

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 580**

21 Número de solicitud: 201730972

51 Int. Cl.:

**G01G 3/13** (2006.01)

**G01N 29/036** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**26.07.2017**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**29.11.2017**

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

**09.02.2018**

Fecha de concesión:

**28.05.2018**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**04.06.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA  
(80.0%)**

**Edificio Nexus (6G) - Tercera planta Camino de  
Vera s/n**

**46022 VALENCIA (Valencia) ES;**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA LA**

**FE - FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DEL**

**HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÈCNICO LA**

**FE DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (10.0%) y**

**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA ESTUDI GENERAL**

**(10.0%)**

72 Inventor/es:

**MARINE DO NASCIMENTO, Noelle;**

**GIMENEZ ROMERO, David;**

**MORAIS EZQUERRO, Sergi Beñat;**

**MAQUIEIRA CATALA, Angel;**

**JUSTE DOLZ, Augusto Miguel;**

**GRAU GARCIA, Elena;**

**PUCHADES PLA, Rosa y**

**ROMAN IBORRA, Jose Andres**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)**

**ES 2 644 580 B2**

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

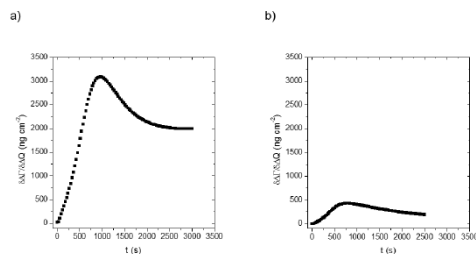


11 Número de publicación: **2 644 580**

21 Número de solicitud: 201730972

57 Resumen:

Procedimiento de diagnóstico de enfermedades autoinmunes. La presente invención se refiere a un procedimiento de diagnóstico basado en un proceso interfacial de reconocimiento molecular antígeno-anticuerpo, concretamente Anti-RO52-Proteína RO52, en un resonador piezoeléctrico para su aplicación en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes como el Síndrome de Sjögren (SS), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y Lupus Eritematoso Neonatal (LEN).



ES 2 644 580 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.  
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

## **PROCEDIMIENTO DE DIAGNÓSTICO DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES)**

### **DESCRIPCIÓN**

#### 5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo técnico del diagnóstico de enfermedades autoinmunes y específicamente al seguimiento de un proceso interfacial de reconocimiento molecular antígeno-anticuerpo en un resonador piezoeléctrico, así como en el cribado de muestras de enfermos autoinmunes.

10

#### Antecedentes de la invención

Los anticuerpos anti-Ro/SSA son autoanticuerpos anti-nucleares (ANA) que se asocian con muchas enfermedades autoinmunes, tales como lupus eritematoso sistémico (LES), síndrome de Sjögren (SS), síndrome de superposición SS/SLE, lupus eritematoso subagudo cutáneo (SCLE) y lupus neonatal. Constituyen un estudio inmunológico auxiliar en el diagnóstico de los pacientes con enfermedades autoinmunes como son el lupus eritematoso (LE), o como predictores para el pronóstico de algunas vasculitis del Síndrome de Sjögren (SS). Los anticuerpos anti-Ro se describieron por primera vez hace 30 años en un paciente con LES con poliserositis, fotosensibilidad y con anticuerpos antinucleares (ANA) negativos.

20

El LES es la enfermedad autoinmune no organoespecífica por excelencia, ya que el organismo produce numerosos anticuerpos (Ac) dirigidos contra estructuras celulares propias, cuyo resultado final son lesiones inflamatorias de múltiples órganos y sistemas. El LES es la enfermedad que más se asocia con el antígeno Ro (anti-Ro).

25

El antígeno Ro es una ribonucleoproteína compuesta por RNA y una porción proteica que se localiza sobre todo en el citoplasma de la célula, (de aquí el nombre scRNP, small cytoplasmic ribonucleoproteins). En la porción proteica existen al menos cuatro polipéptidos antigénicos distintos cuyos tamaños oscilan entre 52 (Ro52) y 60kD (Ro60), capaces de reaccionar con un suero monoespecífico anti-Ro.

