

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 901**

21 Número de solicitud: 201800166

51 Int. Cl.:

G01N 33/497 (2006.01)

A61B 5/08 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

25.07.2018

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.01.2020

71 Solicitantes:

**FUNDACION DE INVESTIGACION BIOMEDICA
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LA
PRINCESA (100.0%)
C/ Diego de León, 62 - 1ª Planta
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**LUQUERO BUENO, Sergio;
MATEO JIMÉNEZ, Gloria;
CURBELO GARCÍA, José Juan;
ASPA MARCO, Javier;
GALVÁN ROMÁN, Jose María;
ORTEGA GÓMEZ, Mara;
GÓMEZ GUTIÉRREZ, Manuel y
VEGA PIRIS, Lorena**

54 Título: **Nuevo método de concentración de muestras obtenidas mediante la técnica de condensado del aire exhalado**

57 Resumen:

La presente invención constituye un nuevo método de concentración de muestras obtenidas mediante la técnica de condensado del aire exhalado: se encuadra principalmente en el campo de los biomarcadores en aire exhalado para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de patologías pulmonares, ampliándose a su utilización en patologías sistémicas dadas las virtudes de la técnica de obtención y concentración de la muestra.

En particular, se centra en un método para concentrar el condensado de aire exhalado, obtención de muestras reproducibles para su análisis y detección de biomarcadores.

ES 2 738 901 A1

DESCRIPCIÓN

Nuevo método de concentración de muestras obtenidas mediante la técnica de condensado del aire exhalado.

5

Sector de la técnica

La presente invención se encuadra principalmente en el campo de los biomarcadores en aire exhalado para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de patologías pulmonares, ampliándose a su utilización en patologías sistémicas dadas las virtudes de la técnica de obtención y concentración de la muestra.

10

En particular, se centra en un método para concentrar el condensado de aire exhalado, obtención de muestras reproducibles para su análisis y detección de biomarcadores.

15

Antecedentes de la invención

La técnica del condensado de aire exhalado está normalizada desde hace años para el análisis de la inflamación en pacientes con asma y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Además de varias revisiones internacionales publicadas, la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR) publicó ya en el año 2005 los parámetros para su realización y los criterios de calidad de la muestra. (Condensado exhalado Yolanda Torralba, Raúl Galera, Eduardo López-Collazo y Francisco García- Río. En Manuales SEPAR de procedimientos, vol. 31: "Inflamometría en asma y cómo medir la inflamación bronquial" Copyright 2015 SEPAR. ISBN, 84-7989-152). Sin querer ser exhaustivos, ha sido publicada recientemente una puesta al día de los estándares: "European Respiratory Society technical standard: exhaled biomarkers in lung disease", Eur Respir J 2017; 49: 1600965, en este trabajo se pone de manifiesto que hasta el momento actual no hay publicado ningún sistema valido para concentrar la muestra, lo cual dada la escasa concentración de los biomarcadores a estudiar presenta un reto.

20

25

30

La búsqueda de muestras no invasivas, que permitan la determinación de biomarcadores locales ha llevado a explorar otras fuentes de obtención de muestras.

35

40

45

El análisis del condensado del aire exhalado (Exhaled Breath Condensate, EBC en los sucesivos) es un método no invasivo desarrollado recientemente para detectar biomarcadores relacionados con diversas patologías pulmonares. A los pacientes se les aplica una pinza nasal y se les invita a respirar pausadamente durante 10-20 minutos a través de una boquilla especial con una trampa salival y una válvula de paso único conectada, desviando el flujo de aire exhalado a través de un tubo de polipropileno o teflón dentro de un recipiente de enfriamiento. Allí, el exhalado en forma de gotitas se convierte en EBC. En síntesis, tres son los componentes que pueden ser identificados en el EBC: compuestos orgánicos inertes, propios del intercambio gaseoso alveolar (CO₂, O₂, NO), compuestos orgánicos volátiles, disueltos en la fracción líquida (hidrocarburos, derivados del nitrógeno, del oxígeno o del azufre), y compuestos orgánicos no volátiles de tamaño variable que se aerosolizan desde el fluido de revestimiento de las vías respiratorias. Estos últimos se encuentran en muy pequeñas concentraciones pero parecen ser fiel testigo de lo que sucede a nivel de la vía aérea inferior. El EBC ha sido usado en la investigación sobre los efectos del tabaco, en pacientes con asma y EPOC, y en fibrosis pulmonar.

