia. Ilustrativamente, dicho marcaje puede llevarse a cabo mediante el procedimiento detallado en el apartado de ejemplos del presente documento.

Preferiblemente, tras el marcaje del sustrato de la reacción (por ejemplo, heparán sulfato),

25 dicho sustrato es sometido a un procedimiento de exclusión molecular para purificar el sustrato y seleccionar fracciones con un peso molecular medio adecuado. En una realización todavía más particular del método para determinar la actividad heparanasa de la invención, las moléculas de heparan sulfato empleadas como sustrato de la reacción tienen un peso molecular medio de al menos, 20kDa. En otra realización particular, las moléculas

30 de heparan sulfato empleadas como sustrato de la reacción tienen un peso molecular medio de al menos, 25kDa, al menos 30 kDa, al menos 35 kDa, al menos 40 kDa, al menos 45KDa, al menos, 50kDa, al menos 60 kDa, al menos 70 kDa, al menos 80kDa , al menos 90kDa o más.

La etapa (iii) del método para determinar la actividad heparanasa de la invención comprende detectar los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii) de dicho método. La detección de los productos de reacción (oligosacáridos) puede determinarse mediante cualquier técnica apropiada para ello conocida en la técnica. Métodos conocidos por el experto en la materia y que permiten detectar el producto de una reacción enzimática incluyen pero no se limitan a ensayos espectrofotométricos, ensayos acoplados a otra reacción enzimática en donde el producto de reacción obtenido se utiliza como sustrato para una segunda reacción enzimática cuyo producto de reacción es determinado, ensayos fluorimétricos, ensayos calorimétricos, ensayos quimioluminiscentes, ensayos radiométricos o ensayos cromatográficos.

En una realización particular, la detección de los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii) del método para determinar la actividad heparanasa de la invención se lleva a cabo mediante una técnica de fraccionamiento molecular seleccionada de ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular. Ilustrativamente, la detección puede llevarse a cabo mediante los procedimientos mostrados en el apartado de ejemplos del presente documento.

Como consecuencia de la actividad heparanasa, el sustrato, particularmente, heparán sulfato, es hidrolizado en oligosacáridos que contienen grupos carbonilos reductores. Por lo tanto, alternativamente, la detección de los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii) del método para determinar la actividad heparanasa de la invención se lleva a cabo mediante la detección de extremos reductores en dichos productos de reacción. Dichos grupos reductores pueden ser detectados mediante cualquier técnica apropiada para ello. Técnicas del estado de la técnica que permiten la detección de grupos reductores incluyen pero no están limitadas a ensayos que emplean el reactivo de Fehling, la reacción con reactivo de Tollens, la reacción de Maillard y la reacción de Benedict.

Segundo método de la invención

En un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de la superficie ocular que comprende:

- (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho paciente; y
- (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;

en donde, un estancamiento y/o un descenso en la actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo del efecto positivo de dicha terapia.

El término "terapia" o "tratamiento", como se usa aquí, se refiere a la recuperación tentativa de un problema de salud, por lo general después de un diagnóstico. Como tal, no es necesariamente una cura, es decir, una reversión completa de una enfermedad. Dicha terapia puede o no se sabe que tienen un efecto positivo sobre una patología de la superficie ocular o, en otras palabras, para ser útil para tratar una patología de superficie ocular. Las terapias incluyen, sin limitación el uso de colirios con fármacos apropiados para el tratamiento de dichas patologías o el uso de colirios con inmunodepresores, cirugía o una combinación de terapias. El término "cirugía", como se usa aquí, significa cualquier procedimiento terapéutico que implica una acción metódica de la mano o de la mano con un instrumento, en el cuerpo de un humano u otro mamífero, para producir un curativo o de recuperación.

El término "paciente", como se usa aquí, se refiere a un sujeto como se ha definido anteriormente, que sufre y se sabe que sufre de una patología de la superficie ocular, es decir el sujeto ha sido previamente diagnosticado de dicha patología de superficie ocular. El diagnóstico puede realizarse mediante cualquier método convencional conocido en el estado de la técnica adecuado para la detección de una patología de superficie ocular. Preferiblemente, el diagnóstico se lleva a cabo de acuerdo con el primer método de la invención.

El término "patología de superficie ocular" ha sido definido en el contexto del primer método de la invención y se utiliza aquí con el mismo significado. En una realización particular, dicha patología de la superficie ocular es queratocono y aún más particularmente, dicha patología es queratocono de grado 3. El término "queratocono" ha sido definido en el primer método de la invención.

La etapa (i) del segundo método de la invención comprende determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima del sujeto bajo estudio. Los términos “muestra que comprende una lágrima” y “actividad heparanasa” así como las realizaciones particulares de los mismos han sido definidos anteriormente y se utilizan aquí con el mismo significado.

La etapa (ii) del segundo método de la invención comprende comparar dicha actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia. De acuerdo a este segundo método de la invención, tal y como se ha definido previamente en el contexto del primer método de la invención, el valor de referencia se refiere al valor de la actividad heparanasa determinado al comienzo de la terapia y/o determinado previamente durante dicho tratamiento. El término “comienzo de la terapia”, tal y como se usa en el presente documento, significa un punto de tiempo justo antes de la terapia se aplica, de preferencia inmediatamente antes de, por ejemplo, antes y en el mismo o el día anterior. El término “previamente”, como se en el presente documento, se refiere a cualquier punto de tiempo anterior. Preferiblemente sin embargo, significa al menos 1 día, por lo menos 2 días, por lo menos 4 días, por lo menos 5 días, por lo menos 6 días, por lo menos 7 días, por lo menos 10 días, semanas por lo menos 2, por lo menos 3 semanas, a por lo menos 4 semanas, por lo menos 6 semanas, por lo menos 2 meses o por lo menos 3 meses antes. Se hace hincapié en que la actividad heparanasa determinada en la etapa (i) puede ser comparada con más de un valor de actividad heparanasa de la etapa (ii), en donde dichos más de un valor de la etapa (ii) se determinan preferiblemente en diferentes puntos temporales, por ejemplo, cualquiera de los puntos de tiempo que se citan anteriormente.