30

En cuanto a los métodos cuantitativos para el diagnóstico, se han desarrollado varios ensayos para la determinación de autoanticuerpos, incluyendo ELISA, inmunoensayos de inmunotransferencia, inmunoensayo de flujo múltiple y matrices de proteínas. Las ventajas clave de estos ensayos son fáciles de usar, flexibles y de bajo costo. Sin embargo, la principal

35

limitación se refiere a la baja sensibilidad que limita la determinación de las concentraciones extremadamente bajas de anticuerpos circulantes en suero. Por lo tanto, el desarrollo de biosensores de alta sensibilidad es de gran interés para determinar autoanticuerpos a concentraciones muy bajas.

5

La técnica de microbalanza del cristal de cuarzo (Quartz Crystal Microbalances, QCM) se ha utilizado extensivamente como biosensor, gracias a su buen funcionamiento, alta sensibilidad y los bajos límites de detección, ofreciendo excelentes ventajas sobre las técnicas de detección tradicionales. En particular, la microbalanza del cristal de cuarzo con disipación (Quartz Crystal Microbalances with Dissipation, QCM-D) presenta grandes ventajas en relación a la sensibilidad. Además, QCM-D es atractiva debido a la respuesta del sensor en forma de variaciones en el factor de disipación ( $\Delta D$ ) que está relacionado con la viscoelasticidad, que a su vez se asocia a cambios estructurales de la película adherida sobre el transductor QCM-D. Esto añade información complementaria en relación con las interacciones estructurales entre sonda y objetivo, mostrando un alto potencial para diagnosticar y predecir enfermedades autoinmunes como el LES. Estos biosensores operan bajo el principio de que un cambio en la masa, resultante de la interacción entre el anticuerpo y su respectivo antígeno, puede ser determinado de manera directa.

La patente US5501986A describe un método para detectar un analito (proteínas, hormonas, enzimas, anticuerpos, carbohidratos o ácidos nucleicos) en una muestra utilizando QCM, midiendo el cambio en la frecuencia de resonancia y correlacionando el cambio en la frecuencia con la cantidad de analito en la muestra. Sin embargo, sólo se relaciona la presencia de un analito con una única variable.

25

Las medidas habituales de los experimentos piezoeléctricos corresponden a medidas de concentración superficial y tiempo de reacción, sin tener en cuenta las propiedades viscoelásticas de la capa adherida. Por ello, mediante esta metodología tradicional de medición no se pueden detectar estados de transición durante los procesos superficiales, al no poderse separar la señal monitorizada. Para solucionar este problema, se introdujo en los nuevos sensores piezoeléctricos la medida simultánea de la frecuencia de resonancia ( $f$ ) (masa adherida) y el factor de disipación ( $D$ ) (propiedades viscoelásticas). Con ello se pueden analizar los procesos interfaciales como una función de la naturaleza de su superficie. El gran problema de esta aproximación es que no introduce el tiempo de medida de una manera directa, por lo que no se puede medir in situ y además se hace complejo el análisis temporal del proceso monitorizado.

35

Un ejemplo es la patente WO2008114003A1, que describe un método y aparato para detectar la presencia y/o cantidad de un analito oligomero (anticuerpo) en una muestra, mediante un biosensor piezoeléctrico en donde se establecen las relaciones entre distintas variables como la frecuencia de la resonancia y el factor de disipación. Esta invención está dirigida a la detección de ciertas enfermedades, en particular el Alzheimer.

Recientemente se ha publicado en Biosensors & Bioelectronics 2017, 90, 166, el uso de una función (-df/dD) que permite introducir el factor tiempo dentro del estudio estructural de la interface monitorizada por QCM-D. Sin embargo, esta función presenta dos claras limitaciones: su interpretación implica a personal muy especializado y es poco sensible, por lo que presenta poca capacidad de discriminación.

#### Descripción de la invención

La presente invención resuelve los problemas existentes en el estado de la técnica mediante un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes en un humano. Dicho procedimiento se basa en la medición en un resonador piezoeléctrico de la relación entre distintas variables como la concentración superficial y el factor de calidad, mediante la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$ , de un proceso interfacial de reconocimiento molecular antígeno-anticuerpo para el cribado de muestras de enfermos autoinmunes.

