

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 060**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/564** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.04.2011 PCT/CH2011/000077**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.10.2011 WO11127616**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.04.2011 E 11714916 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2558862**

54 Título: **Métodos de diagnóstico para el glaucoma**

30 Prioridad:

**13.04.2010 US 342363 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.05.2019**

73 Titular/es:

**M-LAB GMBH (100.0%)  
Konrad-Kraus-Strasse 11  
55124 Mainz, DE**

72 Inventor/es:

**GRUS, FRANZ;  
BOEHM, NILS;  
PFEIFFER, NORBERT y  
BELL, KATHARINA**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 712 060 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

Métodos de diagnóstico para el glaucoma

5 **Campo de la invención**

La invención está en el campo del diagnóstico médico y se refiere en particular a un método para el diagnóstico del glaucoma basado en el análisis de la reactividad autoinmune. El método de diagnóstico se basa en las reactividades autoinmunes en los líquidos corporales de los pacientes con glaucoma. El método de diagnóstico para el glaucoma se basa en el análisis de la reactividad autoinmune de los líquidos corporales frente a antígenos oculares que están al menos parcialmente purificados.

**Antecedentes de la invención**

15 El glaucoma es un grupo de trastornos oculares caracterizado por la pérdida progresiva de las células ganglionares de la retina y sus axones, y por una pérdida gradual del campo visual. Es una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. El glaucoma tiene una prevalencia de aproximadamente el 1 -2 % en la población general en Europa. Hasta el 3-4 % de las personas mayores de 60 años están afectadas por la enfermedad. La forma más habitual de glaucoma es el glaucoma primario de ángulo abierto (POAG), con una prevalencia que varía entre el 1,1 % y el 2 %.

20 La patogenia del glaucoma solo se comprende parcialmente, y una elevada presión intraocular no es la única responsable de la enfermedad. Todavía se considera que un aumento en la presión intraocular es un factor de riesgo importante, pero es probable que otros factores patógenos, tales como procesos apoptóticos, unos elevados niveles de óxido nítrico o una implicación del sistema inmunitario, sean relevantes.

25 Adicionalmente, una elevada presión intraocular es bastante prevalente (el 10 % de la población en una edad de 40), sin embargo, únicamente algunos de éstos desarrollan un glaucoma a lo largo de los años. Hasta ahora no existen pruebas diagnósticas convencionales para la identificación de qué personas con una elevada presión intraocular desarrollan un glaucoma. Dado que un tratamiento temprano del glaucoma es crucial para prevenir la pérdida de la visión, existe una necesidad de herramientas diagnósticas mejoradas que detecten el glaucoma en una fase temprana independiente de una elevada presión intraocular.

30 Se sabe que una elevada presión intraocular es una importante causa de muerte de las células de la retina y de desarrollo de la enfermedad de glaucoma. Una elevada presión como causa de muerte celular se ha reproducido *in vitro*. Agar et al. (Brain Res. 2006. 1086 (1): págs. 191-200) exponiendo cultivos *in vitro* de líneas celulares ganglionares de la retina a una elevada presión hidrostática e induciendo la muerte celular.

35 Sin embargo, también se sabe que aproximadamente el 30 % de los casos de glaucoma no están acompañados por una elevada presión intraocular. Al menos algunas formas de la enfermedad de glaucoma se ajustan al patrón de enfermedades neurodegenerativas, con una disfunción progresiva de aspectos del sistema nervioso, junto con una atrofia progresiva de las estructuras afectadas del sistema nervioso periférico o central. Por lo tanto, se analizan algunas causas y mecanismos adicionales, que aparte de una elevada presión intraocular, están dando lugar a la destrucción de las células ganglionares de la retina, tales como, por ejemplo, un elevado nivel de óxido nítrico o un proceso mediado por los linfocitos T o ataques autoinmunes.

40 Los métodos de detección temprana del glaucoma todavía son limitados. La medición de la presión intraocular puede detectar algunos de los pacientes, pero unos niveles fluctuantes en la presión también pueden dar lugar a un resultado falso negativo. En ese momento, cuando los propios pacientes reconocen una pérdida en la función visual, en la mayoría de los casos ya se ha producido un gran defecto irreversible de las células ganglionares de la retina.

45 50 Aproximadamente el 30 % de los casos de glaucoma que no están acompañados por una elevada presión intraocular se denominan glaucoma de tensión normal. El método de detección tradicional de medir una elevada presión intraocular fracasa con estos pacientes. Teniendo en consideración la ausencia de un método de diagnóstico para el de glaucoma tensión normal, así como la falta de un método de detección para el glaucoma de fase temprana, es necesario desarrollar métodos para la detección del glaucoma independientemente de la presión intraocular. La autoinmunidad como un factor importante en el glaucoma se ha demostrado mediante diversos estudios que muestran anticuerpos séricos contra los antígenos oculares. Por ejemplo, las proteínas de choque térmico HSP27, HSP60,  $\alpha$ - $\beta$ -cristalina,  $\gamma$ -enolasa,  $\alpha$ -fodrina, glutatión-S-transferasa y glicosaminoglicanos, tienen diferentes niveles de reactividades de unión en los pacientes con glaucoma en comparación con los sujetos sanos (por ejemplo, Joachim, S. C., et al., Curr. Eye Res. 2007, 32 (6): págs. 501-9 o, por ejemplo, F. H. Grus, Klin Monatsbl Augenheilkd 2010: 227: 114-119.) De forma interesante, no solo unas elevadas reactividades de anticuerpo, que podrían tener un impacto autoagresivo, si no que ciertos antígenos con unas reactividades autoinmunes disminuidas, son característicos en los líquidos corporales de los pacientes con glaucoma. Adicionalmente, podría demostrarse que la aplicación directa de anticuerpos anti-HSP da como resultado una apoptosis de las células ganglionares de la retina en una metodología de cultivo celular (Tezel G, et al. Invest Ophthalmol. Vis. Sci. 1998; 39: 2277-2287). Previamente se han divulgado métodos de diagnóstico basados en un patrón específico de reactividad autoinmune de los pacientes con glaucoma.

Por ejemplo, el documento WO2004/036220 desvela métodos para el diagnóstico del glaucoma mediante el análisis del complejo repertorio de anticuerpos en los líquidos corporales tales como el suero, las lágrimas, el humor acuoso o la saliva, frente a antígenos oculares. Como fuente de los antígenos oculares se han usado mezclas en bruto de antígenos de la retina, de antígenos del nervio óptico y otros, y se han medido los complejos patrones de reactividad autoinmune. Se ha utilizado una diversidad de técnicas analíticas inmunológicas que incluyen ensayos de inmunotransferencia Western, ensayos de quimioluminiscencia, ELISA, radioinmunoensayos para la detección y la medición de los patrones de reactividad autoinmune, al igual que se divulgaron métodos para la detección, el procesado y el análisis digital de imágenes, para la generación y el análisis comparativo de los patrones de reactividad autoinmune de individuos de prueba, de individuos sanos y de pacientes con glaucoma. El documento WO2004/036220 enseña métodos de diagnóstico para el glaucoma que se basan en los patrones de reactividad autoinmune frente a los antígenos oculares, que no son aislados a partir de mezclas complejas de un gran número de antígenos oculares, y la mayoría de los cuales no han sido identificados. La diferencia en los patrones de reactividad autoinmune de los líquidos corporales entre los individuos de prueba, los individuos sanos y los pacientes con glaucoma produce entonces el resultado del diagnóstico. Sin embargo, los estudios en el campo diagnóstico relativos a otras enfermedades tales como el cáncer han revelado que el diagnóstico basado en una reactividad autoinmune frente a biomarcadores de identidad desconocida a menudo es poco fiable. Por lo tanto, existe la necesidad de unos métodos fiables de diagnóstico del glaucoma, que sean independientes de una elevada presión intraocular.

Adicionalmente, el documento EP 18332600 desvela péptidos y los correspondientes ácidos nucleicos para la interacción de los epítomos con autoanticuerpos contra el receptor adrenérgico beta 2. Estos autoanticuerpos están asociados con el glaucoma. El documento WO 2009/145478 desvela un kit de diagnóstico para el glaucoma que comprende el antígeno que contiene la proteína valosina, que interactúa específicamente con los anticuerpos asociados al glaucoma alfa enolasa o colágeno de tipo VI.

Es un objeto de la actual invención proporcionar métodos de diagnóstico alternativos y mejorados y fiables para detectar el glaucoma independiente de una presión intraocular aumentada mediante el análisis de los líquidos corporales. Es un objeto adicional de la invención proporcionar métodos de diagnóstico para la detección del glaucoma con unos grados de sensibilidad y de especificidad seleccionables usados tanto para una prueba rápida como para una prueba profesional de laboratorio. Algunos objetos adicionales de la invención incluyen la provisión de elementos portadores del antígeno y de kits para el diagnóstico del glaucoma, así como antígenos oculares recién identificados que sirven como biomarcadores para el diagnóstico del glaucoma y como agentes bloqueantes en el tratamiento terapéutico del glaucoma.

### Sumario de la invención

La invención concierne a un método de diagnóstico para el glaucoma basado en un análisis de la reactividad autoinmune en un líquido corporal frente a los antígenos oculares purificados al menos parcialmente, en el que se miden las reactividades autoinmunes frente a dos o más antígenos oculares conocidos y se transforman en una puntuación de glaucoma según su contribución preferentemente ponderada de las reactividades autoinmunes medidas hacia un resultado del diagnóstico.

El método de diagnóstico para el glaucoma comprende las etapas de (a) proporcionar al menos dos muestras que comprenden al menos un antígeno ocular purificado al menos parcialmente, proporcionando así conjuntamente al menos dos antígenos oculares purificados al menos parcialmente o proporcionar al menos una muestra que comprende al menos dos antígenos oculares purificados al menos parcialmente, (b) hacer reaccionar un líquido corporal con la al menos una muestra de antígeno ocular, (c) detectar y / o cuantificar las reacciones entre los autoanticuerpos del líquido corporal y la al menos una muestra de antígeno ocular de la etapa b para determinar un valor de reactividad autoinmune, d) comparar los valores medidos de la reactividad autoinmune con los datos convencionales obtenidos a partir de pacientes con glaucoma y/o de individuos sanos para determinar una puntuación de glaucoma para la al menos una muestra de antígeno y e) opcionalmente, determinar el resultado del diagnóstico mediante la evaluación de la al menos una puntuación de glaucoma.

El término líquido corporal de individuos humanos o de animales, en el contexto de esta solicitud incluye, pero no se limita a, suero, lágrimas, saliva, orina, humor acuoso, cuerpo vítreo del ojo o líquido cefalorraquídeo, y fracciones de los mismos o un homogeneizado de especímenes tisulares de individuos humanos o de animales y fracciones de los mismos. En las realizaciones preferidas del método para el diagnóstico del glaucoma se usa suero sanguíneo o lágrimas.

Antígeno ocular se refiere a cualquier antígeno que aparece también en el ojo, y obviamente algunos de estos antígenos oculares mencionados explícitamente a continuación son ubicuos. Los antígenos oculares presentes en el ojo incluyen, en particular, antígenos de la retina, antígenos del nervio óptico, antígenos del nervio óptico de la cabeza, antígenos de la red trabecular, antígenos uveales. Se sabe que los antígenos relevantes del glaucoma no están restringidos a las proteínas presentes en las células ganglionares de la retina, sino que incluyen los antígenos que son característicos de las células vecinas, tales como las células de la glía o los componentes del citoesqueleto.

Adicionalmente, para esta solicitud, el término antígenos oculares - incluyendo todos los antígenos oculares indicados

específicamente mencionados a continuación - se aplica no solo a las formas fisiológicas naturales de las respectivas proteínas, sino también a las formas modificadas post-traduccionalmente y a cualquier otro derivado natural o artificial tal como péptidos, y a las formas que están etiquetadas, escindidas, modificadas químicamente que de otro modo incluyen combinaciones de las modificaciones mencionadas.

5 Los antígenos oculares purificados al menos parcialmente se refieren a los antígenos oculares que se aíslan a partir de la mezcla compleja de proteínas de su entorno fisiológico mediante una purificación al menos parcial de la proteína con las técnicas de purificación de proteínas convencionales. Los antígenos oculares con una pureza de calidad comercial disponibles también se consideran antígenos oculares purificados al menos parcialmente para su uso en un  
10 método de diagnóstico para el glaucoma en el contexto de esta publicación. Dicha purificación parcial produce al menos un 70 % de uno o de más antígenos oculares deseados en peso de la proteína total, preferentemente al menos un 80 % más preferentemente al menos un 90 % y lo más preferentemente al menos un 95 %.

15 El término muestra de antígeno ocular se refiere a una muestra que comprende uno o más antígenos oculares purificados al menos parcialmente. En las realizaciones preferidas del método según la invención, la muestra de antígeno ocular comprende únicamente un antígeno ocular, y las puntuaciones de glaucoma se determinan individualmente para cada uno de los antígenos oculares parcialmente purificados por separado. En algunas realizaciones preferidas adicionales, se combinan dos o más antígenos oculares parcialmente purificados en al menos una de las muestras de antígeno ocular. Para dichas muestras de antígenos oculares, las reactividades autoinmunes  
20 medidas se corresponden con la reacción autoinmune frente a una combinación de dos o más antígenos oculares, que da lugar a continuación a una puntuación de glaucoma. En contraste con los antígenos no aislados a partir de su entorno fisiológico, tales como lisados de células oculares, las cantidades relativas de los componentes de la combinación de antígenos está controlada. Dicha combinación controlada de antígenos puede dar lugar también a una ponderación, es decir, el efecto de que un factor de ponderación modula la contribución de la reactividad autoinmune medida de ciertos antígenos oculares en el resultado del diagnóstico.

25 En esta publicación, los términos 'antígenos oculares' o 'antígenos' se usan a menudo de forma intercambiable y en lugar de las expresiones más bien largas 'antígenos oculares purificados al menos parcialmente' o 'muestras de antígenos oculares purificados al menos parcialmente'.

30 La reactividad autoinmune o, de forma intercambiable, la inmunorreactividad, y la reactividad autoanticuerpo en el contexto de esta publicación, se refieren a la actividad de unión de los anticuerpos presentes en un líquido corporal a un antígeno ocular purificado al menos parcialmente, que es incubado con el líquido corporal.