En una realización particular, la determinación de la actividad heparanasa en el segundo método de la invención se lleva a cabo mediante el “método para determinar la actividad heparanasa de la invención” y que ha sido detallado anteriormente en el contexto del primer método de la invención. Las realizaciones particulares de dicho método han sido detalladas en el contexto del primer método de la invención y se aplican aquí de igual manera.

Una vez efectuada la comparación entre la actividad heparanasa en la muestra del paciente y el valor de referencia para dicha actividad, el segundo método de la invención permite determinar el efecto de la terapia que está siendo administrada al paciente bajo estudio. En

concreto, un estancamiento y/o un descenso en la actividad heparanasa con respecto al valor de referencia en dicho paciente es indicativo del efecto positivo de dicha terapia.

El término "disminución" se refiere preferentemente a un nivel de al menos 3%, por lo menos 5%, por lo menos 8%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, o por lo menos 20% menor que un nivel determinado antes, por ejemplo previamente como se ha definido anteriormente. De manera similar, la disminución puede referirse a un nivel de al menos 5%, por lo menos 10%, por lo menos 15%, por lo menos 20%, por lo menos 25%, por lo menos 30%, por lo menos 35%, por lo menos 40%, por lo menos 45%, al menos 50%, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o al menos% 100 (es decir, ausente) inferior a un nivel determinado antes, por ejemplo previamente como se definió anteriormente. En una realización preferida, este "nivel determinado antes de" es el valor determinado en el inicio de la terapia.

El término "estancamiento", tal y como se usa en el presente documento, significa preferiblemente un nivel dentro de un 3%, un 5%, un 8%, un 10%, un 15%, o un intervalo de 20% de un nivel determinado antes, por ejemplo previamente como se definió anteriormente. En una realización preferida, este "nivel determinado antes de" es el valor determinado en el inicio de la terapia.

El término "efecto positivo de una terapia" significa que dicho tratamiento ralentiza la progresión de la enfermedad o previene la progresión de la enfermedad, y/o cura del paciente.

Tercer método de la invención

En un tercer aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal, de aquí en adelante, "tercer método de la invención" que comprende:

- (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho sujeto; y

- (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;

en donde, un aumento en la actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto no es candidato a someterse a cirugía refractiva corneal.

El término “seleccionar” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la acción de escoger a un sujeto para someterlo a un cirugía refractiva corneal.

- 10 El término “cirugía refractiva corneal”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un conjunto de procedimientos quirúrgicos destinados corregir los errores refractivos oculares que reducen la calidad de imagen sobre la retina y, por tanto, está enfocada a reducir y, eventualmente, eliminar la dependencia absoluta del uso de medios de corrección (anteojos o lentes de contacto).

- 15 Los términos “sujeto”, “muestra que comprende una lágrima”, “actividad heparanasa” se han descrito en detalle en el contexto del primer método de la invención y se utilizan con el mismo significado en el tercer método de la invención.

- 20 En una realización particular, la determinación de la actividad heparanasa en el tercer método de la invención se lleva a cabo mediante el “método para determinar la actividad heparanasa de la invención” y que ha sido detallado en el contexto del primer método de la invención. Las realizaciones particulares de dicho método han sido detalladas en el contexto del primer método de la invención y se aplican aquí de igual manera.

- 25 Una vez efectuada la comparación entre el valor de la actividad heparanasa en la muestra del sujeto y el valor de referencia para dicha actividad, el tercer método de la invención permite seleccionar al sujeto bajo estudio. En concreto, un aumento en la actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto no es
30 candidato a someterse a cirugía refractiva corneal.

En una realización particular del tercer método de la invención, dicho sujeto se caracteriza porque presenta un defecto ocular seleccionado de miopía y astigmatismo. El término

“miopía”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un defecto de refracción en el ojo en el cual los rayos de luz paralelos procedentes del infinito convergen en un punto focal situado delante de la retina, en lugar de en la misma retina, como sería normal. El término “astigmatismo”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un defecto ocular que se caracteriza porque existe una refracción diferente entre dos meridianos oculares, lo que impide el enfoque claro de los objetos y, generalmente, se debe a una alteración en la curvatura anterior de la córnea.

Usos de la invención

En un cuarto aspecto, la invención se relaciona con el uso de la actividad heparanasa como marcador diagnóstico de una patología de superficie ocular, como marcador para determinar el grado de una patología de superficie ocular, como marcador para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de la superficie ocular o como marcador para seleccionar a un paciente para someterse a cirugía refractiva corneal.

En una realización particular, dicha patología de superficie ocular es queratocono.

La invención se describe por medio de los siguientes ejemplos que se han de interpretarse como meramente ilustrativas y no limitativas del alcance de la invención

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Método de detección de la actividad heparanasa

La detección de la heparanasa humana se basó en medir la fragmentación de cadenas de HS de alto peso molecular en oligosacáridos de pequeño tamaño por la acción catalítica del enzima. Para facilitar la cuantificación del HS, se marcó radiactivamente empleando [³H]-anhídrido acético. La separación de las cadenas de HS de alto peso molecular de los fragmentos se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión molecular o mediante ultrafiltración.