La función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  monitoriza los cambios estructurales involucrados en el depósito de una especie reactiva sobre la superficie de un cristal piezoeléctrico. Ciertas aproximaciones son necesarias para la interpretación clara de su significado:

La respuesta acústica de un sensor piezoeléctrico (de densidad " $\rho_0$ ", espesor " $h_0$ " y módulo de cizalladura elástica " $\mu_0$ ") recubierto con una película viscoelástica (de densidad " $\rho_1$ ", espesor " $h_1$ ", viscosidad de deslizamiento " $\eta_1$ " y módulo de cizalladura elástica " $\mu_1$ ") inmersa en un líquido Newtoniano (de viscosidad de deslizamiento " $\eta_3$ " y profundidad de penetración viscosa " $\delta_3$ ") es modelada mediante las siguientes expresiones:

$$\Delta\Gamma \approx \frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f^2} \frac{1}{2\pi\rho_0h_0} \left[ \frac{\eta_3}{\delta_3} + h_1\rho_1w - 2h_1 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{\eta_1w^2}{\mu_1^2 + w^2\eta_1^2} \right] \quad (1)$$

$$\Delta Q \approx -\frac{D_0}{2\pi f\rho_0h_0Q_0} \left[ \frac{\eta_3}{\delta_3} + 2h_1 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{\mu_1w}{\mu_1^2 + w^2\eta_1^2} \right] \quad (2)$$

donde “Q” es el factor de calidad, “D” el factor de disipación y “f” la frecuencia de resonancia del sensor piezoeléctrico (Figura 1).

5 Si consideramos un film elástico puro ( $\eta_1 \rightarrow 0$ ) y consecuentemente:

$$\Delta\Gamma \approx \frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f^2} \frac{1}{2\pi\rho_0h_0} \left[ \frac{\eta_3}{\delta_3} + h_1\rho_1w \right] \quad (3)$$

$$\Delta Q \approx -\frac{D_0}{2\pi f\rho_0h_0Q_0} \left[ \frac{\eta_3}{\delta_3} + 2h_1 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{w}{\mu_1} \right] \quad (4)$$

derivando ambas expresiones en función del tiempo de monitorización (t) se obtiene:

$$\frac{d\Delta\Gamma}{dt} \approx \frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f^2} \frac{1}{2\pi\rho_0h_0} \frac{d(h_1\rho_1w)}{dt} \stackrel{w \rightarrow cte}{\approx} \frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f^2} \frac{w}{2\pi\rho_0h_0} \frac{d(h_1\rho_1)}{dt} \quad (5)$$

$$\frac{d\Delta Q}{dt} \approx -\frac{D_0}{2\pi f\rho_0h_0Q_0} 2 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{d(h_1w)}{dt} \stackrel{w \rightarrow cte}{\approx} -\frac{wD_0}{2\pi f\rho_0h_0Q_0} 2 \left( \frac{\eta_3}{\delta_3} \right)^2 \frac{d(h_1)}{dt} \quad (6)$$

y dividiéndolas (( $\partial\Delta\Gamma/\partial t$ )/( $\partial\Delta Q/\partial t$ )) se obtiene la función  $\partial\Delta\Gamma/\partial\Delta Q$  (8):

$$\frac{d\Delta\Gamma}{d\Delta Q} = \frac{\frac{d\Delta\Gamma}{dt}}{\frac{d\Delta Q}{dt}} \approx -\frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f} \frac{Q_0\delta_3^2}{D_02\eta_3^2} \frac{\frac{d(h_1\rho_1)}{dt}}{\frac{d(h_1)}{dt}} = -\frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f} \frac{Q_0\delta_3^2}{D_02\eta_3^2} \frac{d(h_1\rho_1)}{d(h_1)} = \quad (7)$$

$$= -\frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f} \frac{Q_0\delta_3^2}{D_02\eta_3^2} \left( h_1 \frac{d(\rho_1)}{d(h_1)} + \rho_1 \frac{d(h_1)}{d(h_1)} \right) \stackrel{h_1 \rightarrow cte}{\approx} -\frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f} \frac{Q_0\delta_3^2}{D_02\eta_3^2} \frac{d\rho_1}{d\left(\frac{1}{\mu_1}\right)}$$

$$\frac{d\Delta\Gamma}{d\Delta Q} \approx -\frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f} \frac{Q_0\delta_3^2}{D_02\eta_3^2} \frac{d\rho_1}{d\left(\frac{1}{\mu_1}\right)} \quad (8)$$