35 Los métodos para la detección y la medición de la reactividad autoinmune incluyen las técnicas analíticas inmunológicas convencionales tales como un análisis de inmunotransferencia Western, un ensayo de quimioluminiscencia, un ELISA, radioinmunoensayos, micromatrices y otros. Los antígenos se aplican y se fijan a un elemento portador del antígeno, y después se incuban con el líquido corporal que contiene los autoanticuerpos que se van a detectar. Posteriormente, los autoanticuerpos unidos son identificados para determinar las reactividades autoinmunes. Los métodos para la identificación incluyen, por ejemplo, el pre-etiquetado de la muestra que se va a  
40 analizar, la adición de un anticuerpo secundario, que se une a los autoanticuerpos unidos al antígeno o a una etiqueta indirecta, por ejemplo, anti-inmunoglobulinas humanas de cabra etiquetadas, etc. Algunos métodos adicionales incluyen el análisis de elementos direccionables tales como microesferas, nanopartículas, etiquetas, etc. Algunos métodos de detección también pueden incluir métodos que no requieren un etiquetado, por ejemplo, de tipo SELDI-  
45 TOF (espectrometría de masas con desorción/ionización superficial mejorada por láser en tiempo de vuelo), MALDI (espectroscopía de masas con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz u otras técnicas de chip de anticuerpo).

50 El método para el diagnóstico del glaucoma según la invención se basa en la diferencia en la reactividad autoinmune promedio en las personas sanas en comparación con los pacientes con glaucoma frente a ciertos antígenos oculares. Por lo tanto, se usan ciertos títulos de autoanticuerpos frente a ciertos antígenos oculares de un líquido corporal como prueba diagnóstica de la enfermedad de glaucoma.

55 También se divulgan los recién identificados antígenos oculares, a los que se unen diferencialmente los autoanticuerpos en los individuos sanos y en los pacientes con glaucoma, y que son útiles diagnósticos como marcadores (o biomarcadores) para la detección de la enfermedad de glaucoma.

60 Con objeto de extraer información a partir de las señales medidas de las reactividades autoinmunes frente a las muestras de antígeno ocular, las señales o los valores medidos de la reactividad autoinmune se comparan con los datos convencionales, en las realizaciones preferidas, la comparación de la etapa d) se lleva a cabo para cada muestra de antígeno ocular, por separado. En las realizaciones preferidas, los datos convencionales incluyen los valores medios de la reactividad autoinmune medida frente a cada muestra de antígeno ocular tanto para los controles sanos como para los pacientes con glaucoma. En otras realizaciones preferidas, los datos convencionales incluyen los valores medios de la reactividad autoinmune medida frente a cada muestra de antígeno ocular característica de ciertas  
65 fases de la enfermedad. Por lo tanto, el diagnóstico de las diferentes fases de la enfermedad de glaucoma, y también la monitorización de la progresión de la enfermedad de glaucoma, están en el método según la invención. En algunas

realizaciones preferidas adicionales, los datos convencionales de las reactividades autoinmunes incluyen las reactividades autoinmunes características de los subtipos de las formas específicas de la enfermedad de glaucoma.

5 Dichos datos convencionales pueden ser generados mediante reacciones de control de las etapas (a) - (c) del método para el diagnóstico de glaucoma de los líquidos corporales de los individuos sanos y de los pacientes con glaucoma que se realizan en paralelo con las muestras de prueba, o dichos datos convencionales pueden proceder de los datos almacenados de las reacciones de control llevadas a cabo en unas condiciones idénticas en un momento diferente.

10 En las realizaciones preferidas, se deduce la puntuación de glaucoma para cada muestra de antígeno ocular a partir del valor medido de la reactividad autoinmune mediante la correlación del valor medido de un individuo de prueba con los datos convencionales, y la transformación del valor medido de la reactividad autoinmune en una puntuación de glaucoma. En un ejemplo simplificado, se determina una puntuación de glaucoma a partir de la reactividad autoinmune medida para cada muestra individual de antígeno ocular en un escala de diagnóstico del glaucoma de entre 0 y 100, en la que 0 se corresponde con el valor medio de la reactividad autoinmune medida frente a un antígeno ocular en particular en personas sanas, y 100 se corresponde con el valor medio de la reactividad autoinmune medida frente a este antígeno en pacientes con glaucoma.

20 En las realizaciones preferidas del método según la invención se usan algoritmos que usan métodos convencionales de técnicas estadísticas multivariantes, algoritmos ramificados o redes neurales artificiales para calcular la transformación desde un valor de la reactividad autoinmune medida a la correspondiente puntuación de glaucoma según la etapa (d). De una forma análoga, en la etapa (e) se usan algoritmos en algunas realizaciones preferidas para el análisis de las puntuaciones de glaucoma determinadas para cada una de las muestras de antígenos oculares, para determinar el resultado del diagnóstico, y en algunas realizaciones preferidas adicionales, se usan algoritmos en ambas etapas. En algunas variantes adicionales más, la al menos una puntuación de glaucoma de la etapa (d) es la última etapa del método de diagnóstico del glaucoma. Según estas variantes, la etapa (e) no está comprendida por el método de diagnóstico para el glaucoma, pero es llevada a cabo por un profesional médico, quien deduce un resultado del diagnóstico a partir de las puntuaciones de glaucoma.

30 Una importante ventaja del método de diagnóstico para el glaucoma según la invención es que el resultado del diagnóstico se basa en el análisis de las puntuaciones de glaucoma de los antígenos purificados parcialmente de identidad conocida.

35 En las realizaciones preferidas se asigna un factor de ponderación a al menos una de las muestras de antígenos oculares. Dichos factores de ponderación modulan la contribución de la reactividad autoinmune frente a una muestra de antígeno ocular en particular para el resultado del diagnóstico. En las realizaciones preferidas, el factor de ponderación es introducido calculadamente en la etapa (c) o (d) o (e) del método de diagnóstico, sin embargo, en algunas realizaciones preferidas se introduce un factor de ponderación en las etapas (a) o (b) y en algunas realizaciones adicionales más, los factores de ponderación se introducen en más de una de las etapas (a) - (e). Los factores de ponderación tienen el efecto de modular el resultado del diagnóstico independientemente de la etapa en la que son introducidos. Una puntuación ponderada de glaucoma es el resultado de un factor de ponderación que ha sido introducido en una cualquiera o más de una de las etapas (a) - (e).

45 Según algunas realizaciones preferidas en las que el resultado del diagnóstico se basa en una puntuación ponderada de glaucoma, el factor de ponderación específico es introducido en una etapa computacional cuando las señales desencadenadas a partir de los autoanticuerpos que se unen a los antígenos individuales son detectadas y medidas con una herramienta de detección de señales, tal como un lector óptico.

50 Según algunas realizaciones preferidas adicionales, el factor de ponderación es introducido mediante la ponderación diferencial de la cantidad de antígenos individuales expuesta a la reacción con los anticuerpos autoinmunes y/o mediante la ponderación de una o más de las etapas analíticas para la detección y la medición de la reactividad autoinmune contra los antígenos individuales. Algunos ejemplos de dichas realizaciones incluyen la detección de la reactividad autoinmune con microesferas diseñadas para que sean específicas para diferentes antígenos, y la ponderación puede llevarse a cabo bien mediante una intensidad diferencial de la etiqueta de las microesferas específicas del antígeno, o bien mediante una sensibilidad con una graduación diferencial de la herramienta de detección.

60 Las puntuaciones de glaucoma son ponderadas, por ejemplo, de forma que las puntuaciones de glaucoma para las muestras de antígeno ocular con una elevada relevancia diagnóstica contribuyan más al resultado del diagnóstico. En un ejemplo simplificado, una muestra de antígeno ocular X, que desencadena reactividades autoinmunes, que difieren en un amplio valor significativo entre los pacientes con glaucoma y los individuos sanos, y con los datos convencionales de los valores para mediados con unas bajas desviaciones típicas, tienen generalmente una mayor relevancia diagnóstica que una muestra de antígeno ocular Y que desencadena unas reactividades autoinmunes que difieren únicamente ligeramente entre los pacientes con glaucoma y los individuos sanos y que tiene unos valores convencionales medios con una elevada desviación típica. Correspondiente y particularmente, en una prueba de glaucoma que está diseñada para maximizar la especificidad, las puntuaciones de glaucoma para la muestra de antígeno X serían ponderadas de una forma más importante que las puntuaciones de glaucoma para la muestra de

antígeno Y, para modular su respectiva contribución al resultado del diagnóstico.

Es una ventaja adicional del método de diagnóstico que los antígenos oculares purificados parcialmente conocidos, que están comprendidos en las muestras de antígenos oculares proporcionadas en la etapa a) y/o cualquier factor de ponderación asignado, pueden elegirse, se seleccionan dependiendo del propósito de una prueba diagnóstica en particular para el glaucoma. Por ejemplo, en una prueba de cribado diseñada para el diagnóstico del glaucoma en una fase temprana de la enfermedad, sería deseable maximizar la sensibilidad. Para dicha aplicación de prueba diagnóstica se considera aceptable un cierto número de falsos positivos, pero deberían evitarse los falsos negativos.

Una ventaja adicional de las realizaciones preferidas del método de diagnóstico es que, a partir del conocimiento del papel fisiológico de los antígenos que produjeron una elevada puntuación de glaucoma en un paciente en particular, puede extraerse una información diagnóstica adicional, enriqueciendo así el resultado del diagnóstico.

Según se va sabiendo más sobre cómo la progresión de la enfermedad se correlaciona con la reactividad autoinmune frente a los antígenos oculares, dichos antígenos característicos de una fase específica, particularmente de una fase temprana, pueden usarse como biomarcadores para la monitorización de la progresión de la enfermedad, incluyendo la monitorización de la eficacia de un tratamiento médico en la ralentización o la detención de la progresión de la enfermedad. Clínicamente, es de gran importancia identificar, entre los individuos con una elevada presión intraocular, aquellos que desarrollan un glaucoma, con objeto de comenzar el tratamiento antes de la muerte irreversible de las células ganglionares de la retina.

En la etapa a) del método para el diagnóstico de glaucoma, al menos 2 antígenos oculares purificados parcialmente, o al menos 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 antígenos, o preferentemente al menos 2 y menos de 5 o de 10 antígenos del grupo 1 que consisten en los siguientes 48 antígenos oculares, están comprendidos en una o más muestras de antígenos oculares purificados al menos parcialmente: actina, albúmina, alfa-1-antitripsina, anexina I-IV, anexina V, receptor adrenérgico beta 2, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), calreticulina, cardiolipina, alfa-A cristalina, alfa-B cristalina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma-cristalina, topoisomerasa de ADN 1, fibronectina,  $\alpha$ -fodrina (= espectrina), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutatión-S-transferasa, proteína de choque térmico HSP10 (= chaperonina), HSP27, HSP60, HSP70, insulina, jo-1, lisozima, proteína de unión a la mielina (MBP), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), mioglobina, enolasa específica de neurona (NSE), neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5, dismutasa de superóxido, 3-fosfoserina, prealbúmina, inhibidor de la cinasa de proteína C, cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, alfa-sinucleína, gamma-sinucleína, tireoglobulina, transferrina, transtiretina, inhibidor de la topoisomerasa, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vimentina.

El siguiente subgrupo de los antígenos mencionados anteriormente, denominado Grupo 2, ha sido identificado como marcadores diagnósticos del glaucoma por primera vez. En algunas realizaciones preferidas adicionales de la etapa a) del método para el diagnóstico del glaucoma, al menos 1 antígeno ocular purificado parcialmente, o al menos 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 antígenos, o preferentemente al menos 2 y menos de 5 o de 10 o de 20 antígenos del siguiente Grupo 2 que consiste en antígenos oculares, están comprendidos en una o más muestras de antígenos oculares purificados al menos parcialmente: albúmina, anexina I-IV, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), calreticulina, cardiolipina, beta-S cristalina, gamma cristalina, topoisomerasa de ADN 1, fibronectina, insulina, jo-1, lisozima, glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), mioglobina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5, dismutasa de superóxido, 3-fosfoserina, prealbúmina, inhibidor de la cinasa de proteína C, cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, alfa-sinucleína, tireoglobulina, transferrina, transtiretina, inhibidor de la topoisomerasa, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Para algunos de los antígenos del anteriormente mencionado grupo 1 se sabía previamente que las reactividades autoanticuerpo contra ellos eran diferentes en los pacientes con glaucoma y en los individuos sanos. Esto se ha confirmado (véanse los ejemplos y las figuras), y su reactividad autoanticuerpo tiene una relevancia diagnóstica también para el glaucoma. Estos antígenos oculares del grupo 3 son: actina, alfa-A cristalina, alfa-B cristalina,  $\alpha$ -fodrina (= espectrina), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutatión-S-transferasa, HSP27, HSP60, HSP70, proteína de unión a la mielina (MBP), enolasa específica de neurona (NSE), vimentina.

Los antígenos del grupo 1 se han clasificado en tres subgrupos A, B y C. Mediante los métodos descritos en los ejemplos y en las figuras, en los que se miden las reactividades autoinmunes frente a los diferentes antígenos oculares en los individuos sanos y en los pacientes con glaucoma, se ha evaluado la relevancia diagnóstica o los antígenos. Los antígenos del grupo C o preferentemente los antígenos del grupo B, o más preferentemente los antígenos del grupo A, están comprendidos en la al menos una muestra de antígenos oculares usada para el primer método de diagnóstico para el glaucoma.

El siguiente grupo de antígenos oculares purificados parcialmente ha sido identificado como marcadores diagnósticos muy altamente relevantes para el glaucoma y se ha clasificado como antígenos del grupo A: actina, alfa-1-antitripsina, anexina V, alfa-A-cristalina, alfa-B cristalina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma cristalina,  $\alpha$ -fodrina (= espectrina), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutatión-S-transferasa, HSP27, HSP60, HSP70, jo-1, proteína de unión a la mielina (MBP), enolasa específica de neurona (NSE), inhibidor de la cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, transferrina, transtiretina, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vimentina. En las

realizaciones preferidas, la al menos una muestra de antígenos oculares proporcionada en la etapa a) comprende al menos 2 antígenos seleccionados entre el Grupo A de antígenos oculares.

El siguiente grupo de antígenos oculares purificados parcialmente ha sido identificado como marcadores diagnósticos muy altamente relevantes para el glaucoma y se ha clasificado como antígenos del grupo B: anexina I-IV, receptor adrenérgico beta 2, calreticulina, proteína de choque térmico HSP10 (= chaperonina), insulina, dismutasa de superóxido, cinasa de proteína C, alfa-sinucleína, gamma-sinucleína. En algunas realizaciones preferidas adicionales, la al menos una muestra de antígenos oculares proporcionada en la etapa a) comprende al menos 2 antígenos seleccionados entre el Grupo A y/o entre el Grupo B de antígenos oculares:

También, el siguiente grupo C de antígenos oculares purificados parcialmente ha sido identificado como marcadores diagnósticos relevantes para el glaucoma: albúmina, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), cardiolipina, topoisomerasa de ADN 1, fibronectina, lisozima, glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), mioglobina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5, 3-fosfoserina, tireoglobulina, inhibidor de la topoisomerasa.