1.1. Controles de reacción

En primer lugar, se procedió a la elección de los controles negativo y positivo necesarios para normalizar los resultados obtenidos en las diferentes reacciones con las lágrimas.

a. NEGATIVO: El control negativo de la reacción carecía de extracto celular, utilizándose H₂O milliQ en su lugar.

b. POSITIVO: Como control positivo se utilizó extracto celular de células EBNA sobreexpresando heparanasa. Para la obtención de dicho clon, el gen de la heparanasa fue clonado y el enzima sobreexpresado en células EBNA-293.

1.2. Clonación de la heparanasa

a. Amplificación heparanasa

La secuencia completa de la heparanasa se amplificó a partir de ESTs procedentes de carcinoma ductal de páncreas humano (GenBank accesion no. BQ691142 (IMAGE Consortium)). Para ello se llevaron a cabo dos amplificaciones de PCR anidadas consecutivas, en la primera de ellas se utilizaron los oligonucleótidos:

- 5'-GGTGAGCCCAAGATGCTGCTG-3' (directo) (SEQ ID NO:1)
- 5'-TCAGATGCAAGCAGCAACTTTG-3' (reverso) (SEQ ID NO:2)

Y para la segunda reacción de PCR anidada se utilizaron los siguientes oligonucleótidos:

- 5'-ATGCTGCTGCGCTCGAAGCCT-3' (directo anidado) (SEQ ID NO:3)
- 5'-GATGCAAGCAGCAACTTTGGC-3' (reverso anidado) (SEQ ID NO:4)

Los productos de las amplificaciones, correspondientes a una banda de 1.7 kpb, fueron identificados por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% y extraídos utilizando el kit GeneClean II (QBiogene, MP Biomedicals), y clonados en pUC19 (Fermentas Life Science) previamente digerido con SmaI. Las construcciones resultantes fueron utilizadas para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH10B. Los clones se secuenciaron utilizando los servicios de secuenciación de la Universidad de Oviedo.

Utilizando como molde esta construcción en pUC19 se amplificó la banda codificante de la proteína con oligonucleótidos que incluían secuencias de corte para *KpnI* y *NotI* (mostradas subrayadas):

- 5 ▪ 5'-GTTGTTACCATGCTGCTGCGCTCGAAGCCT-3' (directo) (SEQ ID NO:5)
- 5'-TGTGCGGCCGCGATGCAAGCAGCAACTTTGGC-3' (reverso) (SEQ ID NO:6)

10 La banda obtenida, analizada por electroforesis en gel de agarosa y extraída, fue digerida con *KpnI* y *NotI*, al igual que el vector de expresión modificado pCEP4 (Invitrogen) en el que se realizó la clonación. El vector modificado no incluía una cola de seis histidinas en el extremo C-terminal para facilitar la posterior identificación y purificación de la proteína recombinante, y la digestión con *KpnI/NotI* eliminaba el péptido señal presente en el mismo,

15 sustituyéndolo por el propio de la heparanasa.

b. Expresión en EBNA-293

La construcción resultante fue transfectada en células EBNA-293 utilizando el reactivo lipofectAMINA (Life Technologies, Inc.). Las células fueron cultivadas en medio DMEM

20 conteniendo 10% de suero fetal bovino, y 100 unidades/mL de penicilina y 250 ng/mL de anfotericina B a 37°C y 5% de CO₂. Los clones capaces de expresar establemente las proteínas fueron seleccionados en presencia del antibiótico puromicina a una concentración de 2 µg/mL (Sigma-Aldrich), y su secuencia comprobada utilizando los servicios de secuenciación de la Universidad de Oviedo. Entre estos clones positivos se seleccionaron

25 los que presentaban mayor actividad enzimática heparanasa en ensayos de actividad *in vitro*.

1.3. Clonación de la heparanasa

30 a. Obtención de los extractos celulares

Para la obtención de los extractos se retira el medio de cultivo, tras lo cual las células fueron lavadas dos veces con PBS. Seguidamente, las células se extrajeron de la placa empleando un raspador celular (BD Falcon) y se someten a cuatro ciclos de

congelación/descongelación a -80°C para su ruptura. Tras esto, se sometieron las muestras a 5 pulsos de 10 segundos en un sonicador Soniprep 150 con 60 segundos de descanso entre cada uno de ellos. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 1000 xg , y el sobrenadante constituyó el extracto libre de células.

5

b. Obtención del sustrato de la reacción

El seguimiento de la hidrólisis del HS por la acción catalítica de la heparanasa requirió llevar a cabo un marcaje previo de la molécula sustrato. Para ello, se preparó $[^3\text{H}]$ -HS siguiendo un método descrito por Huang (Huang KS *et al.* 2004 Anal Biochem 333: 389-398).