10

La ecuación (8) muestra como la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  es directamente proporcional a la variación de la densidad de la película adherida sobre la superficie sensora con respecto al inverso de

sus propiedades viscoelásticas. De esta manera, si la película adherida a una superficie piezoeléctrica es modificada únicamente por un proceso, el valor de la función  $\partial\Delta\Gamma/\partial\Delta Q$  permanecerá constante con el tiempo de transformación, dado que la función:

$$d\rho_1/d\left(\frac{1}{\mu_1}\right) \text{ será constante.}$$

5

En ese caso, cada especie adherida modificará de una manera regular las propiedades viscoelásticas de la película monitorizada por el sensor piezoeléctrico. Sin embargo, si la transformación monitorizada corresponde a múltiples procesos paralelos, o consecutivos, la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  variará con el tiempo presentando n-1 máximos, donde n corresponde al número de especies constituidas durante el proceso de transformación. Por lo tanto, dicha función permite caracterizar inequívocamente los procesos de transformación de las películas adheridas sobre materiales piezoeléctricos, tanto por su evolución temporal como por los valores temporales que presenta.

10

15 Por tanto, un primer aspecto de la invención es un procedimiento para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes en un humano que comprende dos etapas:

(a) incubar una muestra obtenida de dicho humano en un resonador piezoeléctrico que comprende un antígeno proteico inmovilizado en la superficie del resonador y determinar el valor de la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  descrita en la función (8), y

20

(b) realizar el diagnóstico de enfermedades autoinmunes determinando el máximo del valor de  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$ , siendo positivo el diagnóstico cuando el máximo es superior a un valor de corte de 600 ng/cm<sup>2</sup>.

25

En otro aspecto de la invención, las enfermedades autoinmunes para las cuales este procedimiento es adecuado incluyen al Síndrome de Sjögren (SS), Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y Lupus Eritematoso Neonatal (LEN).

30

En otro aspecto de la invención, el antígeno proteico empleado para el diagnóstico de las enfermedades anteriormente mencionadas es el antígeno proteico Ro (anti-Ro). Específicamente, el antígeno proteico es Ro52 ya que los cambios conformacionales que implica su reconocimiento molecular son muy distintos entre pacientes y sujetos sanos.

El lupus eritematoso sistémico (LES) es la enfermedad que más se asocia con anti-Ro, con una positividad promedio reportada del 27.7%, que se incrementa hasta 45 a 50% cuando se

analiza por ELISA. En caso de un LE de inicio tardío (mayor de 50 años) la positividad es del 92%.

Además, el anti-Ro es un importante marcador de enfermedad en el lupus eritematoso neonatal (LEN), ya que más del 90% de las madres y sus hijos lo expresan, aunque la prevalencia de LEN en madres anti-Ro es del 1%. También el anti-Ro se encuentra presente en el 70 a 88% de los pacientes con Síndrome de Sjögren (SS) primario y del 10 al 50% de los casos secundarios.

En otro aspecto de la invención, la muestra que se incuba en la etapa (a) del procedimiento se obtiene del suero sanguíneo del paciente para el cual se quiere realizar el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes anteriormente citadas.

#### Breve descripción de las figuras

15

Figura 1. Representación de la geometría de un cristal piezoeléctrico cubierto por una película viscoelástica (representación general de un concepto conocido en el estado del arte).

Figura 2. Representación gráfica de la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  frente al tiempo durante la interacción de la proteína Ro52 con autoanticuerpos provenientes de pacientes autoinmunes anti-Ro+ (a) e individuos sanos (b).

#### Descripción de modos de realización

25 Ejemplo 1. Estudio de la interacción anticuerpo anti-Ro52/proteína Ro52.

Se realizó una inmovilización química de autoantígenos específicos en el resonador piezoeléctrico y la determinación de autoanticuerpos circulantes.