En algunas realizaciones preferidas adicionales, la al menos una muestra de antígenos oculares purificados al menos parcialmente comprende al menos 1 antígeno, o preferentemente al menos 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 antígenos, o preferentemente al menos 1 y menos de 5 o de 10 antígenos o preferentemente al menos 2 y menos de 20 o la totalidad de los antígenos, que pertenecen al Grupo 2 o tanto a los Grupos 2 como al Grupo A, clasificados como el Grupo 2-A o que pertenecen al Grupo 2, y bien al Grupo A o al Grupo B, clasificados como el Grupo 2-AB.

También se divulga un elemento portador del antígeno que porta al menos una muestra que comprende al menos un antígeno ocular purificado al menos parcialmente. Algunas realizaciones preferidas del elemento portador del antígeno incluyen chips con micromatriz, tiras reactivas de flujo lateral y chips microfluidos. En algunas realizaciones preferidas, el elemento portador del antígeno comprende una zona de antígeno predeterminada que es un área superficial de la tira o del portaobjetos o de la placa y similares o una superficie predeterminada en un dispositivo sobre el que se van a aplicar o microaplicar las muestras de antígeno ocular. En otras realizaciones preferidas más, el elemento portador del antígeno comprende adicionalmente una zona receptora del líquido corporal. En algunas realizaciones preferidas adicionales, el elemento portador del antígeno comprende microesferas u otro sustrato que es recubierto con las muestras de antígenos oculares. En algunas realizaciones preferidas adicionales, el elemento portador del antígeno porta unas cantidades ponderadas de las muestras de antígenos oculares, y en algunas realizaciones adicionales más, el elemento portador del antígeno comprende antígenos oculares seleccionados entre el Grupo 1 o el Grupo 2 o el Grupo A o el Grupo A y el B o el Grupo 2-A. Pueden usarse combinaciones de las características mencionadas anteriormente para el elemento portador del antígeno.

En una realización preferida del método de diagnóstico para el glaucoma, el elemento que porta la al menos una muestra de muestras de antígenos oculares es un chip con micromatriz del antígeno. La al menos una muestra de antígenos oculares es aplicada en una matriz del antígeno o en una micromatriz del antígeno en una matriz de aplicaciones bidimensional o tridimensional en un elemento portador del antígeno, que es, por ejemplo, un portaobjetos de vidrio, una placa o un chip o un portaobjetos de nitrocelulosa o un portaobjetos de hidrogel, y similares. Las matrices de proteínas se preparan aplicando al menos 2, preferentemente 3-5 o 3-9 o 3-12 muestras de los antígenos oculares purificados al menos parcialmente, cuando sea aplicable, un grupo de antígenos en particular descrito anteriormente sobre el elemento portador, tal como sobre portaobjetos recubiertos de nitrocelulosa. Las matrices se incuban con las muestras de un líquido corporal apropiadamente diluidas, tales como suero sanguíneo, lágrimas o humor acuoso. La reactividad autoinmune se detecta, por ejemplo, mediante la visualización de las reacciones autoanticuerpo-antígeno en las matrices según las técnicas establecidas conocidas en la materia tales como, por ejemplo, mediante un tratamiento con un anticuerpo anti IgG con una etiqueta fluorescente, seguido de un escaneo de la fluorescencia. Las señales emitidas por los anticuerpos secundarios son digitalizadas; las intensidades de las aplicaciones medidas y opcionalmente comparadas con los resultados de los líquidos corporales de los individuos de control mediante el uso de técnicas estadísticas multivariantes. Algunas alternativas para detección de una reactividad autoanticuerpo incluyen una visualización mediante un anticuerpo anti-IgG humana acoplado a una enzima que reacciona con un componente añadido o presente en el elemento portador del antígeno, que da como resultado la aparición de un color o el cambio de un color. Dicho cambio de color, en algunas aplicaciones, puede ser visualizado directamente o mediante una herramienta de detección tal como un lector óptico. En algunas realizaciones preferidas adicionales más, las reactividades autoinmunes se miden con un ensayo de competición, que es otra técnica de inmunoensayo establecida: por ejemplo, anticuerpos monoclonales fluorescentes disponibles comercialmente específicos para ciertos antígenos oculares compiten con los autoanticuerpos, que están presentes en el líquido corporal de la etapa b) por reaccionar con los mínimos antígenos oculares purificados parcialmente proporcionados en la etapa a). Una fuerte reactividad autoinmune en el líquido corporal contra un antígeno ocular en particular en dicho ensayo da como resultado una señal débil, debido a que a los anticuerpos comerciales con etiqueta fluorescente se les impide la unión a los antígenos por parte de los autoanticuerpos no etiquetados del líquido corporal. Evidentemente, la invención no está limitada a estos ejemplos de ensayos inmunológicos convencionales conocidos en la materia, que se mencionan aquí como meros ejemplos, sino que se extiende a cualquier ensayo inmunológico convencional conocido en la materia que sea aplicable para la determinación de la reactividad autoinmune en líquidos corporales frente a los antígenos oculares purificados al menos parcialmente.

En algunas aplicaciones preferidas se introduce un factor de ponderación asignado a los antígenos individuales para modular su contribución al resultado del diagnóstico, por ejemplo, mediante la aplicación de diferentes cantidades del antígeno en la micromatriz, o mediante la ponderación diferencial de las señales desencadenadas por los anticuerpos unidos a los antígenos individuales. En algunas realizaciones preferidas adicionales, las cantidades de antígeno aplicadas en la micromatriz se varían con objeto de modular la intensidad de la señal esperada de reactividad autoinmune, de forma que esté en un intervalo lineal de detección de la señal por parte de la herramienta de detección.

Como se presenta adicionalmente en el ejemplo 7, una prueba para el glaucoma con una selección únicamente con 5 antígenos purificados al menos parcialmente da como resultado una diferenciación entre los pacientes con glaucoma y los individuos sanos con una especificidad y una sensibilidad de aproximadamente el 90 %. Por lo tanto, en algunas realizaciones preferidas adicionales, el número de muestras de antígenos oculares está limitado a un pequeño número tal como 10 u 8 o 6 o 5 o menos de 5, con objeto de proporcionar una prueba que sea simple en su análisis y que sea producible a un bajo coste, para el cribado en masa de grandes cantidades de individuos.

En una realización preferida adicional del método de diagnóstico para el glaucoma, el elemento portador de en la al menos una muestra de muestras de antígeno ocular es una tira reactiva de flujo lateral. En las variantes preferidas de estas realizaciones, el elemento portador del antígeno comprende una zona portadora del antígeno predeterminada y una zona receptora predeterminada para un líquido corporal. En algunas variantes preferidas adicionales, la tira de flujo lateral comprende opcionalmente varias zonas que comprenden subzonas. Se aplica una selección de los antígenos oculares purificados al menos parcialmente en la zona del antígeno. Las muestras de antígenos oculares individuales pueden aplicarse, según algunas variantes del método, en diferentes subzonas o mezclarse en una zona o en varias subzonas. En una etapa posterior, se aplica una muestra de líquido corporal que opcionalmente está apropiadamente pretratada y/o diluida, en la zona receptora de la tira reactiva. Pueden incluirse los reactivos apropiados para la visualización de los autoanticuerpos, que están unidos a los antígenos, en la zona del antígeno o en la zona receptora, o en ambas. Alternativamente, la tira reactiva con los autoanticuerpos unidos puede incubarse posteriormente en la etapa de unión con los reactivos para la visualización. Las etapas de detección, tales como la visualización, se miden con o sin herramientas analíticas tales como lector de imágenes que produce un resultado digitalizado. En algunas aplicaciones preferidas, un factor de ponderación asignado a los antígenos individuales para su contribución al resultado del diagnóstico es introducido, por ejemplo, mediante la aplicación de diferentes cantidades de antígeno a la zona del antígeno de la tira reactiva o mediante la adición diferencial de los reactivos químicos o mediante la ponderación diferencial de las señales desencadenadas por los anticuerpos unidos a los antígenos individuales. Obviamente, algunas de las características y de las combinaciones con características, que se describen más arriba para las realizaciones del método que usa las micromatrices, también son igualmente aplicables a las realizaciones preferidas de las tiras reactivas de flujo lateral.

Algunas realizaciones preferidas adicionales de las tiras reactivas de flujo lateral están diseñadas para estar en contacto directamente con un paciente con la zona receptora de la tira reactiva, para recoger un líquido corporal tal como lágrimas. Las zonas receptoras similares para la recolección de los líquidos corporales también son parte de otras realizaciones del elemento portador del antígeno, tal como los chips microfluidos o las columnas con microesferas portadoras del antígeno que comprenden una zona receptora de un material adsorbente.

A partir del estado de la técnica se sabe que la ausencia de reactividad autoinmune o que una reactividad autoinmune reducida frente a ciertos antígenos también es indicativa de glaucoma. Por lo tanto, algunas realizaciones preferidas están diseñadas de forma que la ausencia o la unión reducida de los anticuerpos autoinmunes frente a los antígenos seleccionados está contribuyendo al resultado del diagnóstico o es la base de un resultado del diagnóstico. Por ejemplo, en algunas realizaciones de las tiras reactivas de flujo lateral, en una o más subzonas de antígeno se aplican los antígenos, en las que ninguna autoinmunorreactividad es indicativa de la enfermedad, mientras que en las subzonas en las que se han aplicado antígenos que desencadenan una menor reactividad autoanticuerpo en pacientes con glaucoma que en los individuos sanos, y/o con antígenos que desencadenan una mayor reactividad autoanticuerpo en pacientes con glaucoma que en los individuos sanos y/o con antígenos, en las que ninguna autoinmunorreactividad es indicativa de la ausencia de glaucoma, y variaciones favorables de las combinaciones anteriores.

En una realización preferida adicional del método de diagnóstico para el glaucoma, el elemento portador del antígeno para la en la al menos una muestra de antígenos es un chip microfluído o un dispositivo *labochip*, en el que los antígenos individuales se proporcionan preferentemente en microcanales individuales. El líquido corporal se carga en el chip microfluído, o es recibido en una zona receptora de un líquido del chip. Posteriormente, el líquido corporal se mueve hacia el sistema de microcanales del chip microfluído, por ejemplo, mediante una unidad de control de la presión. En las realizaciones preferidas, las reactividades autoinmunes son detectadas con anticuerpos secundarios etiquetados con fluorescencia y unos lectores ópticos convencionales u ordenadores convencionales equipados con una cámara, y posteriormente son cuantificados y transformados en una puntuación de glaucoma, según se describe. Las características mencionadas de otros elementos portadores del antígeno, tales como chips con micromatriz y tiras reactivas de flujo lateral, pueden combinarse con las características de los chips microfluidos para realizaciones adicionales de los elementos portadores del antígeno para los métodos y los dispositivos descritos en esta solicitud. Esto incluye chips microfluidos con subzonas para los antígenos con una mayor, y otras subzonas para los antígenos con una menor, reactividad autoinmune en los pacientes con glaucoma con respecto a los individuos sanos.



También se divulgan kits de prueba para el método de diagnóstico para el glaucoma y componentes de los kits de prueba que comprende un elemento que porta un en la al menos una muestra de muestras de antígenos oculares y opcionalmente material auxiliar. En algunas realizaciones según este aspecto, dicho kit comprende elementos portadores del antígeno que portan diferentes variaciones de una en la al menos una muestra de muestras de antígenos oculares, dependiendo del propósito de la prueba de diagnóstico. En algunas realizaciones preferidas del kit, el elemento portador del antígeno comprende antígenos oculares seleccionados entre el Grupo 1 o el Grupo 2 o el Grupo A o el Grupo A y el B o el Grupo 2-A, en los que, en algunas de estas realizaciones preferidas, las cantidades de antígenos cargadas en el elemento portador del antígeno esta ponderada. En algunas realizaciones preferidas del kit el elemento portador del antígeno, es o es parte de un portaobjetos de micromatriz, de una tira reactiva de flujo lateral o de un chip microfluidado. En algunas formas de realización adicionales de dichos kits de prueba se incluyen materiales auxiliares tales como herramientas analíticas y o un programa informático para herramientas analíticas tales como un lector de imágenes, y o se incluye un programa informático para que un lector de imágenes produzca un resultado digitalizado de los resultados de la prueba del resultado de la prueba, en los que este programa informático se usa para una o más de las etapas de cuantificación de la reactividad autoinmune medida, el cálculo de la puntuación de glaucoma o el resultado del diagnóstico. En algunas realizaciones preferidas adicionales, se incluye el material auxiliar para recoger una muestra de líquido corporal. Dicho material auxiliar es, por ejemplo, papel secante para recibir las lágrimas. Algunas realizaciones preferidas adicionales incluyen reactivos y/o recipientes de reacción para la detección y la medición de la reactividad autoinmune después de la incubación del elemento portador del antígeno con un líquido corporal o reactivos para el tratamiento de una muestra de un líquido corporal antes de la incubación con el elemento portador del antígeno o para la elución del líquido corporal desde un material adsorbente sobre el que se recogió. Cualquier combinación de las características descritas anteriormente en el contexto de los métodos para el diagnóstico del glaucoma puede combinarse para algunas realizaciones preferidas adicionales de los kits para llevar a cabo el método para el diagnóstico del glaucoma.

En algunas realizaciones preferidas adicionales del método de diagnóstico para el glaucoma, en primer lugar se seca un espécimen de líquido corporal y después se resolubiliza o se eluye antes de la reacción con el en la al menos una muestra de muestras de antígenos oculares. El espécimen de líquido corporal se recoge bien en un entorno profesional o bien en un entorno doméstico. En algunas variantes, se recoge en un trozo de material adsorbente tal como una tira de papel o directamente en la zona receptora del elemento portador del antígeno o en cualquier recipiente para la recepción del líquido corporal. El espécimen de líquido corporal se deja secar y se conserva, por ejemplo, a la temperatura ambiente. La experiencia demuestra que después de su conservación durante hasta una semana o incluso más, particularmente a una temperatura menor o si se congela, los autoanticuerpos presentes en el espécimen seco de líquido corporal pueden ser reconstituidos y eluidos desde el material adsorbente, por ejemplo, con un tampón o una solución salina fisiológica. Por lo tanto, es una ventaja de esta realización que el espécimen recogido de líquido corporal puede ser recogido, por ejemplo, por la propia paciente en casa y enviado por correo a un laboratorio para su análisis. En algunas realizaciones preferidas adicionales del método de diagnóstico para el glaucoma, el líquido corporal, que se seca y se reconstituye antes de su análisis, es lágrimas o suero sanguíneo.