10

c. Marcaje radioactivo del HS

La obtención de $[^3\text{H}]$ -HS se basó en la deacetilación de la molécula, seguido de reacetilación utilizando anhídrido acético- $[^3\text{H}]$. Se disolvieron 10 mg de HS (Sigma-Aldrich) en 0,38 mL de hidrato de hidrazina conteniendo 7,6 mg de sulfato de hidracina, y la mezcla se calentó durante 2 horas a 100°C en viales de vidrio cerrados. La muestra se enfrió y se secó con argón. Se añadieron 0,4 mL de tolueno y la muestra se secó por evaporación rotatoria. Este procedimiento se repitió dos veces. El residuo se disolvió en 0,9 mL de NaCl 1 M y se desaló en una columna de desalado de 5 mL conectada a FPLC (GE Healthcare). El material desalado se adicionó a una columna de Dowex 50 (X-8, forma Na^{+1}) (1 x 3 cm) y se lavó con 5 mL de agua. Las fracciones correspondientes al material no pegado y al lavado de la columna se juntaron y liofilizaron. El HS N-deacetilado resultante se disolvió en 0,5 mL de NaHCO_3 0,5 M conteniendo metanol al 10% (v/v) previamente enfriado a 0°C en baño de hielo y 30 μl de anhídrido acético- $[^3\text{H}]$ en tolueno (GE Healthcare). La mezcla se agitó vigorosamente durante 3 h a 0°C . Posteriormente, se añadieron otros 0,5 mL de NaHCO_3 , 20 μl de metanol y 25 μl de anhídrido acético y se agitó otros 30 min a 0°C , después de lo cual se repitió este último paso. Tras dejar calentar la muestra hasta temperatura ambiente, se eliminó el tolueno mediante flujo de argón y la solución se desaló de nuevo en una columna de desalado de 5 mL conectada a FPLC en acetato amónico 20 mM pH 6,8. El $[^3\text{H}]$ -HS se recogió, se valoró la radiactividad por centelleo líquido y la concentración de HS se determinó mediante ensayos de unión del colorante catiónico azul de 1,9-dimetileno.

30

d. Purificación de moléculas de HS de alto peso molecular

El [^3H]-HS obtenido fue sometido a cromatografía de exclusión molecular en una columna de Superose 12 conectada a FPLC (GE Healthcare), previamente equilibrada en tampón fosfato 25 mM pH 6 conteniendo 150 mM NaCl. La cromatografía se realizó a un flujo de 0.5 mL/min y se recogieron fracciones de 0.5 mL en las que se determinó la radiactividad presente (Figura 2). Las fracciones 23 a 29, correspondientes a moléculas con pesos moleculares superiores a 20 kDa, fueron aisladas y sometidas a precipitación durante 2 horas a -20°C mediante la adición de etanol hasta alcanzar una concentración final del 85 %. Los precipitados se sedimentaron por centrifugación, se secaron y se resuspendieron en agua; quedando así concentrados para ser utilizadas como sustrato de la heparanasa.

1.4. Análisis de los productos de la reacción

La capacidad hidrolítica de la heparanasa expresada en células eucariotas se ensayó por dos procedimientos alternativos: cromatografía de exclusión molecular y ultrafiltración.

En el caso del control positivo, la reacción se llevó a cabo con 60 μL de extracto celular en tampón citrato 100 mM pH 5,3 conteniendo 1 mM CaCl_2 y 1 μL de [^3H]-HS (20 nCi) en un volumen final de 200 μL .

En el caso del control negativo, el volumen correspondiente al extracto celular se sustituyó por H_2O destilada.

Las reacciones se incubaron a 37°C por periodos un periodo de tiempo de 16 horas. Para detener la reacción a su debido tiempo se añadió 220 μL de NaCl para evitar uniones inespecíficas del HS y 200 μL de cloroformo para eliminar restos proteícos. Tras agitación intensa la muestra fue centrifugada a 10000 xg y se tomaron 200 μL de la fase acuosa.

a. Detección de la fragmentación de la molécula

a.i). FPLC

Para los ensayos cromatográficos, las reacciones fueron inyectadas en una columna de Superose 12 conectada a FPLC (GE Healthcare), previamente equilibrada en tampón fosfato 25 mM pH 6 conteniendo 150 mM NaCl. La cromatografía se realizó a un flujo de 0.5 mL/min y se recogieron fracciones de 0.5 mL, en la que una de las alícuotas se utilizó para

la determinación de la radiactividad presente. 200 µL de cada una de las fracciones obtenidas en cada muestra a tiempos fue analizada.

a.ii). Ultrafiltración

Para los ensayos de ultrafiltración, las reacciones se filtraron a través de filtros con un tamaño de exclusión de 5 kDa (Vivaspin 500, Sartorius), dado que la heparanasa hidrolizaría las cadenas de [³H]-HS en fragmentos de tamaño potencialmente adecuado para atravesar el poro del filtro. Por ello se estimó la radiactividad en alícuotas del filtrado por centelleo líquido como medida de la actividad heparanasa (Figura 4).

b. Detección de generación de nuevos extremos reductores

La fragmentación del polisacárido del heparán sulfato mediante reacción de hidrólisis enzimática catalizada por la heparanasa genera, en cada uno de los nuevos fragmentos, nuevos grupos reductores.

Un procedimiento alternativo para la detección del enzima sería la cuantificación de los nuevos extremos reductores. Esto se puede conseguir acoplando reacciones de oxidación-reducción sobre los nuevos grupos aldehído que generen cambios de color o reacciones electroquímicas, que eviten el uso de material radiactivo.

2. Modo de realización de la invención

2.1. *Reacción con lágrimas*

En todos los casos, la reacción se llevó a cabo con 10 µL de lágrima en tampón citrato 100 mM pH 5,3 conteniendo 1 mM CaCl₂ y 1 µL de [³H]-HS (20 nCi) en un volumen final de 200 µL.

Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 16 horas. Para detener la reacción a su debido tiempo se añadió 220 µL de NaCl para evitar uniones inespecíficas del HS y 200 µL de cloroformo para eliminar restos proteicos. Tras agitación intensa la muestra fue centrifugada a 10000 xg y se tomaron 200 µL de la fase acuosa.

2.2. *Filtración*

100 µL de la fase acuosa fue sometida a filtración en filtros con un tamaño de exclusión de 5 kDa (Vivaspin 500, Sartorius). La radiactividad se estimó en alícuotas del filtrado por centelleo líquido.