50

Esta técnica se ha usado ampliamente con éxito a lo largo de los últimos años para caracterizar la expresión de biomarcadores asociados a estas patologías. Tal es su grado de desarrollo que cuenta con una revista indexada que sirve como vehículo de comunicación para los clínicos e investigadores interesados: Journal of Breath Research (JBR), indexada con factor de impacto (JCR) desde 2010. El comité editorial de esta revista establece: " This journal is dedicated to all

aspects of breath Science, with the major focus on analysis of exhaled breath in physiology and medicine, and the diagnosis and treatment of breath odours."

5 Sí es cierto que el uso de esta técnica es relativamente novedoso en la investigación en cáncer de pulmón. Sin embargo, dado su gran interés como fuente no invasiva de marcadores de tejido pulmonar, su uso se está extendiendo en los últimos años con resultados cada vez más prometedores. Aunque con una estrategia de búsqueda en PUB MED: exhaled breath condensate AND lung cáncer], tan sólo aparecen 103 artículos, se ha producido un notable incremento en los últimos años.

10 El biofluido obtenido mediante la técnica del condensado del aire exhalado está muy diluido, de forma que en muchos casos está por debajo del límite de sensibilidad para la detección de biomarcadores, especialmente en el caso de la determinación de material genético.

15 No existe, hasta el momento actual ningún método validado y estandarizado para la concentración del biofluido obtenido mediante la condensación del aire exhalado. No obstante vamos a citar aquellas patentes del estado de la técnica que más se aproximan a nuestra invención.

20 La solicitud de patente **12/797,000** (Paul Wesley Davenport) describe un método de concentración basado en un oscilador de gran frecuencia acoplado al circuito que recoge el concentrado del exhalado del paciente.

25 La solicitud **PCT/ES2015/070887** (Servicio Andaluz de Salud y Universidad de Córdoba) propone diferentes sistemas para obtener una normalización específica frente a proteínas típicas del exhalado con expresión constante independientemente del estado patológico y poder ser aplicado en la detección de diferentes proteínas relacionadas con el cáncer de pulmón.

30 Finalmente, en la **P201630628** (Servicio Andaluz de Salud y Universidad de Córdoba) se reivindica un panel de MicroARNs como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer de pulmón, fundamentalmente sobre muestras obtenidas mediante condensado del aire exhalado.

Explicación de la invención y realización preferente de la invención

35 La presente invención describe un sistema para la concentración de condensado procedente de la recolección de aire exhalado, así como su procesamiento y almacenamiento, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección de biomarcadores predictores presentes en este tipo de muestra biológica.

40 Un **primer aspecto de la invención** se refiere a la concentración de las muestras líquidas resultantes de la condensación del aire exhalado como solución a las deficiencias asociadas al uso de los kits comerciales que existen actualmente en el mercado de detección de moléculas de interés; orientados a la determinación de presencia o concentraciones de analitos existentes en suero, plasma, sangre periférica total o medio enriquecido de cultivo celular y que distan en proporción a las presentes en EBC (99.9% del volumen de condensado de aire exhalado es vapor condensado). El análisis de biomarcadores en el EBC sin concentrar podrían resultar como indetectables debido a esa deficiencia en la sensibilidad en su uso en muestra de condensado de aire exhalado, no cuantificando la presencia de moléculas potencialmente presentes a bajas concentraciones y utilizables para el diagnóstico, pronóstico, categorización o predicción de patologías en el ámbito sanitario.

50 Definido biomarcador como cualquier componente de naturaleza orgánica tales como proteínas, glúcidos, lípidos y ácidos nucleicos o de naturaleza inorgánica presente en el

condensado exhalado y que tenga potencialidad para ser utilizado como indicador de un estado biológico asociable a condición normal o patológica.

5 De esta forma la invención incrementa la sensibilidad de la detección y medida de sustancias presentes en el pulmón. En una realización preferida de este aspecto de la invención, asociables a patologías pulmonares tales como cáncer de pulmón, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma o fibrosis quística e igualmente utilizables para otras patologías sistémicas, pero evaluables mediante el análisis del condensado exhalado dada la falta de efectos secundarios asociados a esta técnica de muestreo fácil en contraste con técnicas
10 intervencionistas más agresivas o extracciones.