En las realizaciones preferidas del método de diagnóstico para la medición la reactividad autoinmune del glaucoma en lágrimas, las lágrimas se recogen con cualquier método convencional tal como con pipetas o con una tira de papel secante tal como una tira de papel Schirmer u otro material adsorbente adecuado. Opcionalmente, las lágrimas se secan y se conservan, por ejemplo, a la temperatura ambiente durante hasta una semana o más a 0-5 °C o más cuando se congelan. Posteriormente, los autoanticuerpos son eluidos a partir de la tira de papel seca o todavía húmeda con tampón, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato. En algunas realizaciones preferidas adicionales, las lágrimas se recogen directamente en una tira reactiva de flujo lateral, por ejemplo, mediante la exposición de la zona receptora de la tira reactiva a las lágrimas del ojo. Obviamente, una ventaja de las realizaciones que usan lágrimas en lugar de, por ejemplo, suero sanguíneo, es que las muestras de lágrimas pueden obtenerse de una forma no invasiva. Esta es una ventaja en particular para los entornos en los que no hay profesionales médicos apropiadamente capacitados disponibles, tal como en algunas clínicas oftalmológicas y optometristas, así como para las pruebas domésticas.

El método de diagnóstico para el glaucoma se refiere a su uso como una prueba rápida en un cribado rutinario para la detección temprana del glaucoma antes de la pérdida de visión. Algunas realizaciones preferidas son, por ejemplo, pruebas de diagnóstico de bajo coste diseñadas para que sean muy sensibles, de forma que en un cribado rutinario se minimice la probabilidad de falsos negativos. Consecuentemente, después de un seguimiento, unas pruebas más elaboradas se basan, por ejemplo, en un gran número de antígenos oculares y están diseñadas para identificar falsos positivos entre aquellos individuos con un resultado positivo en la prueba de la prueba rápida. Por ejemplo, podría usarse una tira reactiva de flujo lateral, un chip microfluidado o un simple chip con micromatriz, según se describe en varias de las realizaciones anteriores, para dicha prueba rápida

El método de diagnóstico para el glaucoma se refiere a su aplicación para la monitorización de la progresión de la enfermedad y para la monitorización del efecto del tratamiento médico. En las realizaciones preferidas de estos aspectos, la selección de los antígenos y/o el factor de ponderación asignado a los mismos están diseñados para monitorizar la reactividad autoinmune frente a los antígenos característicos de una fase en particular de la enfermedad de glaucoma.

Se divulga un método de poner en contacto un paciente con una zona receptora de un elemento portador del antígeno para la recolección de un líquido corporal del paciente, por ejemplo, de las lágrimas de los ojos del paciente: en las realizaciones preferidas, el paciente se pone en contacto con una zona receptora de un elemento portador del antígeno que comprende un material adsorbente en el que la propia zona receptora está exenta del antígeno pero el líquido corporal fluye hacia la zona portadora del antígeno. Por ejemplo, se toca una tira reactiva con una zona receptora que comprende papel adsorbente, como una tira reactiva de Schirmers con la zona receptora, con un ojo humano para recoger las lágrimas. Posteriormente, las lágrimas difunden en la zona del antígeno, y por lo tanto están comprometidas en la etapa b del método para el diagnóstico de glaucoma.

El resultado del diagnóstico obtenido mediante el método de diagnóstico para el glaucoma en algunas realizaciones está listo para ser comprendido por un paciente o en otras realizaciones, el resultado del diagnóstico comprende uno o más valores diagnósticos que van a ser interpretados por un profesional médico.

### Breve descripción de los dibujos

**Figura 1:** aplicaciones replicadas de anti-IgG/A/M humana generadas mediante la impresión por contacto (A) y la técnica de aplicación con una base piezoeléctrica (B).

**Figura 2A:** coeficientes de variabilidad (CV) detallados para los antígenos oculares en las micromatrices de estudio.

**Figura 2 B:** desviaciones típicas (DT) detalladas para los diferentes antígenos en las micromatrices de estudio.

**Figura 3:** Comparación de los datos obtenidos a partir del tratamiento de los diferentes datos de cuatro antígenos diferentes. Se indican: los datos en bruto (A), los datos del AUC (B) y los datos de la puntuación Z (C).

**Figura 4:** perfiles de las intensidades promediadas de los antígenos para 20 antígenos incubados con suero (A) y con humor acuoso (B) de los individuos de control (CTRL) y de pacientes con un glaucoma primario de ángulo abierto (POAG).

**Figura 5:** diagrama de cajas para los anti IgG/A/M humanas de los individuos sanos de control (CTRL) y de los pacientes con glaucoma (POAG)

**Figura 6:** 6 A,B: diagramas de dispersión de las reactividades de los anticuerpos en suero y en humor acuoso. 6 C: características operativas del receptor para las muestras de suero prospectivas.

**Figura 7:** comparación intraindividual de los valores de la inmunorreactividad en suero y en humor acuoso para el grupo de control y las muestras de los POAG.

**Figura 8:** los análisis de las funciones biológicas mediante anotaciones de la GO revelaron varios términos sobrerrepresentados mediante el cálculo a través del modelo hipergeométrico para los antígenos oculares que mostraban unas diferencias significativas entre los grupos del estudio en muestras de suero.

**Figura 9:** patrón típico de anticuerpos de un paciente con glaucoma.

**Figura 10:** reproducibilidad de una semana a otra de los datos de la micromatriz

### Descripción detallada de la invención

**Ejemplo 1:** micromatrices de antígenos que comparan la autoinmunorreactividad en sueros y en humor acuoso, con unas diferencias características en los pacientes con glaucoma y en los individuos sanos:

Para el análisis de los anticuerpos se usaron los sueros y el humor acuoso de pacientes con un glaucoma primario de ángulo abierto (POAG; n = 13) y de controles sanos (CTRL; n = 13). Las matrices de proteína se prepararon mediante la aplicación de 40-100 antígenos purificados diferentes (biomarcadores conocidos) en portaobjetos recubiertos de nitrocelulosa. Las matrices se incubaron con los sueros (1:250) y con el humor acuoso (1:20) respectivamente. Para la visualización de las matrices con las reacciones anticuerpo-antígeno se trataron con un anticuerpo anti-IgG humana con una etiqueta de fluorescencia, seguido de un escaneo de la fluorescencia. Las señales emitidas por los anticuerpos secundarios se digitalizaron, y las intensidades de las aplicaciones se compararon mediante el uso de técnicas estadísticas multivariantes.

Resultados: la comparación intraindividual reveló congruencias, pero también diferencias, entre los patrones de anticuerpos de los sueros y del humor acuoso. En ambos, el humor acuoso y el suero, los pacientes con POAG mostraron un aumento en las reactividades mayor de dos veces para la  $\alpha$ -1-antitripsina y la anexina V en comparación

con los sujetos sanos ( $P < 0,001$ ). Por el contrario, la  $\beta$ -L-cristalina mostró una reactividad media significativamente aumentada (ME) en el humor acuoso (POAG: ME = 5049; DT = 1638; CTRL: ME = 2119; DT = 673;  $P < 0,01$ ) y una reactividad disminuida en los sueros ( $P < 0,01$ ) de los pacientes con POAG. Para siete antígenos, ninguno de los sujetos incluidos en el estudio mostró inmunorreactividad en el humor acuoso. Mediante el uso de un conjunto de biomarcadores, a menudo anticuerpos/antígenos de cada líquido corporal respectivamente, fuimos capaces de diferenciar entre POAG y CTRL con una especificidad y una sensibilidad de aproximadamente el 90 % (curva ROC; suero:  $r = 0,91$ ; humor acuoso:  $r = 0,93$ ) usando un algoritmo especial. Estos resultados confirman tanto las regulaciones por aumento como las regulaciones por disminución de las reactividades del anticuerpo en los sueros y en el humor acuoso de los pacientes con glaucoma. Además, el aumento en las reactividades en el humor acuoso con respecto al suero sugiere una producción local de anticuerpos en el ojo.

### Ejemplo 2: obtención de los sueros y de las muestras de humor acuoso

La obtención de las muestras se llevó a cabo según la Declaración de Helsinki de investigación biomédica que implica sujetos humanos. Se recogió sangre y humor acuoso de todos los voluntarios que proporcionaron su consentimiento informado. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1.000 g y el suero se conservó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para su análisis posterior. Las muestras de humor acuoso se conservaron a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  directamente después de la recogida. Todos los participantes fueron sometidos a un examen oftalmológico completo, incluyendo un aplanamiento de Goldmann, una tonometría, una tomografía de coherencia óptica (OCT) y una tomografía de la retina de Heidelberg (HRT), en el Departamento de Oftalmología (Universidad de Mainz, Alemania) y se clasificaron según las directrices de la European Glaucoma Society. En este estudio se incluyeron 31 pacientes, que experimentan una cirugía de cataratas, con una edad media de 73 (DT  $\pm 10$ ) y 37 pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (POAG; edad media: 67, DT  $\pm 10$ ). Los pacientes con cataratas sin ningún signo clínico de glaucoma primario o secundario ni de otras patologías oculares distintas a las cataratas, sirvieron como grupo de control (CTRL) según otros estudios 42. Los pacientes con POAG tenían una PIO  $> 21$  mm de Hg sin medicación (determinada mediante la tonometría de aplanamiento de Goldmann), los defectos de campo visual típicos (examinados mediante una perimetría, OCTOPUS 101 Perimeter; Haag-Streit, Wedel, Alemania) y una excavación del nervio óptico. Los pacientes con enfermedades autoinmunes o que padecían enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Parkinson, fueron excluidos de este estudio.

### Ejemplo 3: preparación de las micromatrices

Usamos proteínas muy purificadas adquiridas en Sigma-Aldrich (Alemania) y en BioMol (Hamburg, Alemania), como antígenos. Los antígenos se diluyeron a  $1\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$  con tampón de PBS que contiene un 1,5 % de trehalosa para unas condiciones de impresión óptimas. La aplicación de los antígenos se llevó a cabo tanto con una tecnología de impresión sin contacto (sciFLEXARRAYER S3, Scienion, Berlín, Alemania), basada en una dispensación piezoeléctrica, como con la técnica de impresión por contacto basada en pines usada habitualmente (OmniGrid100, Digilab Genomic Solutions, Ann Arbor, Estados Unidos). Los resultados se evaluaron comparativamente para analizar la morfología de las aplicaciones y la variabilidad entre las aplicaciones. Para la impresión de la totalidad del conjunto de las micromatrices de estudio se usó la técnica de aplicación con una base piezoeléctrica. Cada antígeno se aplicó por triplicado en portaobjetos de nitrocelulosa (Oncyte, portaobjetos de nitrocelulosa con 16 multi-almohadillas, Grace Bio-Labs, Bend, Estados Unidos). Como control positivo y negativo usamos anti IgG/A/M humanas de ratón ( $10\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y tampón de aplicación. El proceso de aplicación se llevó a cabo a la TA y con una humedad del 30 %. Se aplicó 1 nl de cada dilución del antígeno en la superficie de la nitrocelulosa mediante cuatro aplicaciones de 250 pl exactamente en la misma posición. La precisión del volumen de aplicación y el correcto posicionamiento de las gotitas fueron monitorizados antes y después del proceso de aplicación de cada antígeno usando el programa informático sciDrop-VOLUME y de autodetección de las gotas (Scienion, Berlín, Alemania).

Las etapas de incubación y de lavado se llevaron a cabo a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  con un agitador orbital (Titramax 100, Heidolph, Schwabach, Alemania). Los portaobjetos se cubrieron con cámaras de hibridación con marco FAST de 16 almohadillas (Whatmann, Maidstone, Reino Unido) y se bloquearon con PBS que contiene BSA al 4 % durante una hora. A continuación, los portaobjetos se lavaron tres veces con PBS que contiene Tween al 0,5 % (PBS-T). Los sueros de los pacientes se diluyeron a 1:250 en PBS, y el humor acuoso en una proporción de 1:10 en PBS. Se incubaron aleatoriamente 120  $\mu\text{l}$  de estas diluciones en portaobjetos con antígeno preparados durante una noche. Después de varias etapas de lavado con PBS-T, los portaobjetos se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con Cy-5 fluorescente (a 1:500 diluido en PBS-T, anti-IgG humana de cabra, Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Estados Unidos) durante una hora en la oscuridad. Dos etapas de lavado con PBS-T fueron seguidas por dos etapas finales de lavado con agua de calidad HPLC. Todas las micromatrices se secaron al aire antes del escaneo, usando un escáner de micromatrices (Affymetrix 428 TM Array Scanner, High Wycombe, Reino Unido). Las imágenes TIFF (Tagged Information File Format) generadas de 16-bit de los portaobjetos se analizaron usando el programa informático Spotfinder 3.1.1 (TM4, Dana-Faber Cancer Institute, Boston, Estados Unidos). La sustracción del fondo se llevó a cabo según la fórmula: intensidad de la aplicación = intensidad media SP - ((sumbkg - sumtop5bkg) / (número de pixelSP - número de pixelstop5bkg)), en la que SP representa cualquier aplicación, bkg el correspondiente fondo y top5bkg el cinco por ciento superior del pixel de fondo. El coeficiente de varianza (CV) se calculó como sigue:  $\text{CV} = \text{SDSP3}/\text{mediaSPX} \dots \text{SPn}$ , en la que SDSP3 representa la desviación típica en la totalidad de las tres réplicas de las aplicaciones de un antígeno de una muestra, y la media SPX... SPn, la media de todas las intensidades de las aplicaciones.