5 2.3. Resultados

La actividad heparanasa en queratocono muestra valores progresivamente ascendentes en función del grado del mismo (Figura 5). No obstante, la dispersión de los resultados obtenidos en lágrima de pacientes sanos concluyó que el análisis de los datos por ANOVA sólo fuese significativo para los casos de grado 3 según la clasificación Rabinowitz (valor de
10 $p = 0.0019$)

En resumen, esta invención permite una serie de ventajas que la diferencian claramente de lo conocido por el estado de la técnica, ya que permite un diagnóstico precoz y mediante marcador biológico del desarrollo de un queratocono u otras patologías de superficie ocular.
15 Los siguientes casos describen la utilización de esta invención en el campo de la medicina, aunque no se pretende ser limitativos respecto al ámbito de esta invención.

Caso 1: Paciente corto de vista (miope) que escoge la cirugía refractiva corneal para disminuir la necesidad de gafas o lentillas. Con los métodos diagnósticos actuales no se
20 detecta el queratocono, y desarrolla una ectasia corneal que acaba en trasplante de córnea bilateral. Uno de ellos con mal resultado quirúrgico y pérdida del ojo. El uso de esta invención, detectando niveles altos de heparanasa en lágrima podría haber realizado el diagnóstico precoz del queratocono y evitado la cirugía corneal y las complicaciones posteriores.

25 Caso 2: Paciente que ve mal incluso con sus gafas y no tolera las lentillas. No se detecta enfermedad ocular alguna con los medios diagnósticos actuales y, cuando se le diagnostica el queratocono, ya no puede realizar su actividad laboral habitual y sus actividades de tiempo libre. En ese momento, los métodos ópticos ya le diagnostican queratocono que
30 podía haber sido identificado de forma precoz diez años antes con el empleo de esta invención.

Caso 3: Niño con síndrome de Down en el que la prevalencia del queratocono es mucho más frecuente que en la población en general que, debido a esta enfermedad su visión se degrada progresivamente. En la actualidad no hay tratamiento médico para evitar la progresión del queratocono, y tienen que ser sometidos a sucesivas

5 intervenciones quirúrgicas que para ellos representan un riesgo vital.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* para diagnosticar o para determinar el grado de una patología de la superficie ocular en un sujeto que comprende:
 - (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho sujeto; y
 - 10 (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;

en donde, un aumento en dicha actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto sufre una patología de la superficie ocular o de un avance en el grado de una patología de la superficie ocular.
- 15 2. Método *in vitro* para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de la superficie ocular que comprende:
 - (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho paciente; y
 - 20 (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;

en donde, un estancamiento y/o un descenso en dicha actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo del efecto positivo de dicha terapia.
- 25 3. Método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha patología de la superficie ocular es queratocono.
4. Método según la reivindicación 3, en donde dicho queratocono es de grado 3
- 30 5. Método *in vitro* para seleccionar un sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal que comprende:
 - (i) determinar la actividad heparanasa en una muestra que comprende una lágrima de dicho sujeto; y
 - 35 (ii) comparar la actividad heparanasa obtenida en la etapa (i) con un valor de referencia;

en donde, un aumento en dicha actividad heparanasa con respecto al valor de referencia es indicativo de que dicho sujeto no es candidato a someterse a cirugía refractiva corneal.
- 40 6. Método según la reivindicación 5, en donde dicho sujeto se caracteriza porque presenta un defecto ocular seleccionado del grupo que consiste en miopía y astigmatismo.

7. Método según las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha actividad heparanasa determinada en la etapa (i) se determina mediante un método que comprende:
 - (i) poner en contacto dicha muestra con un sustrato de la heparanasa;
 - (ii) mantener la muestra de la etapa (i) en condiciones adecuadas para la degradación de dicho sustrato por la heparanasa; y
 - (iii) detectar los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii).
8. Método según la reivindicación 7, en donde dicho sustrato está marcado con una etiqueta detectable seleccionada de un grupo que consiste en una molécula marcada con un fluorocromo, una molécula marcada enzimáticamente y una molécula marcada radiactivamente.
9. Método según la reivindicación 8, en donde dicho sustrato está marcado radiactivamente con tritio.
10. Método según las reivindicaciones 6 a 9, en donde dicho sustrato es heparán sulfato.
11. Método según la reivindicación 10, en donde dicho heparán sulfato tiene un peso molecular medio de al menos 20 kDa.
12. Método según la reivindicaciones 7 a 11, en donde la detección de los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii) se lleva a cabo mediante una técnica de fraccionamiento molecular seleccionada de ultrafiltración y cromatografía de exclusión molecular.
13. Método según la reivindicaciones 7 a 11, en donde la detección de los productos de reacción obtenidos en la etapa (ii) se lleva a cabo mediante un ensayo de detección de extremos reductores en dichos productos de reacción.
14. Uso de la actividad heparanasa como marcador diagnóstico de una patología de superficie ocular, como marcador para determinar el grado de una patología de superficie ocular, como marcador para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de la superficie ocular o como marcador para seleccionar a un paciente para someterse a cirugía refractiva corneal.
15. Uso según la reivindicación 14, en donde dicha patología de superficie ocular es queratocono.

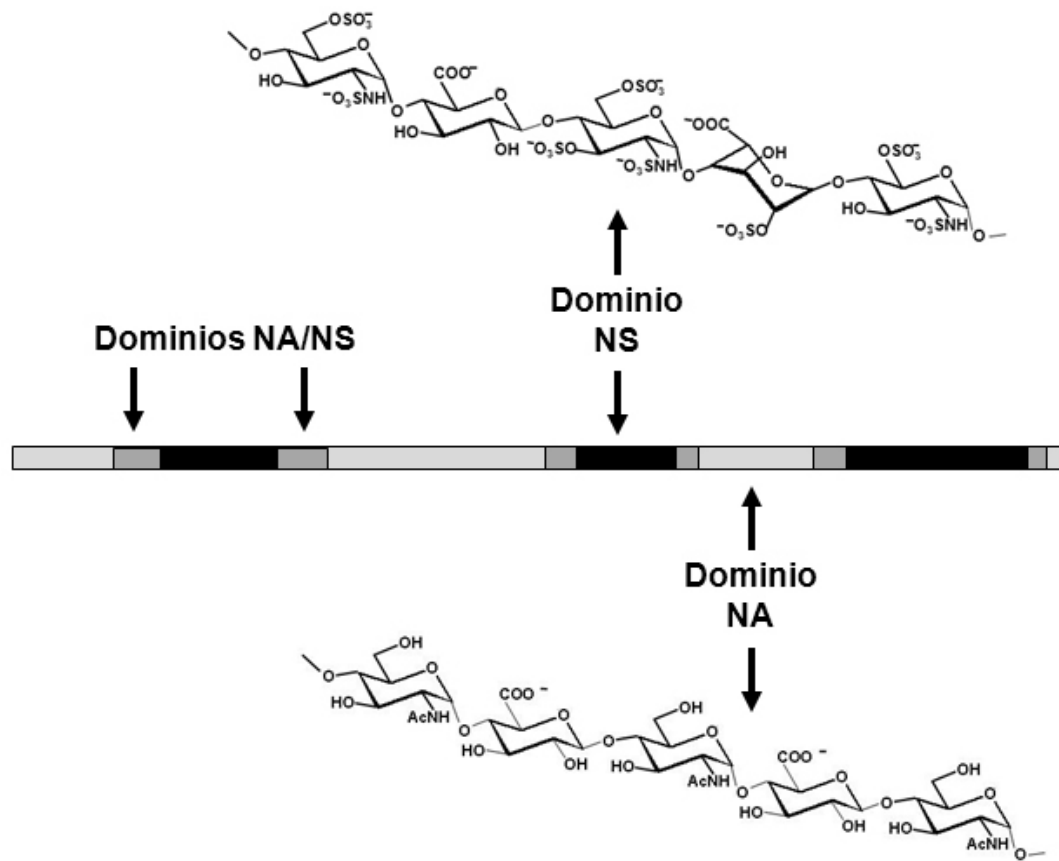


FIGURA 1

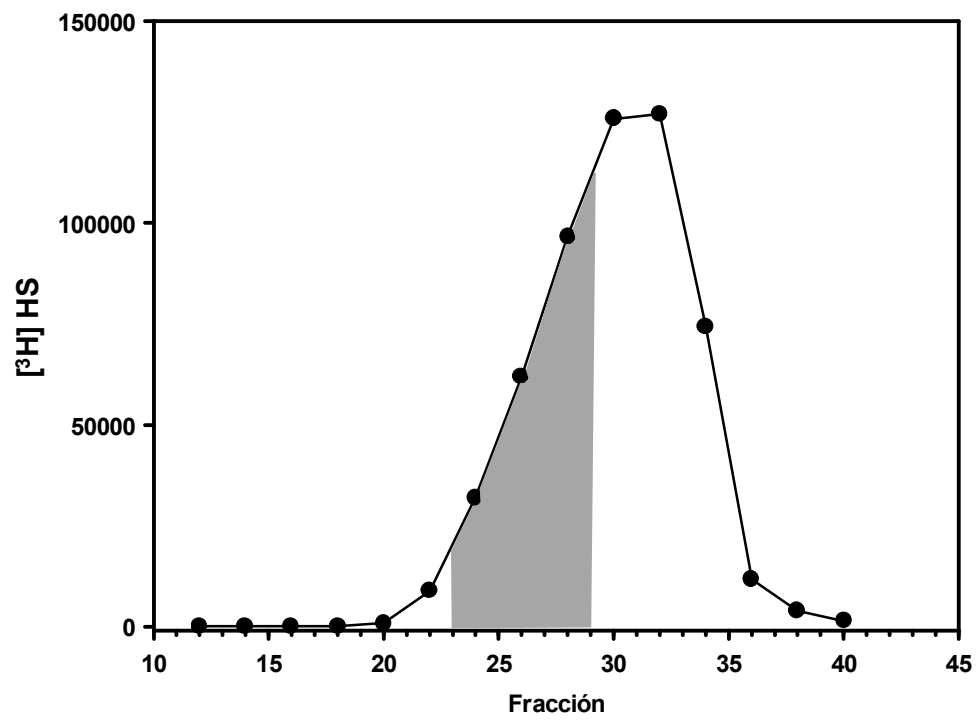


FIGURA 2

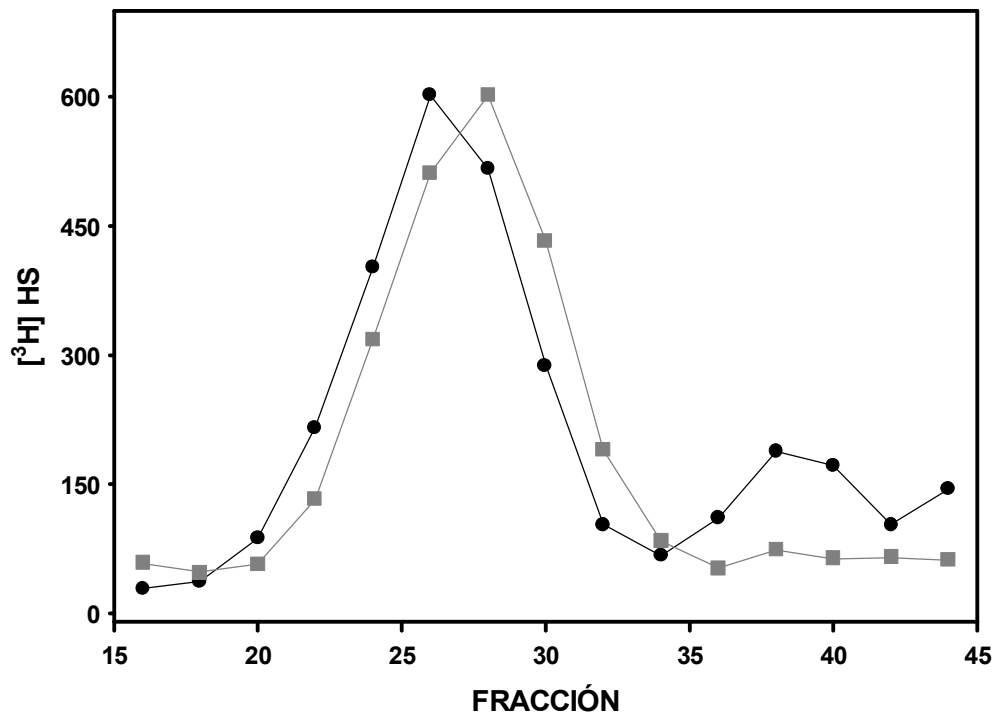


FIGURA 3

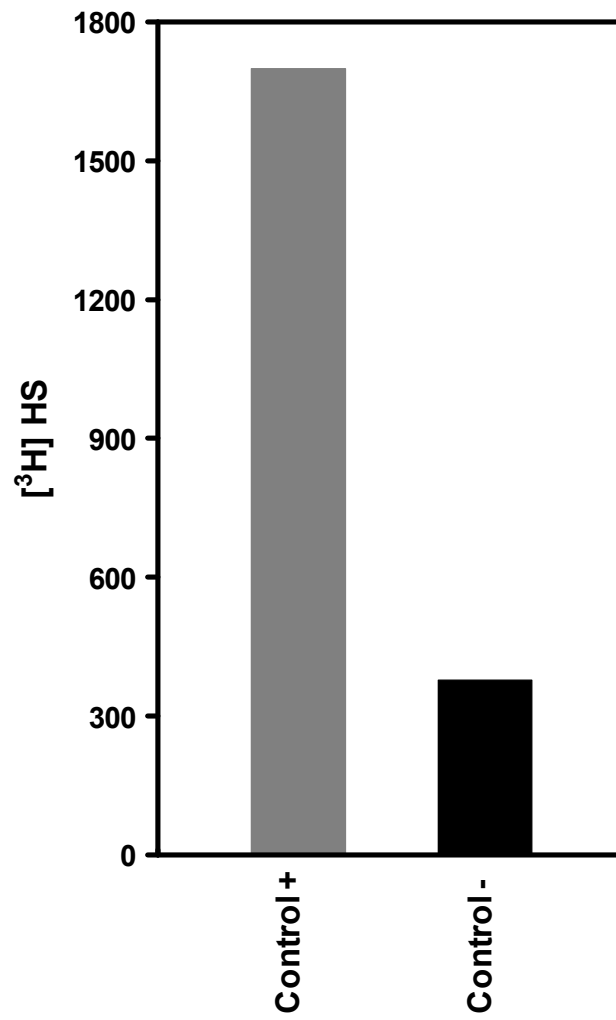


FIGURA 4

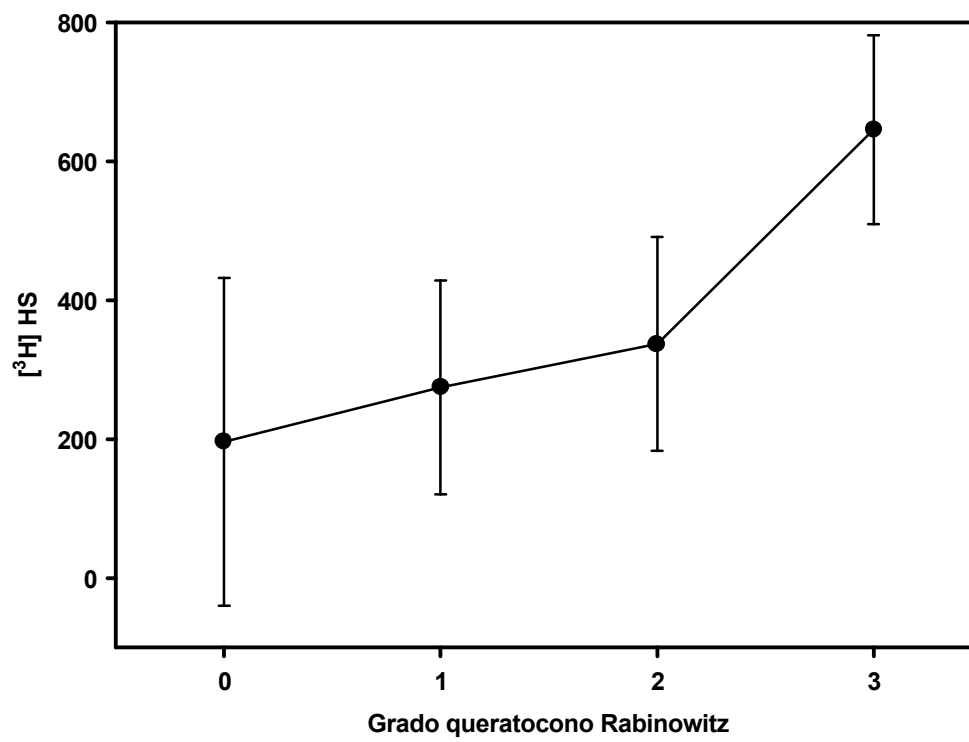


FIGURA 5

Lista de Secuencias

<110> Universidad de Oviedo
Fundación de Investigación Oftalmológica

<120> Marcador de patologías oculares

<130> P11329ES00

<160> 6

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleótido para PCR

<400> 1

ggtgagccca agatgctgct g

21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleótido para PCR

<400> 2

tcagatgcaa gcagcaactt tg

22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleótido para PCR

<400> 3

atgctgctgc gctcgaagcc t

21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleótido para PCR

<400> 4

gatgcaagca gcaacttttg c
21

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleótido para PCR

<400> 5
gttggtacca tgctgctgcg ctcgaagcct
30

<210> 6
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleótido para PCR

<400> 6
tgtgcggccg cgatgcaagc agcaactttg gc
32



- ②① N.º solicitud: 201431366
②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.09.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **G01N33/573** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 0150133 A1 (AROS APPLIED BIOTECHNOLOGY APS [DK/DK]) 12.07.2001, página 2, línea 28 – página 7, línea 11.	1-15
A	US 20070248970 A1 (RABINOWITZ et al.) 25.10.2007, página 1, resumen.	1-15
A	WO 2011066621 A1 (THE UNIVERSITY OF SIDNEY [AU/AU]) 09.06.2011, página 1, resumen.	1-15
A	WO 0077241 A2 (CENTRAL MANCHESTER HEALTHCARE NHS TRUST [GB/GB]) 21.12.2000, página 1, resumen.	1-15

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
17.02.2016

Examinador
M. D. García Grávalos

Página
1/4

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, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 17.02.2016