En un **segundo aspecto** de la presente invención se refiere a la concentración del condensado exhalado que se estructura dentro del método de procesamiento secuencial del aire exhalado mediante una serie de fases que comprenden su condensación a muestra líquida,
15 procesamiento, almacenamiento y su concentración para la aplicación de distintas técnicas analíticas en la detección y/o cuantificación de biomarcadores.

Un **tercer aspecto** de la invención se refiere al método de obtención del exhalado, utilizado como muestra origen; y formado por compuestos orgánicos inertes, compuestos orgánicos volátiles, disueltos en la fracción líquida, y compuestos orgánicos no volátiles de tamaño variable que se aerosolizan desde el fluido de revestimiento de las vías respiratorias, dentro de la que se encuentran las moléculas en suspensión que pueden constituir marcadores de patología, estrés oxidativo, inflamación, etc.
20

En una realización más preferida de este aspecto el aire exhalado es captado mediante una técnica no invasiva fundamentada en la respiración tranquila del sujeto vía oral mediante la aplicación de una pinza en nariz a través de un sistema de enfriamiento de ese aire exhalado. La respiración se produce mediante el uso de una boquilla que posee una trampa salival y válvula para la circulación aérea en un solo sentido, el aire exhalado es proyectado dentro un
25 recipiente o cubeta de enfriamiento donde el aire exhalado forma microgotas de condensación, que tras la recolección se convierten en el condensado de aire exhalado.
30

En otra realización más preferida de este aspecto dicho sistema puede ir asociado a un espirómetro que mida las variables vinculadas al volumen respiratorio durante el tiempo de recogida y que nos aporte información adicional sobre la técnica y condiciones de la recolección del condensado.
35

En otra realización preferida de este aspecto la obtención de la muestra se puede obtener por fracciones, realizando un procesamiento diferencial de la misma dependiente de las técnicas de detección a analizar. Permitiendo la recolección fraccionada de EBC de diferentes áreas del tracto respiratorio en varios compartimentos independientes, por lo que se puede descartar la fracción del condensado que para una técnica concreta no tenga relevancia clínica, como podría ser la proveniente de laringe, faringe y boca.
40

El lugar donde realicemos la prueba con los sujetos debe ser confortable y tranquilo, donde se pueda realizar una monitorización de la temperatura para evitar desviaciones relevantes y disponer en todo momento del asesoramiento y monitorización de personal del equipo que resuelva cualquier duda o incidencia que se pueda presentar y deberán evitar incidencias sobre la exhalación como que el sujeto haya realizado actividad física extraordinaria previa a la recolección, comida copiosa o haber fumado en las dos horas anteriores.
45
50

Se evitará excesiva salivación, expectoración, estornudos, habla o tos en el sujeto informando sobre la desconexión del recolector en estos casos, para proseguir con la recolección una vez reestabilizado.

Un **cuarto aspecto** de la invención se refiere al método de procesamiento y almacenamiento mediante la recolección de las muestras en condiciones de esterilidad y mantenimiento de las muestras refrigeradas durante todo el proceso.

- 5 En una realización preferida de este aspecto se recomendaría el uso de una cabina de seguridad biológica para preservar los condensados sin contaminación externa durante el procesamiento y el alicuotado o fraccionamiento en los tubos estériles para el almacenamiento a los volúmenes optimizados para su posterior concentración y técnica analítica.
- 10 En otra realización preferida de este aspecto se optimizarían los volúmenes de muestra almacenada a los tiempos y estabilidad de ratios de evaporación durante el proceso de concentración posterior y pilar de esta invención, con, por ejemplo, la estandarización de los condensados almacenados a un volumen de 500uL.
- 15 Existiría la posibilidad de procesamiento de las muestras de exhalado durante el tratamiento o postconcentración para adecuación específica dirigida de la muestra a las moléculas a determinar, como preservación de material genético o eliminación de proteínas asociables a fracción superior respiratoria.
- 20 Un **quinto aspecto** de la invención se refiere al método de almacenamiento de EBC en congeladores a -80°C de temperatura, dada la pluripotencialidad de la muestra lograda por la preservación en esas condiciones, que la hace viable a largo plazo para técnicas de inmunoensayo, enzimáticas, espectrofotometría, fluorimetría, etc.
- 25 Un **sexto aspecto** de la invención se refiere al método de concentración en vacío centrífugo con control de temperatura del condensado de aire exhalado. Esta técnica tradicionalmente se ha utilizado para la eliminación de disolventes químicos, producción de fármacos, secado de ADN o eliminación de componentes alcohólicos en la concentración del condensado exhalado.
- 30 El uso combinado de la técnica de centrifugación, vacío y calor optimiza la eliminación de la fase acuosa del condensado concentrando la muestra sin poner el peligro su integridad. Tradicionalmente la técnica utilizada sería la evaporación de la muestra líquida mediante la aplicación de elevadas temperaturas durante tiempos prolongados, pudiendo provocar la desnaturalización de potenciales biomarcadores y limitando el rendimiento del laboratorio; otra
- 35 técnica alternativa abordable sería la congelación de la muestra para su posterior sublimación a presión reducida mediante liofilización.