**Ejemplo 4:** análisis estadístico de los datos

Para proporcionar una comparación distorsionada de los resultados causados por los sesgos a través de la normalización y el tratamiento de los datos, en primer lugar contrastamos dos tipos diferentes de transformación de datos - el área bajo la curva (AUC) y la puntuación de Z - con los datos brutos. Para el análisis de los datos del estudio aplicamos la transformación de la puntuación de Z, según la fórmula: puntuación de Z = (intensidad SP - intensidad media SPI ...SPX) / S DSPX...SPn, en la que SP representa la intensidad de cualquier aplicación y SP1...SPX la intensidad global de todas las aplicaciones 46. La detección de los potenciales biomarcadores y la estimación de los cambios significativos en la reactividad del anticuerpo se lleva a cabo mediante diversas técnicas estadísticas. Para la comparación intergrupo usamos un ANOVA monofactorial y un análisis multivariante de la discriminancia (por ejemplo, distancias de Mahalanobis, raíces canónicas) para ambos materiales de la muestra por separado. En la segunda etapa, llevamos a cabo redes neurales artificiales (ANN) para la determinación de la potencia de clasificación de los patrones del autoanticuerpo de un conjunto específico de antígenos. Por lo tanto, los conjuntos de datos se dividieron aleatoriamente en dos partes con unas cantidades uniformes de pacientes por grupo. Una mitad se usó para el entrenamiento de las ANN y la segunda mitad para probar las ANN entrenadas con respecto a su potencia de clasificación. Por lo tanto, no se usó ninguna muestra incluida en los datos de entrenamiento para propósitos de clasificación. Los resultados se visualizaron mediante la representación gráfica de la sensibilidad frente a la especificidad (curva ROC). Una descripción detallada de los métodos aplicados para el análisis estadístico podría encontrarse en publicaciones previas de nuestro grupo. Para la comparación intraindividual, y con objeto de ejemplificar la proporción de niveles de anticuerpos en el humor acuoso con respecto a las correspondientes muestras de sueros, calculamos la diferencia porcentual entre ambas sobre la base de los valores del suero para cada paciente individual, seguido del cálculo del valor medio para todos los sujetos de los diferentes grupos de pacientes. Las diferencias entre los sueros y el humor acuoso mayores del 100 % se consideraban significativas. Adicionalmente, correlacionamos los datos medidos con todos los registros clínicos recogidos. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando Statistics 8.0 (StatSoft, Tulsa, AZ, Estados Unidos).

**Ejemplo 5:** análisis de la GO

Con objeto de obtener una percepción más profunda de los procesos biológicos de los antígenos con diferencias significativas entre los grupos de pacientes, usamos Cytoscape 2.6.2 junto con el plugin 50 de Bingo 2.3. Para asignar las anotaciones de ontología génica (GO) a cada antígeno, se utilizó la totalidad de la base de datos de anotaciones de la GO y como organismo/anotación se eligió Homo sapiens. El modelo hipergeométrico y la corrección de Benjamini & Hochberg False Discovery Rate ( $P < 0,05$ ) aseguró una significación de las funciones proteicas sobrerrepresentadas.

**Ejemplo 6:** esquema de un ejemplo de método para la determinación de las puntuaciones de glaucoma

En una primera etapa para la determinación de las puntuaciones de glaucoma, se calcula la diferencia porcentual entre los valores normalizados de la intensidad de las reactividades autoanticuerpo de las muestras de prueba y de una muestra de referencia. Estas diferencias porcentuales se usan como entrada de datos para el análisis de la red neural para la determinación de una puntuación de glaucoma. Dependiendo de la sensibilidad y de la especificidad requeridas en el método para el diagnóstico del glaucoma, los sueros de la etapa b) se han incubado con una de las tres opciones de ejemplos de muestras: 1) o 2) o 3) que fueron proporcionadas según la etapa a) del método de diagnóstico:

la muestra 1) comprende la totalidad de los 48 antígenos oculares purificados al menos parcialmente del Grupo 1, la muestra 2) y la muestra 3) comprenden 12 y 5 antígenos oculares purificados al menos parcialmente, respectivamente.

Como se esperaba, cuanto mayor es el número de antígenos oculares comprendido por la muestra según la etapa a), mejor es el método de diagnóstico con respecto a la sensibilidad y a la especificidad. En la muestra 3), únicamente con 5 antígenos oculares, todavía se obtuvo una sensibilidad y una especificidad de aproximadamente el 90 %.

Adicionalmente, a los antígenos individuales comprendidos en las muestras 1, 2 y 3 se les asignaron diferentes factores de ponderación para el cálculo de la puntuación de glaucoma, de forma que los antígenos muy ponderados (por ejemplo, los antígenos del grupo A) tengan un mayor impacto sobre la puntuación de glaucoma.

Las puntuaciones de glaucoma que difieren de un valor de referencia definido - por ejemplo, que exceden un valor umbral definido - identifican aquellas muestras de prueba en las que el líquido corporal se recogió de un paciente con glaucoma.

**Valores de la intensidad normalizados a partir de las reactividades autoanticuerpo**

**Cálculo de la diferencia porcentual en los valores de la intensidad de los valores de referencia mediante la**

**fórmula:**

$$\% \text{ de diferencia} = \frac{(\text{valor de la intensidad}_{\text{paciente}} - \text{valor de la intensidad}_{\text{referencia}}) * 100}{|\text{valor de la intensidad}_{\text{referencia}}|}$$

**Puntuación de glaucoma**

5 **Evaluación de una puntuación de glaucoma usando un algoritmo de red neural con las diferencias porcentuales calculadas como entrada de datos:**

10 **1) Puntuación basada en todos los antígenos probados**

**Sensibilidad: 96 %**  
**Especificidad: 97 %**

15 **2) Puntuación basada en un subconjunto de 12 antígenos probados que incluyen:**

MBP, GST, HSP27, inhibidor de la cinasa de proteína C, GFAP, Jo-1, ubiquitina, actina, beta-S cristalina, HSP70, dismutasa de superóxido, transtiretina

20 **Sensibilidad: 92 %**  
**Especificidad: 94 %**

**3) Puntuación basada en un subconjunto de 5 antígenos probados que incluyen:**

HSP70, actina, beta-S cristalina, HSP27, GFAP

25 **Sensibilidad: 91 %**  
**Especificidad: 88 %**

30 **Según su impacto sobre el diagnóstico del glaucoma, y teniendo en consideración los datos del análisis estadístico, tales como la prueba *post-hoc* o el análisis de la discriminancia, los antígenos se subdividen en tres grupos diferentes con diferentes ponderaciones para el cálculo de la puntuación de glaucoma. Los antígenos que muestran una diferencia muy importante entre los grupos son asignados al grupo A, los antígenos con una diferencia importante son asignados al grupo B y los antígenos con una diferencia notable entre los grupos son asignados al grupo C:**

35 **Grupo A (muy altamente relevantes):**

40 actina, alfa-1-antitripsina, anexina V, alfa-A cristalina, alfa-B cristalina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma cristalina, α-fodrina (= espectrina), proteína ácida fibrilar glial GFAP, glutatión-S-transferasa, HSP27, HSP60, HSP70, Jo-1, proteína de unión a la mielina MBP, enolasa específica de neurona NSE, inhibidor de la cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, transferrina, transtiretina, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vimentina

45 **Grupo B (muy relevantes):**

anexina I-IV, receptor adrenérgico beta 2, calreticulina, proteína de choque térmico HSP10, insulina, dismutasa de superóxido, cinasa de proteína C, alfa-sinucleína, gamma-sinucleína

50 **Grupo C (antígenos relevantes):**

albúmina, factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF, cardioplipina, topoisomerasa de ADN 1, fibronectina, lisozima, glicoproteína de mielina de oligodendrocitos MOG, mioglobina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5,3-fosfoserina, tireoglobulina, inhibidor de la topoisomerasa

55 **Los antígenos que revelan una relevancia muy alta para el diagnóstico del glaucoma tienen una ponderación mayor que los antígenos del grupo B o C, lo que da como resultado un mayor impacto sobre la puntuación de glaucoma. Los antígenos con una relevancia alta tienen una ponderación mayor que los antígenos del grupo C, lo que da como resultado un impacto medio sobre la puntuación de glaucoma. Los antígenos relevantes tienen el impacto más pequeño sobre la puntuación de glaucoma evaluada.**



**Los sujetos que superan un umbral definido son diagnosticados como pacientes con glaucoma**

**Figura 1:** se muestran tres réplicas de aplicaciones de anti-IgG/A/M humanas generadas mediante una impresión por contacto (A) y la técnica de aplicación con base piezoeléctrica (B). Las cifras representan las respectivas intensidades medias de pixel por aplicación. A: la intensidad media para todas las aplicaciones es de 7.173,32 +/- 1.473,27 unidades. El coeficiente de variabilidad (CV) es de 0,21. B: La intensidad media es de 11.716 +/- 374,78 unidades. El CV es de 0,03.

Se compararon dos tecnologías de aplicación diferentes con objeto de encontrar la mejor metodología para la aplicación específica de proteínas con diferentes características físicas de una forma reproducible. Un método usado habitualmente para describir la variación en las intensidades de las aplicaciones entre todas las réplicas de aplicaciones es la determinación del coeficiente de varianza 45. Mediante el uso de la tecnología de impresión por contacto basada en pines, conseguimos un CV mediano de 0,32 en tres réplicas de aplicaciones técnicas para todos los antígenos. La morfología y la intensidad de la aplicación varía entre las réplicas de las aplicaciones, según se muestra en la figura 1 A. Por el contrario, las micromatrices con las aplicaciones realizadas mediante la técnica de aplicación sin contacto con base piezoeléctrica mostraron una variabilidad más de 10 veces menor entre las aplicaciones (CV mediano = 0,029) y una constancia mucho mejor en la morfología de la aplicación (figura 1 B). Estos hallazgos son coherentes con los datos obtenidos a partir del programa informático sciDrop-VOLUME y de autodetección de las gotas. El programa informático detectó una variación en el volumen de la gota únicamente del 0,8 % (equivalente a 2 pl de una gotita de 250 pl) en todos los antígenos. Consecuentemente, se eligió la tecnología de impresión sin contacto para la impresión de la totalidad del conjunto de los portaobjetos de micromatriz del estudio, con el fin de garantizar la aplicación de unos volúmenes exactamente iguales de las soluciones del antígeno. De una forma similar a la estimación del CV para la validación de las tecnologías de aplicación, calculamos el coeficiente mediano de la varianza para las réplicas de aplicaciones técnicas de las micromatrices del estudio. Estas micromatrices mostraron un CV mediano de 0,031 con una desviación típica de 0,061 (para la distribución de los CV de los antígenos individuales, véase la figura 2.A), mientras que la desviación típica mediana de las intensidades medidas con las réplicas de aplicaciones en todas las muestras varía entre 44 y 480, dependiendo del antígeno y de sus intensidades medias de aplicación (véase la figura 2.B).

**Figura 2 A y Figura 2 B:** la Fig. 2A representa los coeficientes de variabilidad (CV) de los datos en bruto, detallados para cada antígeno de las micromatrices del estudio. El eje x representa los diferentes antígenos, y el eje y los valores del CV. El CV mediano en todos los antígenos es de 0,031 +/- 0,061. La Fig. 2B muestra las desviaciones típicas (DT) de los datos en bruto, detalladas para los diferentes antígenos de las micromatrices del estudio. El eje x representa los diferentes antígenos, y el eje y los valores de las desviaciones típicas (DT).

Para la caracterización de los anticuerpos de los pacientes del estudio y de los individuos de prueba, la comparación del diferente algoritmo de normalización de datos revela que la transformación de la puntuación de Z es más aplicable a nuestra metodología debido a su bajo sesgo sobre las proporciones entre los grupos del estudio (figura 3) y la posibilidad de comparar las mediciones de una forma cuantitativa en todos los diferentes experimentos y pruebas de glaucoma.

**Figura 3:** comparación de los datos obtenidos a partir de diferentes tratamientos de datos para cuatro antígenos diferentes. Se indican: los datos en bruto (A), los datos del AUC (B) y los datos de la puntuación Z (C).

Pudimos detectar complejos patrones de reactividad de anticuerpo en todos los pacientes del estudio, y múltiples diferencias entre los pacientes con glaucoma y los sujetos de control, tanto en los sueros como en el humor acuoso (Fig. 4 A y B). No encontramos ninguna correlación entre el nivel de IgG/A/M y la edad o el género de los pacientes, y no hallamos diferencias significativas en los niveles de IgG/A/M de los grupos del estudio, ni en los sueros (P > 0,9, Fig. 5 A) ni en el humor acuoso (P > 0,6, Fig. 5 B).

**Figura 4:** perfiles de las intensidades medias de anticuerpo para el suero (A) y el humor acuoso (B). Se muestran las intensidades medias de los sujetos de control (CTRL) y de los pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (POAG), para 20 antígenos. El patrón de línea representa los grupos de pacientes (rojo = POAG, azul = CTRL), el eje X representa un subconjunto de 20 anticuerpos que mostró las diferencias más importantes entre los grupos, y el eje Y representa el valor de las puntuaciones de Z computadas.

**Figura 5:** se muestran los valores determinados para las anti-IgG/A/M humanas en forma de un gráfico de cajas. El eje X representa los diferentes grupos (grupo de control (CON); grupo con glaucoma (POAG)) y el eje y las intensidades medidas y normalizadas (puntuación de Z). No pudo detectarse ninguna diferencia significativa entre ambos grupos (P > 0,05) ni en los sueros (5A) ni en el humor acuoso (5B).

En los sueros, los pacientes con POAG mostraron varias inmunorreactividades aumentadas en comparación con los sujetos de CTRL, pero revelaron algunas reactividades disminuidas también (Fig. 4A). Como se muestra, la HSP27, la HSP70, la proteína básica de mielina (MBP) o la anexina V mostraron unas elevadas reactividades de anticuerpo en los pacientes con POAG en comparación con el grupo de control. Para otros antígenos, tales como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) o la ubiquitina, los pacientes con POAG mostraron unas reactividades más bajas de

anticuerpo que los sujetos sanos. Se encontraron unas intensidades infrecuentes o muy pequeñas, incluso no detectables, para la mioglobina, la glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG) y la topoisomerasa de ADN 1. El ANOVA monofactorial y el análisis multivariante de la discriminancia no solo reveló una diferencia significativa entre las reactividades de anticuerpo totales en los sueros de los pacientes con POAG y de los controles sanos ( $P < 0,002$ ), sino también una diferencia estadísticamente significativa para varios antígenos individuales. Por ejemplo, los pacientes con POAG mostraron una actividad significativamente aumentada frente a la MBP ( $P < 0,0028$ ), la HSP27 ( $P < 0,019$ ), la HSP70 ( $P < 0,0033$ ) o la  $\alpha$ -fodrina ( $P < 0,0027$ ) (tabla 3.). Observamos unas reactividades del anticuerpo significativamente disminuidas para la GFAP ( $P < 0,001$ ), la ubiquitina ( $P < 0,0038$ ) y la  $\beta$ -L-cristalina ( $P < 0,03$ ).