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-15	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-15	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 0150133 A1	12.07.2001
D02	US 20070248970 A1	25.10.2007
D03	WO 2011066621 A1	09.06.2011
D04	WO 0077241 A2	21.12.2000

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 método *in vitro* para diagnosticar o determinar el grado de una patología de superficie ocular, para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de superficie ocular y/o para seleccionar a un sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal, basado en la determinación de la actividad heparanasa en una muestra de dicho sujeto (reivindicaciones 1-13). Se refiere también al uso de la actividad heparanasa como marcador para cada uno de los métodos reivindicados (reivindicaciones 14-15).

El documento D01 divulga un método *in vitro* para diagnosticar la presencia y grado de una enfermedad de la córnea en humanos, mediante la determinación de un patrón de expresión génica en una muestra de tejido epitelial de la córnea. Los genes marcadores se seleccionan según su expresión en un tejido procedente de una cornea sana, estableciendo un patrón de mayor o menor expresión según marcador y patología (ver página 2, línea 28-página 7, línea 11).

El documento D02 divulga un método *in vitro* y kit de diagnóstico para detección de queratocono en una muestra de epitelio corneal de un sujeto mediante la determinación de la presencia de un producto de expresión del gen AQP5. Se refiere también al gen KC6 que muestra una expresión específica para la córnea, así como moléculas relacionadas con este gen (ver página 1, resumen).

El documento D03 divulga un método *in vitro* de diagnóstico de ectasia corneal posterior a cirugía refractiva, queratocono o degeneración marginal pelúcida, en un sujeto mediante la determinación del nivel de expresión de moléculas asociadas con la vía de señalización Wnt, preferentemente el producto de expresión de los genes SFRP1, PITX2, LEF1, WNT16 y WNT5A (ver página 1, resumen).