La proteína Ro52 se inmovilizó mediante anclaje covalente, formando una monocapa autoensamblada. La monocapa fue creada sumergiendo la superficie piezoeléctrica durante 16 h en una disolución de ácido mercaptopropiónico 10 mM y posterior activación mediante EDC/NHS 10 mM durante 60 min. A continuación, la superficie se trató con carbohidrazida 5 mM durante 60 min. Después, se dispensaron 100  $\mu$ L de proteína Ro52 (33 mg/L) sobre la superficie sensora, incubándose durante 60 min. Finalmente, los residuos activos libres se bloquearon mediante el tratamiento de la superficie sensora con una disolución acuosa conteniendo EDTA, BSA y Tween 20 al 0,05%, pH 8,5.



Los anticuerpos fueron purificados a partir del suero de pacientes anti-Ro+.

A continuación, se registró la variación de la concentración superficial y el factor de calidad durante la interacción selectiva de autoantígenos con autoanticuerpos específicos presentes en una disolución de PBS1x, utilizando un sensor piezoeléctrico.

Posteriormente, se calculó la función  $\partial\Delta\Gamma/\partial\Delta Q$ , donde "Γ" es la concentración superficial y "Q" el factor de calidad, durante el proceso de reconocimiento molecular estudiado (Figura 2a). La Figura 2a muestra la huella dactilar característica del proceso de reconocimiento molecular, presentando un máximo en 3.000 ng/cm<sup>2</sup> a los 1.000 segundos. De esta manera, de acuerdo con lo anteriormente descrito, esta función muestra que el proceso monitorizado corresponde a un enlace cooperativo. Los anticuerpos enlazan el antígeno por medio de una interacción específica epítipo-paratopo, para posteriormente ser reconocido el fragmento Fc de estos anticuerpos por medio del dominio PRY-SPRY de la proteína Ro52. Con este experimento se demuestra el uso de la función para monitorizar estados de transición y patrones de reconocimiento molecular, estableciendo caminos de reacción del proceso estudiado.

Ejemplo 2. Estudio de la aplicación de la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  en pacientes sanos y pacientes autoinmunes anti-Ro+.

Para demostrar la bondad del uso de la función  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$  para la discriminación de pacientes con enfermedades autoinmunes, se estudió el reconocimiento molecular de anticuerpos anti-Ro52 provenientes de pacientes autoinmunes anti-Ro+ y personas sanas. Como muestra la Figura 2, los anticuerpos de ambas poblaciones muestran un comportamiento de reconocimiento similar cuando este se representa frente al tiempo.

El patrón mostrado es una función con forma de pico que presenta un máximo alrededor de 1.000 segundos. Por lo tanto, ambos procesos presentan un mismo mecanismo de reacción cooperativo. Sin embargo, los anticuerpos provenientes de pacientes anti-Ro+ presentan un máximo próximo a 3.000 ng/cm<sup>2</sup>.

Este patrón característico permanece inalterado cuando se analizan disoluciones que contienen anticuerpos anti-Ro52 de una población de 130 pacientes autoinmunes anti-Ro+. En cambio, cuando se analiza el suero de pacientes sanos, el patrón de reconocimiento de anticuerpos presenta un máximo en 500 ng/cm<sup>2</sup>.

Por tanto, la función  $\partial\Delta\Gamma/\partial\Delta Q$  permite discriminar inequívocamente pacientes anti-Ro+, al establecer un valor de corte en 600ng/cm<sup>2</sup>, identificando patrones de reconocimiento característicos .

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES) en un humano, caracterizado por que comprende:

- 5 (a) incubar una muestra obtenida de dicho humano en un resonador piezoeléctrico que comprende un antígeno proteico inmovilizado en la superficie del resonador y determinar el valor de la fórmula

$$\frac{d\Delta\Gamma}{d\Delta Q} \approx -\frac{A\sqrt{\rho_0\mu_0}}{2f} \frac{Q_0\delta_3^2}{D_0 2\eta_3^2} \frac{d\rho_1}{d\left(\frac{1}{\mu_1}\right)}$$

- 10 respecto al tiempo, donde “ $\Gamma$ ” es la concentración superficial y “ $Q$ ” el factor de calidad, “ $A$ ” es área del resonador, “ $\rho_0$ ” es la densidad, “ $D_0$ ” el factor de disipación, “ $f$ ” la frecuencia de resonancia y “ $\mu_0$ ” el módulo de cizalladura elástica del sensor piezoeléctrico, “ $\rho_1$ ” es la densidad y “ $\mu_1$ ” es módulo de cizalladura elástica de una película viscoelástica que recubre el sensor, “ $\eta_3$ ” viscosidad de deslizamiento y “ $\delta_3$ ” profundidad de penetración viscosa de un líquido newtoniano en el cual se encuentra inmersa la película, y
- 15 (b) realizar el diagnóstico de lupus eritematoso sistémico (LES) determinando el máximo del valor de  $d\Delta\Gamma/d\Delta Q$ , siendo positivo el diagnóstico cuando el máximo es superior a un valor de corte de 600 ng/cm<sup>2</sup>.

- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el antígeno proteico es Ro.

3. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el antígeno proteico es Ro52.

- 25 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que dicha muestra es suero sanguíneo.

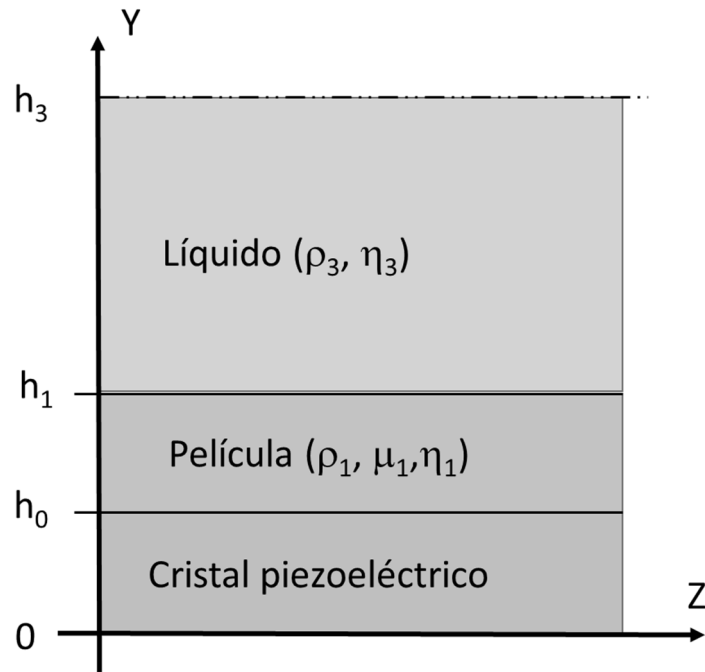
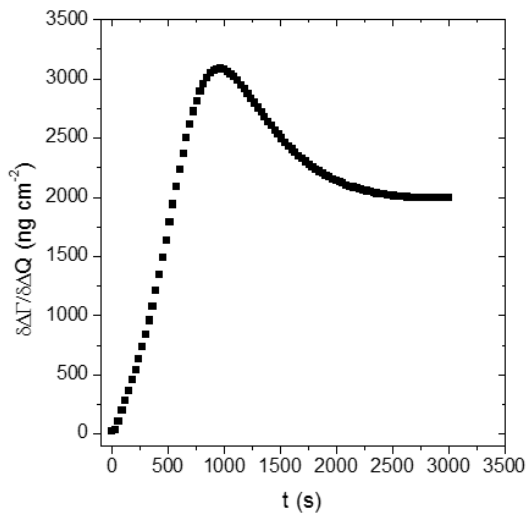


FIG. 1

a)



b)

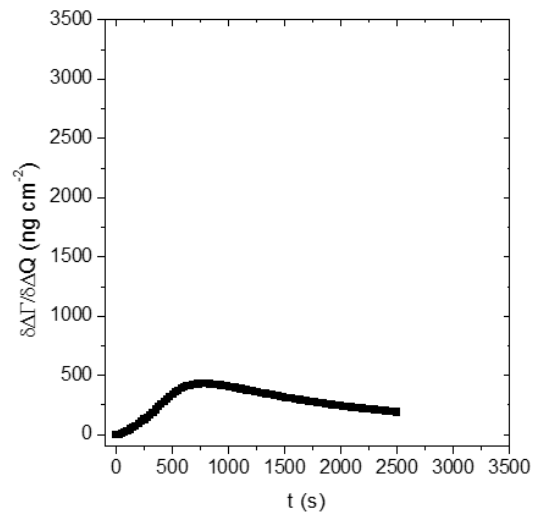


FIG. 2