En el contexto de una potencial utilización de las reactividades autoanticuerpo como una herramienta diagnóstica para el glaucoma, probamos su potencia de clasificación mediante la aplicación de redes neurales artificiales (ANN). El entrenamiento de la red se llevó a cabo usando un subconjunto de pacientes (CTRL N = 18, POAG N = 17), y los datos de las nueve reactividades séricas anticuerpo-antígeno más significativas (14-3-3, alfa-1-antitripsina, beta-L-cristalina, GFAP, HSP 27, HSP 70, MBP, alfa-fodrina, ubiquitina). Posteriormente, la red entrenada se aplicó a muestras de suero desconocidas. Los valores de salida de las ANN personalizadas para cada paciente, que muestran la clasificación del grupo a través de las ANN, se usaron como una puntuación combinada de anticuerpo (CTRL  $> 0,5$ , POAG  $< 0,5$ ). Las puntuaciones de anticuerpo calculadas a partir de las muestras de los conjuntos de datos de entrenamiento con suero revelaron una fuerte correlación positiva con las puntuaciones computadas a partir de las muestras de humor acuoso de los mismos pacientes ( $R < 0,74$ ,  $P < 0,001$ , Fig. 6A). También, para las muestras prospectivas (CTRL N = 13, POAG N = 20; datos de la prueba), no incluidas en el conjunto de datos de entrenamiento, detectamos una correlación entre las puntuaciones de anticuerpo en el suero y en el humor acuoso ( $R < 0,72$ ,  $P < 0,001$ , Fig. 6B). Mediante el uso de las puntuaciones de anticuerpo calculadas para la clasificación de los pacientes, únicamente un sujeto (CTRL) fue incorrectamente clasificado como sujeto con POAG por la puntuación de anticuerpo en el suero y en el humor acuoso (Fig. 6B). La fuerte correlación positiva de las puntuaciones calculadas a partir de ambos tipos de muestras subraya las diferencias menores entre las inmunorreactividades del suero y del humor acuoso detectadas a través de la comparación intraindividual. La sensibilidad y la especificidad para una discriminación prospectiva del glaucoma y de los sujetos de control era del 93 % (Fig. 6C; AUC  $r = 0,93$ ).

**Figura 6: A, B:** diagramas de dispersión de las reactividades de anticuerpo en el suero y en el humor acuoso. El eje X muestra los valores de las puntuaciones de anticuerpo en suero, en el eje Y los valores de las muestras de humor acuoso. Cada punto representa un paciente individual (puntos azules = POAG, puntos rojos = CTRL). **A:** diagrama de dispersión de las muestras incluidas en el conjunto de datos de entrenamiento ( $R = 0,74$ ), **B:** diagrama de dispersión de todas las muestras del estudio ( $R = 0,72$ ). **C:** características operativas del receptor para las muestras de suero prospectivas (eje X: 1-especificidad, eje Y: sensibilidad,  $r = 0,93$ ).

El análisis de las muestras de humor acuoso mostró asimismo numerosas diferencias entre los grupos de estudio (Fig. 4B). Pero, al contrario que las muestras de suero, únicamente aparecieron unas pocas reactividades disminuidas. La mayoría de los antígenos, como la MBP, la HSP70, la anexina V o la glutatión-S-transferasa, reveló un aumento en las reactividades para el grupo con POAG, y numerosas de éstas son acordes con las muestras de suero. Para otras, como la cadena B de la insulina o la MOG, pudieron detectarse unas reactividades de anticuerpo infrecuentes en el humor acuoso, y parcialmente estos son los mismos antígenos que mostraron unas raras reactividades en suero (por ejemplo, la MOG o la topoisomerasa de ADN 1, tabla 3.) También, el análisis estadístico fortalece el aspecto de las similitudes entre ambos tipos de muestras. Los datos así obtenidos mostraron, por ejemplo, un  $P < 0,022$  para la MBP y un  $P < 0,03$  para la anexina V en el humor acuoso - ambos antígenos muestran también unos valores significativamente aumentados en los sueros de los pacientes con POAG. Coincidiendo con el menor número de diferencias estadísticas significativas univariantes entre los sujetos con POAG y los de CTRL, la potencia de clasificación determinada de las muestras de humor acuoso era menor (curva ROC; AUC  $r = 0,7$ ) que la de una de las muestras de suero.

**Figura 7:** comparación intraindividual entre las inmunorreactividades del suero y del humor acuoso. Los antígenos están indicados en el eje X. El eje Y representa la puntuación medida de los valores de Z. Las barras por encima de la línea cero representan las mayores inmunorreactividades en el humor acuoso, las barras por debajo de la línea cero representan las mayores intensidades en el suero. Se muestran los resultados para las muestras del grupo de control y de POAG. Globalmente puede observarse que únicamente unos pocos antígenos muestran unas diferencias en las inmunorreactividades mayores del 100 % (= aumento 2 de veces).

La comparación intraindividual de las inmunorreactividades de las muestras de suero con las de las correspondientes muestras de humor acuoso reveló únicamente unas pocas diferencias significativas. Con respecto a los sujetos de CTRL pudieron observarse unos niveles significativamente mayores de reactividades de anticuerpo en suero (por ejemplo, la MBP, la HSP60, la GFAP), en comparación con las correspondientes muestras de humor acuoso, así como unas inmunorreactividades significativamente mayores en el humor acuoso (por ejemplo, la  $\alpha$ -1-antitripsina). Pero en su totalidad, más del 80 % de los antígenos probados reveló unas inmunorreactividades prácticamente similares en los sueros y en el humor acuoso de los sujetos de control. Los pacientes con POAG también revelaron algunas diferencias significativas entre los sueros y el humor acuoso. Por ejemplo, la albúmina y la  $\alpha$ -1-antitripsina mostraron unas inmunorreactividades mayores en las muestras de suero, y en el último caso esto es contrario a las muestras de control, que mostraron una mayor inmunorreactividad para la  $\alpha$ -1-antitripsina en el humor acuoso. Las muestras del

humor acuoso del grupo con glaucoma revelaron asimismo unas reactividades de anticuerpo un poco mayores en comparación con las correspondientes muestras de suero (por ejemplo, fibronectina, transtiretina). Pero, al igual que con el grupo de control, únicamente aparecieron unas pocas diferencias significativas entre las inmunorreactividades del suero y las del humor acuoso en el grupo con glaucoma, y más del 80 % de los antígenos probados reveló unos patrones de anticuerpo prácticamente congruentes.

**Figura 8:** los análisis de las funciones biológicas mediante anotaciones de la GO revelaron numerosos términos sobrerrepresentados. El cálculo a través del modelo hipergeométrico para los antígenos mostró unas diferencias significativas entre los grupos del estudio en las muestras de suero. En el eje x se muestran las cantidades de proteínas atribuidas a los diferentes grupos funcionales. Los grupos funcionales están indicados en el eje y. Las barras azules representan los antígenos con una mayor inmunorreactividad en los sujetos con POAG, las barras rojas representan los antígenos con una menor inmunorreactividad en los pacientes con glaucoma. Los asteriscos marcan los grupos funcionales, que también podían encontrarse en el humor acuoso.

De forma interesante, los términos como respuesta al estrés, citoesqueleto, tráfico de vesículas y apoptosis están significativamente sobrerrepresentados (figura 8). Los términos como citoesqueleto o tráfico de vesículas están fuertemente relacionados con los procesos neurológicos, y otros como la respuesta al estrés o la apoptosis deben ser considerados junto con las enfermedades neurodegenerativas.

**Figura 9:** A: patrón típico de un autoanticuerpo de un paciente con glaucoma. Las proteínas de las lágrimas se eluyeron a partir de una tira de Schirmer seca fig. mediante el uso de solución salina tamponada con fosfato, seguido de la incubación de la muestra en una micromatriz de proteína. B) Curva característica de la operativa del receptor (curva ROC). Se usaron los patrones de autoanticuerpo de lágrima de los pacientes con glaucoma y de los sujetos sanos para el entrenamiento de una red neural artificial con respecto al reconocimiento del patrón de los pacientes con glaucoma. El eje y representa la sensibilidad, y el eje x la 1-especificidad. Mediante el uso de estos patrones de autoanticuerpo, pudo conseguirse una especificidad y una sensibilidad > 90 % (área bajo la curva:  $r = 0,93$ ).

**Figura 10:** variabilidad de una semana a otra de los datos de la micromatriz. Se incubó un suero convencional durante siete semanas consecutivas, seguido del cálculo de los coeficientes de la varianza (CV). Se representa el CV para diversos antígenos diferentes (barras negras), incluyendo la desviación típica.

Mediante el uso de la metodología de la micromatriz de proteína pudimos confirmar diferencias en las reactividades de anticuerpo en los sueros y en el humor acuoso de los pacientes con glaucoma, como se sabe en la materia. Adicionalmente, averiguamos que numerosos antígenos nuevos, tales la  $\alpha$ -1-antitripsina o la anexina V, tienen un impacto en el glaucoma. En comparación con los sujetos de control, detectamos unas inmunorreactividades significativamente aumentadas en los sueros y en el humor acuoso de los pacientes con POAG, así como unas reactividades significativamente disminuidas en los sueros de los sujetos con glaucoma. Para numerosos antígenos, por ejemplo, la anexina V, la chaperonina, la HSP27, la HSP60, la HSP70 o la MBP, pudimos observar los mismos tipos de diferencias entre los grupos de pacientes en las muestras de humor acuoso y de suero de los pacientes con glaucoma - lo que proporciona una primera pista sobre las similitudes entre ambos tipos de muestras. En general, las diferencias entre los sujetos de control y los pacientes con glaucoma parecían ser menores en las muestras de humor acuoso, en las que únicamente pudieron detectarse ocho diferencias significativas univariantes entre ambos grupos, en contraste con las once diferencias significativas en las muestras de suero. La comparación intraindividual del humor acuoso y de los sueros reveló que únicamente unos pocos antígenos, por ejemplo, la MBP, la GFAP o la  $\alpha$ -1-antitripsina, mostraban unas inmunorreactividades significativamente diferentes entre ambos tipos de muestras de los sujetos de control. También, en las muestras de los sujetos con glaucoma, pocos antígenos, por ejemplo, la albúmina o la transtiretina, mostraron unas diferencias estadísticas significativas entre los patrones de inmunorreactividad de ambos líquidos corporales. En comparación con las muestras de suero, la transtiretina mostró una mayor reactividad autoanticuerpo en el humor acuoso de los pacientes con POAG, un resultado que es muy interesante, teniendo en consideración al hecho de que unas mayores cantidades de la propia transtiretina podían encontrarse en el humor acuoso de los pacientes con POAG. En su totalidad, más del 80 % de las reactividades antígeno-anticuerpo revelaron ser congruentes en ambos líquidos, tanto en los sujetos sanos como en los pacientes con POAG. Este resultado indica que las inmunorreactividades en un líquido ocular como el humor acuoso, que está en estrecho contacto con la retina - el lugar de la patogenia del glaucoma -, no son mucho más diferentes de las inmunorreactividades sistémicas en los sueros, en términos de anticuerpos. Por lo tanto, este hallazgo subraya la especificidad de los cambios detectados en los patrones de anticuerpos del suero de los pacientes con glaucoma, y puede ser importante también para otras enfermedades oculares.



## REIVINDICACIONES

## 1. Un método para el diagnóstico del glaucoma que comprende las etapas de:

- 5 (a) proporcionar al menos dos muestras que comprenden al menos un antígeno ocular purificado al menos parcialmente, proporcionando así conjuntamente al menos dos antígenos oculares purificados al menos parcialmente  
o proporcionar al menos una muestra que comprende al menos dos antígenos oculares purificados al menos parcialmente, en el que los al menos dos antígenos oculares purificados al menos parcialmente se seleccionan  
10 entre un Grupo 1 de antígenos oculares que comprende los siguientes antígenos oculares: actina, albúmina, alfa-1-antitripsina, anexina I-IV, anexina V, receptor adrenérgico beta 2, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), calreticulina, cardiolipina, alfa-A cristalina, alfa-B cristalina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma cristalina, topoisomerasa de ADN 1, fibronectina,  $\alpha$ -fodrina (= espectrina), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutatión-S-transferasa, proteína de choque térmico HSP10 (= chaperonina), HSP27, HSP60, HSP70, insulina, jo-1, lisozima,  
15 proteína de unión a la mielina (MBP), glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), mioglobina, enolasa específica de neurona (NSE), neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5, dismutasa de superóxido, 3-fosfoserina, prealbúmina, inhibidor de la cinasa de proteína C, cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, alfa-sinucleína, gamma-sinucleína, tireoglobulina, transferrina, transtiretina, inhibidor de la topoisomerasa, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vimentina,  
20 (b) poner en contacto un líquido corporal con la muestra o las muestras proporcionadas en la etapa a) que comprenden al menos dos antígenos oculares purificados al menos parcialmente,  
(c) detectar y/o cuantificar las reacciones de la etapa b) entre los autoanticuerpos del líquido corporal y los al menos dos antígenos oculares purificados parcialmente en la muestra o las muestras para la determinación de un valor de la reactividad autoinmune,  
25 (d) comparar los valores medidos de la reactividad autoinmune con los datos convencionales obtenidos a partir de pacientes con glaucoma y opcionalmente adicionalmente de individuos sanos, para la determinación de una puntuación de glaucoma y  
(e) opcionalmente determinar un resultado del diagnóstico mediante la evaluación de la puntuación de glaucoma.

- 30 2. El método para el diagnóstico del glaucoma según la reivindicación 1, en el que en al menos una de las etapas a) - e) se asigna un factor de ponderación que modela la contribución al resultado del diagnóstico de la reactividad autoinmune frente a al menos uno de los antígenos oculares, en el que en particular, el al menos un factor de ponderación es asignado a al menos una de las muestras de antígeno ocular mediante un algoritmo aplicado durante al menos una de las etapas (c), (d), (e) u / o en el que se introduce al menos un factor de ponderación en las cantidades  
35 ponderadas de los antígenos individuales oculares proporcionados para la reacción con el líquido corporal o se pondera la cantidad de líquido corporal proporcionada para la reacción.

- 40 3. El método para el diagnóstico del glaucoma según la reivindicación 1 o 2, en el que un antígeno ocular parcialmente purificado comprende dicho antígeno ocular en una cantidad de al menos el 70 % por peso de la proteína total.