El documento D04 divulga un método para determinar la actividad de heparanasa en una muestra (ver página 1, resumen).

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

El objeto técnico de la presente solicitud de invención es un método *in vitro* para diagnosticar o determinar el grado de una patología de superficie ocular, para monitorizar el efecto de una terapia administrada a un paciente diagnosticado con una patología de superficie ocular y/o para seleccionar a un sujeto para someterse a cirugía refractiva corneal, basado en la determinación de la actividad heparanasa en una muestra de dicho sujeto; así como el uso de la actividad heparanasa como marcador para cada uno de los métodos reivindicados.

1.1. REIVINDICACIONES 1-15

No se ha encontrado ningún documento en el estado de la técnica que divulgue el uso de heparanasa en un método *in vitro* para diagnosticar o determinar el grado de una patología de superficie ocular.

En consecuencia, las reivindicaciones 1-15 cumplen con los requisitos de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP11/1986).

Aunque los documentos D01 - D03 anticipan el uso de biomarcadores en un método *in vitro* para diagnosticar la presencia y grado de una enfermedad de la córnea en humanos, ninguno de ellos guarda relación con el marcador reivindicado por lo que se considera que estos documentos se refieren al estado de la técnica y no son relevantes en relación a la novedad y actividad inventiva del objeto de la invención.

Por otra parte, aunque el documento D04 anticipa un método para determinar la actividad de heparanasa en una muestra, se considera que el método reivindicado en la presente solicitud de invención se refiere a una muestra específica para llevar a cabo los métodos en ella reivindicados. De este modo, D04 se refiere al estado de la técnica y no es relevante en relación a la novedad y actividad inventiva del objeto de la invención.