La concentración centrífuga en vacío con temperatura controlada, aspecto principal de esta invención, ofrece la obtención de concentrado de condensado exhalado para la detección de biomarcadores. La muestra de condensado exhalado es sometida a una centrifugación con vacío a una temperatura en un rango de 30° a 60°C. Mediante la centrifugación en vacío con temperatura el condensado exhalado se va concentrando a niveles lo suficientemente altos para la detección de biomarcadores.

45 La concentración de la muestra se va controlando mediante la medición de los volúmenes de muestra de condensado exhalado durante el proceso de concentración. A partir de la reducción de al menos 8 veces del volumen inicial se detectan posibles biomarcadores en la muestra de condensado exhalado.

50 Un **séptimo aspecto** de la invención se refiere a la aplicación y resultados asociados al uso de la metodología y concentrado motivo de la invención. El aire exhalado constituye la muestra más accesible para el estudio de biomarcadores obtenidos del aparato respiratorio. Aportando información adicional a otras técnicas como el esputo inducido o el lavado broncoalveolar, presentando ventajas sobre éstas como su buena capacidad de repetición, su carácter no

invasivo, la ausencia de efectos secundarios y la posibilidad de obtener muestras consecutivas en cortos espacios de tiempo.

5 En general, las muestras del EBC son recogidas con tres objetivos principales: conocer los mecanismos patológicos de las enfermedades de las vías respiratorias, identificar la composición del fluido de revestimiento de las vías respiratorias y reconocer posibles marcadores específicos de las distintas enfermedades de las vías respiratorias, no limitándose su uso exclusivo a dichos objetivos sino ampliándose hasta la detección de biomarcadores de patologías sistémicas.

10 Se conoce la presencia de los siguientes biomarcadores en condensado de aire exhalado, asociados a expresión diferencial en varias patologías pulmonares, así:

15 En asma se ha determinado: valores de pH, H2O2, LTs, Cys-LTs, Cys-LTs, LTE4, 8-Isoprostane, PGE2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, INF- γ , RANTES, MIP1 α , MIP1 β , TNF- α , TGF- α , ET- β , Cytokeratine 1, MDA, ADMA, CCL11, hs-CRP, sICAM-1.

20 Para valorar los efectos del tabaco sobre las vías aéreas, se han determinado: pH, H2O2, Isoprostane, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TNF- α , INF- γ , Nitratos, LTB4, Conductividad eléctrica y cadenas β de la Flemoglobina.

25 En EPOC: pH, H2O2, Aldehidos (MDA, hexanal, heptanal), 8-Isoprostane, LTB4, LTE4, Cys-LTs, PGE2, PGF2, AAT, MMP-9, TIMP-1, Inflamación neutrofílica (IL-1 β , IL-12, IL-1a, IL-1 β , IL-2, IL-12a, IL-1 β , IL-6, IL-12 β , IL-15, IL-8, IL-10, INF- α , INF- γ , IL-12, TNF- α , TNF- α , C3, NCA, GRO- α), α 1-antitrypsin, SP-A1, SP-A2, S-100 calgranulins, IL-1 α , lysozyme-C, sHLA-1, sCD95, SLP-1, MPO.

30 En Cáncer de pulmón: H2O2, Marcadores inflamatorios (IL-2, IL-6, NSCLC, IL-17, TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , sICAM-1, Leptinas, ET-1, VEGF, bFGF, COX 2, survivin, MMP-9, GRTP-1, CCL28, MIP-3, GRO- α , Eotaxin-2, Eotaxin-3, FGF-6, FGF, IL-10, Marcadores tumorales (CEA, SCC type, NSE), Análisis genómico: Somatic mutations of p53, [170] Microsatellite DNA inestabilidad y pérdida de "heterozygosity", 3p chromosome (locus D3S2338, D3S1266, D3S1304, D3S1289) Detectados en in pacientes con NSCLC , : 3p chromosome (locus D3S1289) .Microsatellite DNA instability y perdida de heterozygosity:, 3p chromosome (locus D3S2338), ERCC1 y ERCC2 genes (chromosome 19q), miRNA-21, miRNA-486, KRAS mutation in codon 12 , Methylation of DAPK, PAX5 β , and p16 genes.

40 Todos estos estudios preliminares avalan la potencialidad del uso del aire exhalado en la determinación de biomarcadores para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de 5 patologías y avalan la importancia de la concentración estandarizada de las muestras de condensado exhalado para el incremento de sensibilidad en la detección y estudio de biomarcadores obtenidos del aparato respiratorio y su aplicación en la actividad científica y rutina clínica.

REIVINDICACIONES

1. Método para concentración de las muestras líquidas resultantes de la condensación del aire exhalado que comprende la ejecución de las siguientes fases:
5
- a) La obtención del exhalado se obtiene mediante respiración del sujeto en una boquilla que posee una trampa salival y válvula para la circulación aérea en un solo sentido.
- b) El aire exhalado es proyectado dentro un recipiente o cubeta de enfriamiento donde el aire exhalado forma microgotas de condensación, que tras la recolección se convierten en el condensado de aire exhalado.
10
- c) El aire exhalado se almacena en una cabina de seguridad biológica.
- d) El exhalado concentrado se almacena en congeladores a -80°C de temperatura.
15
- e) La concentración del exhalado se realiza mediante centrifugación en vacío con un rango de temperatura comprendido entre 30°C - 60°C .
- f) La concentración ha de ser ejecutada un mínimo de 8 veces.
20
2. Método según las reivindicaciones anteriores en la que la concentración de la muestra se va controlando mediante la medición de los volúmenes de muestra de condensado exhalado durante el proceso de concentración.
25
3. Método en el que el sistema de la fase de captación puede ir asociado a un espirómetro.
4. Método según las reivindicaciones anteriores en la que la obtención de la muestra se puede obtener por fracciones.
30
5. Método según las reivindicaciones anteriores cuya aplicación es obtener biomarcadores en aire exhalado para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de patologías pulmonares.
35
6. Método según las reivindicaciones anteriores cuya aplicación es obtener biomarcadores en aire exhalado para el diagnóstico, clasificación y seguimiento de patologías sistémicas.
7. Método según las reivindicaciones anteriores en los que los biomarcadores pueden ser proteínas.
40
8. Método según las reivindicaciones anteriores en los que los biomarcadores pueden ser glúcidos.
45
9. Método según las reivindicaciones anteriores en los que los biomarcadores pueden ser lípidos.
10. Método según las reivindicaciones anteriores en los que los biomarcadores pueden ser ácidos nucleicos.
50



21 N.º solicitud: 201800166

22 Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2018

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: **G01N33/497** (2006.01)
A61B5/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	TUFVESSON et al. "Methodological improvements for measuring eicosanoids and cytokines in exhaled breath condensate". RESPIRATORY MEDI, 20060101 BAILLIERE TINDALL, LONDON, GB. , 01/01/2006, Vol. 100, Nº 1, Páginas 34 - 38, ISSN 0954-6111, <DOI: doi:10.1016/j.rmed.2005.04.007> (apartados "EBC collection", Analytical procedure" y "Discussion")	1-10
A	HORVATH I et al. "Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions". European Respiratory Journal SEP 2005. , 31/08/2005, Vol. 26, Nº 3, Páginas 523-548, ISSN 0903-1936(print) ISSN 1399-3003(electronic), <DOI: doi:10.1183/09031936.05.00029705> (apartado "Detection limit of the assay techniques, simple concentration")	1-10
A	WALLACE M ARIEL GEER et al. "Evolution of clinical and environmental health applications of exhaled breath research: Review of methods and instrumentation for gas-phase, condensate, and aerosols." Analytica chimica acta Netherlands 18 Sep 2018. , publicación on-line 09/02/2018, Vol. 1024, Páginas 18 - 38, ISSN 1873-4324 (Electronic), <DOI: doi:10.1016/j.aca.2018.01.069 pubmed: 29776545> (apartados 4.4. y 8.)	1-10

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
10.05.2019

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

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

G01N, A61B

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, XPESP, Compendex/EI, y Bases de Datos TXT