4. El método para el diagnóstico del glaucoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que al menos 2 antígenos oculares se seleccionan entre el Grupo A de antígenos oculares: actina, alfa-1-antitripsina, anexina V, alfa-A cristalina, alfa-B cristalina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma cristalina,  $\alpha$ -fodrina (= espectrina), proteína ácida fibrilar glial (GFAP), glutatión-S-transferasa, HSP27, HSP60, HSP70, jo-1, proteína de unión a la mielina (MBP),  
45 enolasa específica de neurona (NSE), inhibidor de la cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, transferrina, transtiretina, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), vimentina, o en el que la al menos una muestra de antígenos oculares comprende al menos dos antígenos seleccionados entre el Grupo A y/o entre el Grupo B que comprende los siguientes 9 antígenos oculares adicionales: anexina I-IV, receptor adrenérgico beta 2, calreticulina, proteína de choque térmico HSP10 (= chaperonina), insulina, dismutasa de peróxido, cinasa de proteína C, alfa-sinucleína, gamma-sinucleína.  
50

5. El método para el diagnóstico del glaucoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que al menos una muestra comprende al menos 1 antígeno ocular al menos parcialmente purificado de los siguientes antígenos oculares del Grupo 2: albúmina, anexina I-IV, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), calreticulina,  
55 cardiolipina, beta-S cristalina, gamma cristalina, topoisomerasa de ADN 1, fibronectina, insulina, jo-1, lisozima, glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), mioglobina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5, dismutasa de superóxido, 3-fosfoserina, prealbúmina, inhibidor de la cinasa de proteína C, cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, alfa-sinucleína, tireoglobulina, transferrina, transtiretina, inhibidor de la topoisomerasa, ubiquitina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).  
60

6. El método para el diagnóstico del glaucoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que al menos una muestra de antígenos oculares purificados al menos parcialmente comprende al menos 1 de los siguientes antígenos oculares albúmina, alfa-1-antitripsina, anexina I-IV, anexina V, factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), calreticulina, cardiolipina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma cristalina, topoisomerasa de ADN 1,  
65 fibronectina, proteína de choque térmico HSP10 (= chaperonina), insulina, jo-1, lisozima, glicoproteína de mielina de oligodendrocitos (MOG), mioglobina, neurotrofina 3, neurotrofina 4, neurotrofina 5, dismutasa de superóxido, 3-

fosfoserina, prealbúmina, inhibidor de la cinasa de proteína C, cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, alfa-sinucleína, tireoglobulina, transferrina, inhibidor de la topoisomerasa, ubiquitina.

5 **7.** El método para el diagnóstico del glaucoma según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en el que las al menos dos muestras de antígenos oculares purificados al menos parcialmente comprenden al menos 1 de los siguientes antígenos oculares: alfa-1-antitripsina, anexina I-IV, anexina V, calreticulina, beta-L cristalina, beta-S cristalina, gamma cristalina, proteína de choque térmico HSP10 (= chaperonina), insulina, jo-1, mielina, dismutasa de superóxido, prealbúmina, inhibidor de la cinasa de proteína C, cinasa de proteína C, dismutasa de superóxido, alfa-sinucleína, transferrina, transtiretina, ubiquitina.

10 **8.** El método según una cualquiera de la reivindicación 1 a 7, en el que la muestra o las muestras que comprenden al menos dos antígenos oculares purificados parcialmente están portadas sobre un elemento portador del antígeno, y en particular en el que el líquido corporal se hace reaccionar con los antígenos en un chip con micromatriz, en una tira reactiva de flujo lateral, en un chip microfluidado o en otro ensayo basado en fluidos o en microesferas.

15 **9.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en el que se portan menos de 10 antígenos oculares sobre un elemento portador del antígeno.

20 **10.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el líquido corporal son lágrimas, y / o en el que el líquido corporal se recoge, se seca y opcionalmente se conserva, y posteriormente se reconstituye para su uso en la etapa b.

Figura 1:

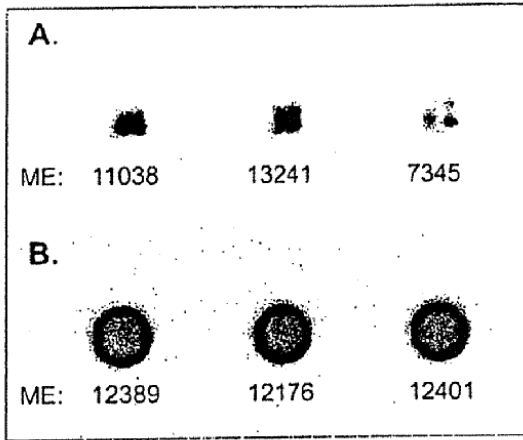


Figura 2A y Figura 2B:

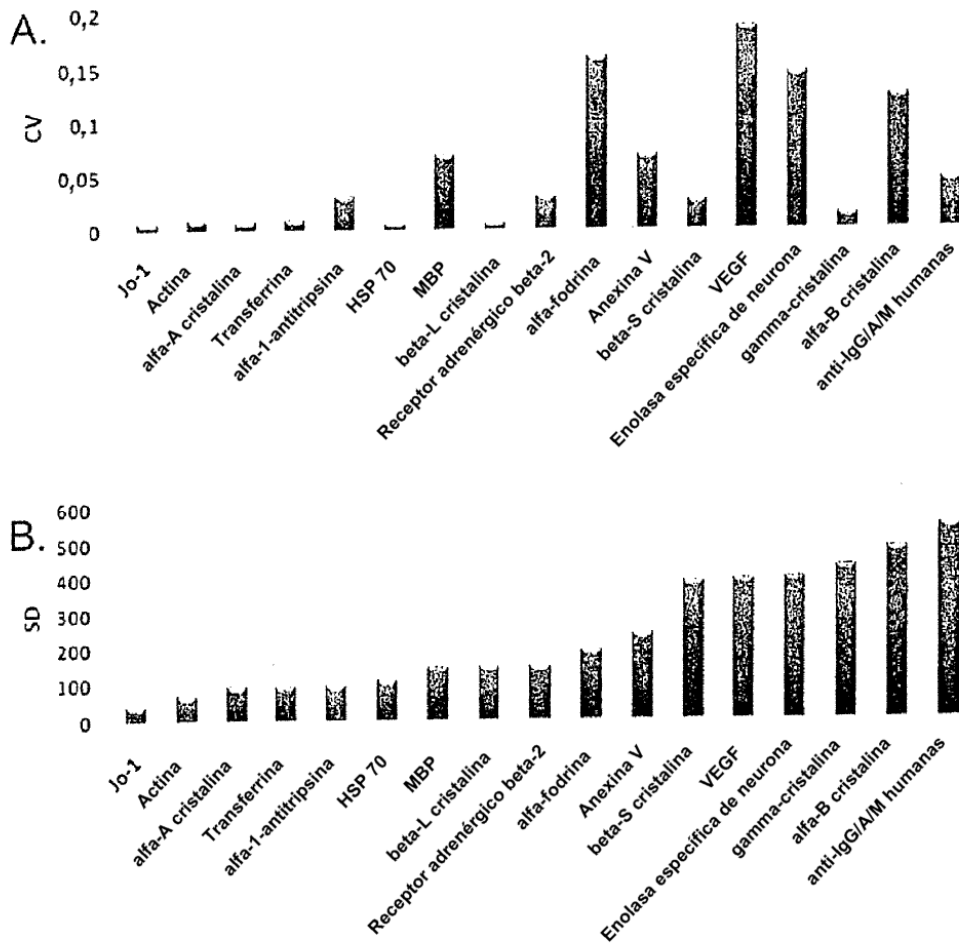


Figura 3:

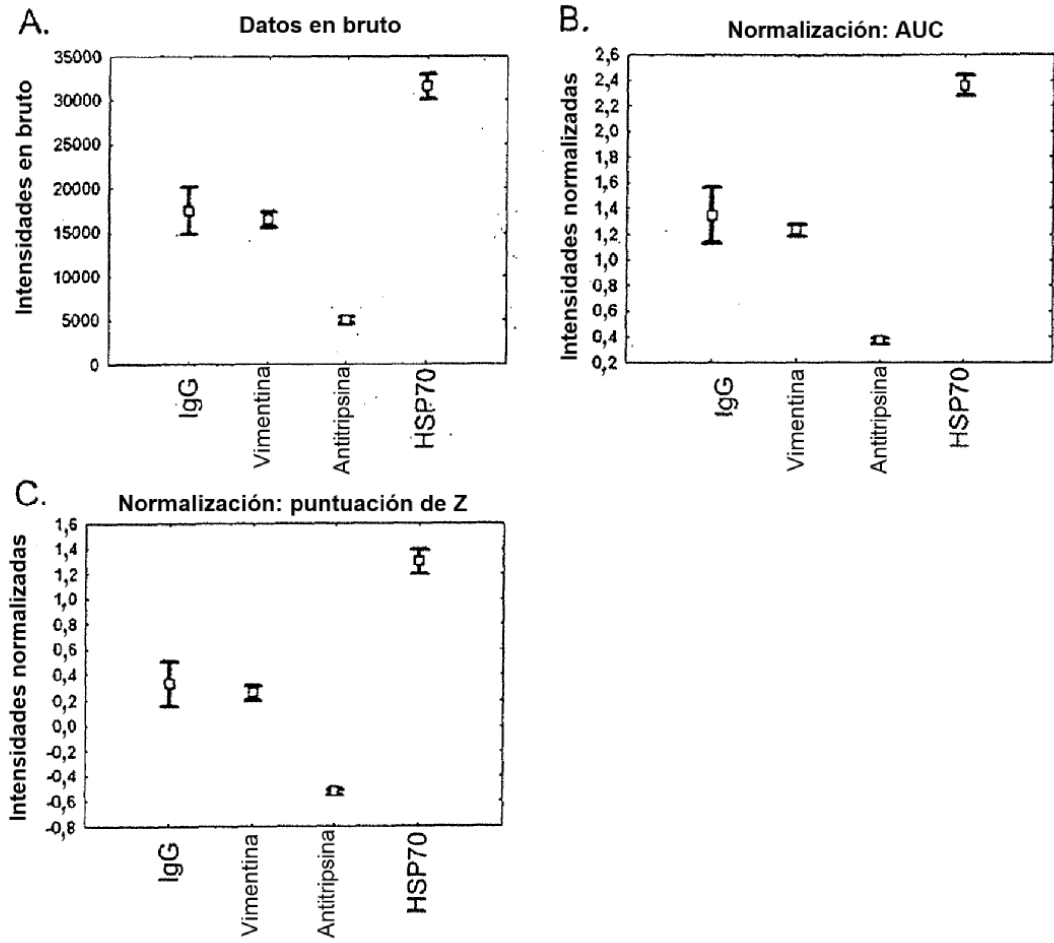


Figura 5:

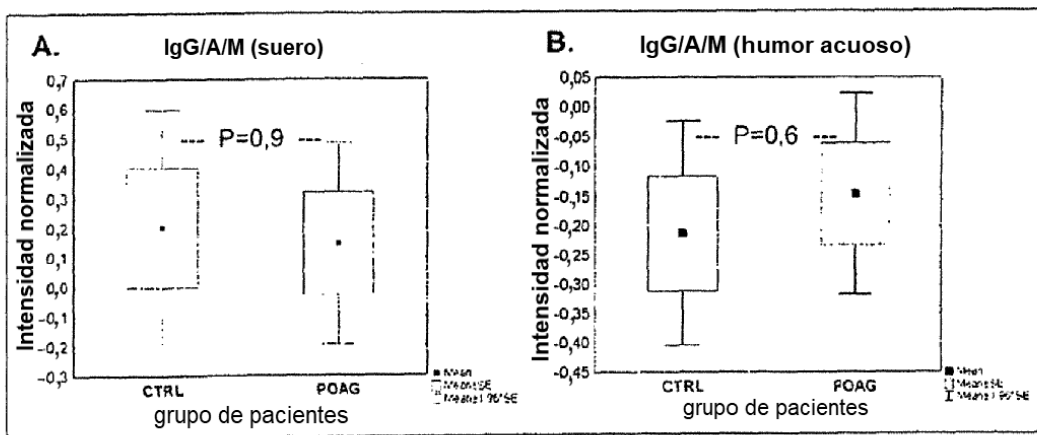


Figura 4A:

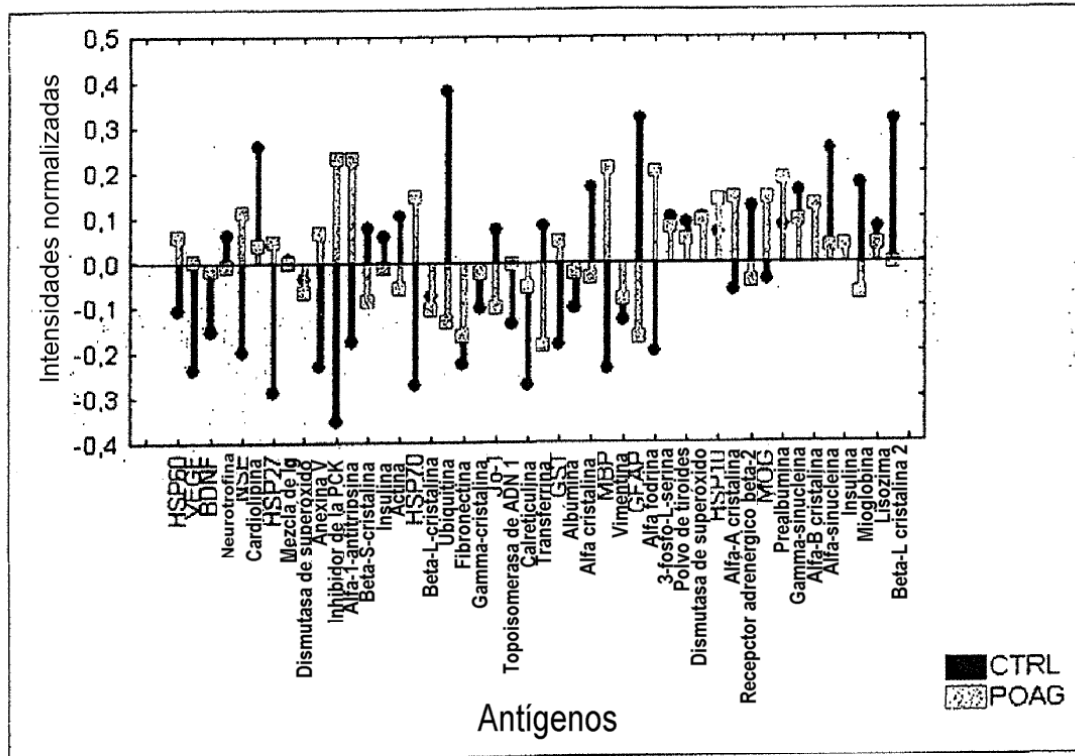


Figura 4B:

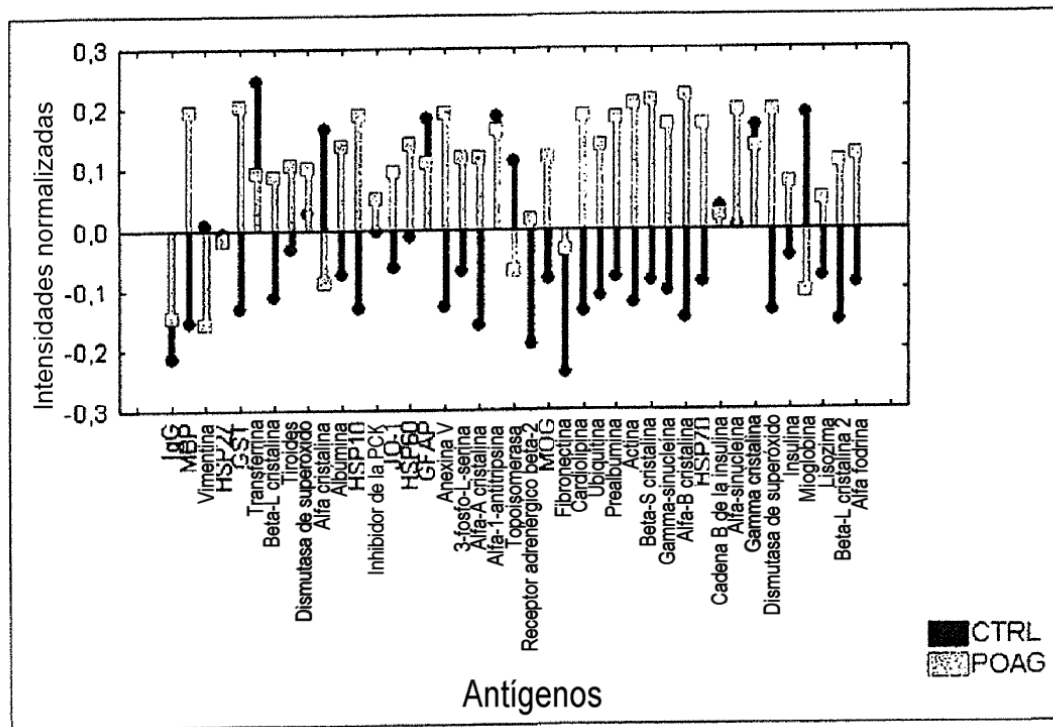


Figura 6 A, B, C:

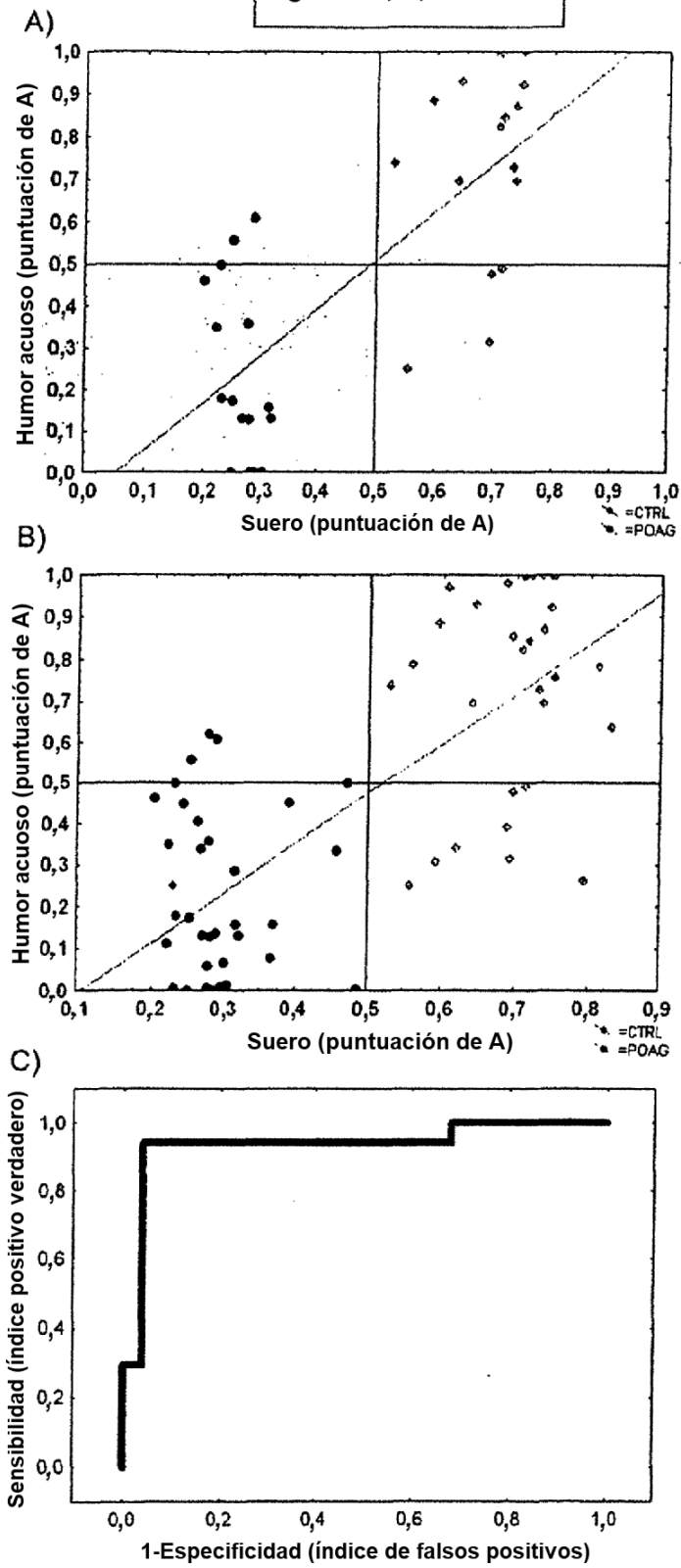


Figura 7:

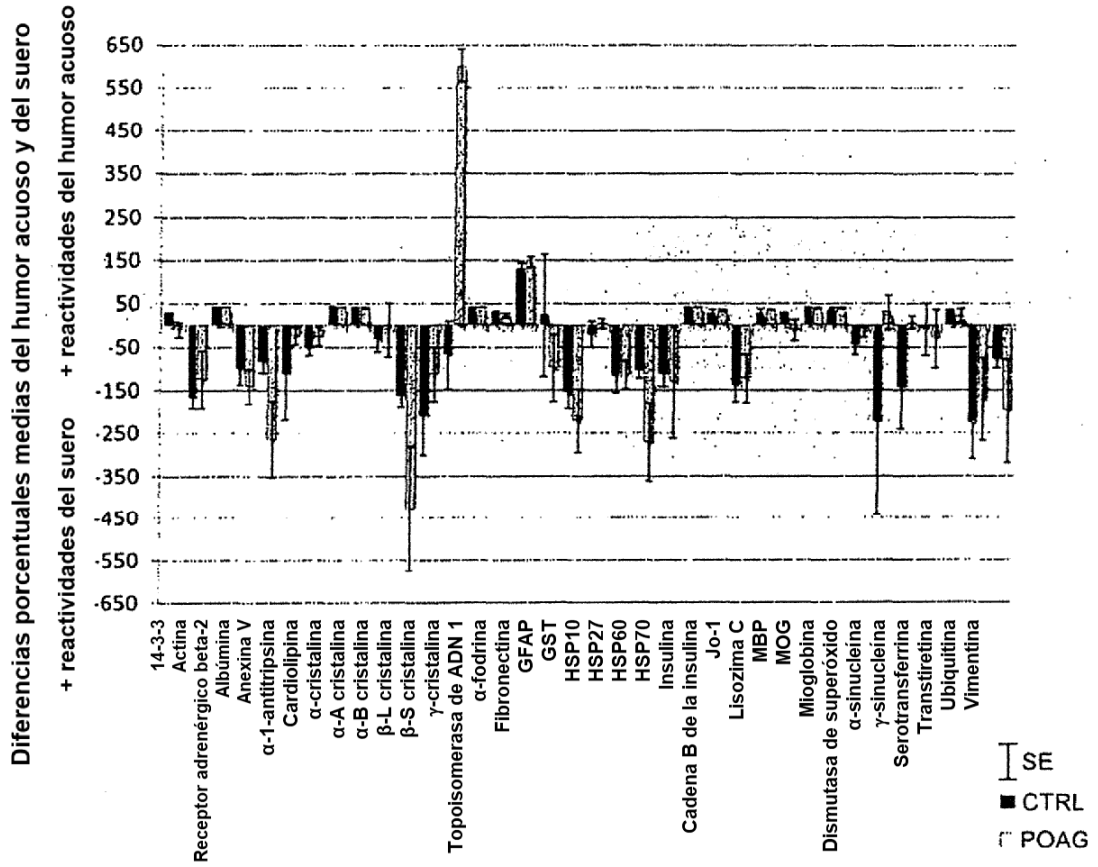


Figura 8:

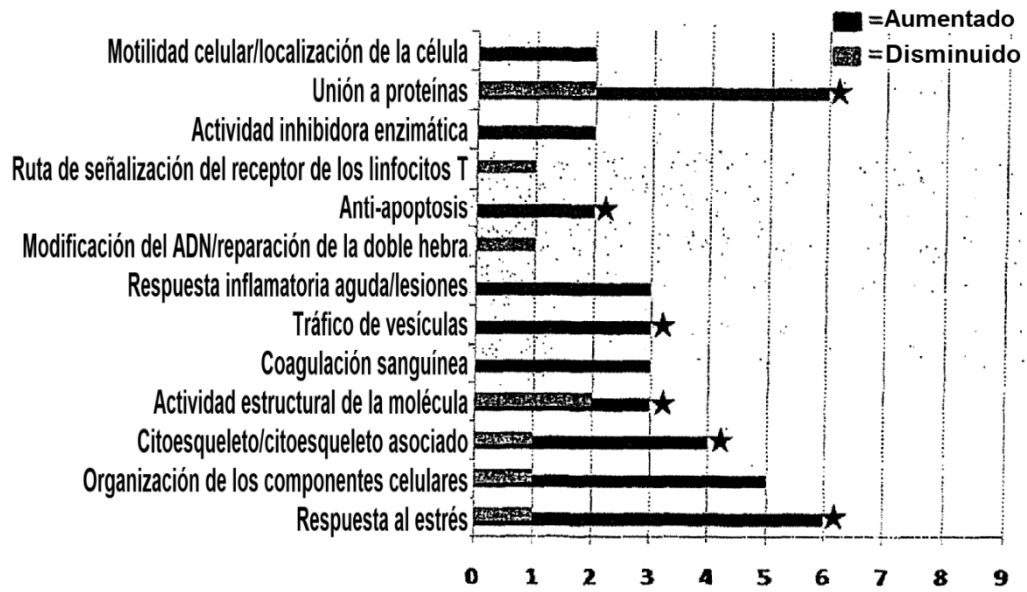




Figura 9:

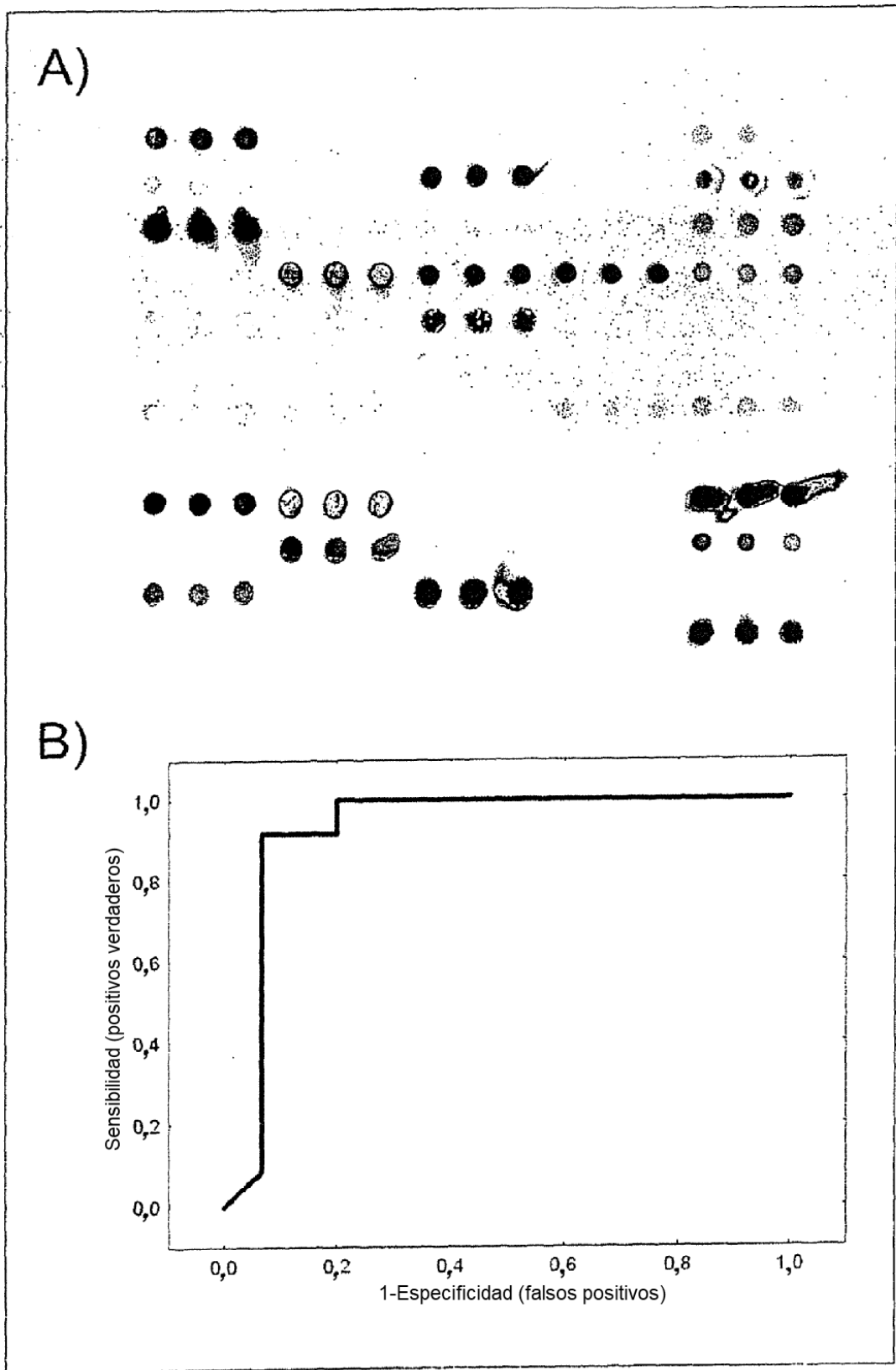


Figura 10:

