

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 893 261**

21 Número de solicitud: 202030806

51 Int. Cl.:

G01N 33/49 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

G01N 27/447 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

30.07.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

08.02.2022

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (66.0%)

Plaza de San Diego, s/n

28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES y

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A

DISTANCIA (UNED) (34.0%)

72 Inventor/es:

ESCARPA MIGUEL, Jesús Alberto;

SIERRA GÓMEZ, Tania y

GONZÁLEZ CREVILLÉN, Agustín

54 Título: **Procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina y equipo electroquímico para llevar a cabo dicho procedimiento**

57 Resumen:

Procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina y equipo electroquímico para llevar a cabo dicho procedimiento.

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) en una muestra aislada de un sujeto que comprende las etapas de: contactar la muestra con un complejo de Os (VI) para formar un aducto Tf-complejo Os (VI); purificar el aducto formado en la etapa anterior y realizar una medida electroquímica para obtener un indicador del grado de glicosilación de la Tf. La presente invención también se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento y a un equipo de medida para realizar la medida electroquímica.

ES 2 893 261 A1

DESCRIPCIÓN**Procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina y equipo electroquímico para llevar a cabo dicho procedimiento**

5

La presente invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) y su aplicación en el diagnóstico y seguimiento clínico de enfermedades basadas en la alteración de la glicosilación de dicha glicoproteína. La invención también se refiere al equipo electroquímico para llevar a cabo dicho procedimiento.

10

La presente invención se podría encuadrar en el campo de la medicina, particularmente para la detección de enfermedades, así como en el sector de la química analítica y, especialmente, en dispositivos electroquímicos.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Transferrina (Tf) es la glicoproteína más abundante en el suero humano y una de las más importantes en el transporte de hierro. Tiene un peso molecular entre 70-95 KDa y un punto isoeléctrico entre 5.2-5.6. La principal glicofoma de la transferrina presente en el suero contiene dos N-glicanos con un total de cuatro ácidos siálicos, y es conocida como tetrasialo (pI 5.4), pero también existen otras glicofomas que varían en el número de grupos siálicos; disialo (pI 5.7), trisialo (pI 5.6), pentasialo (pI 5.2) o hexasialo (pI 5.0), y que también están presentes en el suero humano en una concentración menor (F. Bortolotti, D. Sorio, A. Bertaso, F. Tagliaro, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 147:2-12).

20

25

Sin embargo, bajo ciertos estados patológicos o debido a defectos genéticos, la cantidad de glicanos en la transferrina sérica es menor de lo habitual y se conoce como transferrina deficiente en carbohidratos (CDT). La CDT es un biomarcador empleado en la detección de los defectos congénitos de la glicosilación (CDG), que es un tipo de enfermedad rara (M Van. Scherpenzeel, E. Willems, DJ. Lefeber, *Glycoconj. J.*, 2016, 33:2-1345-3582), en la pérdida de líquido cefalorraquídeo (P. Rudolph, JE. Meyer, JA. Werner, BM. Lippert, S. Maune. *Clin. Chem*, 2005, 51:1704-1710) o en el abuso crónico

30

de alcohol (M. Stumpe, C. Miller, NS. Moton, G. Bell, DG. Watson, *J Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.*,2006, 831:81-84).

5 Dentro de los defectos congénitos de la glicosilación encontramos una gran familia de trastornos autosómicos recesivos, en su mayoría multisistémicos. Aquellos debidos a una modificación en la N-glicosilación son los más comunes y se pueden clasificar en dos tipos dependiendo de en qué etapa de la glicosilación se produzca el defecto. Así se puede hablar de CDG-I, cuando se refiere a aquellos defectos producidos en el ensamblaje de la cadena de oligosacáridos ligados a lípidos y su transferencia a la
10 proteína; o CDG-II, referida a los defectos producidos en el proceso posterior de unión de glicanos a la proteína (Z. Albahri, E. Marklová. *Clin. Chim. Acta* ,2007, 385:6-20).

El método de cribado más utilizado para el diagnóstico de esta enfermedad es la determinación de las glicofomas de transferrina. Los pacientes con CDG muestran una
15 disminución de la tetrasialo-Tf glicofoma y un aumento de especies con menos grupos siálicos. Los perfiles anormales de transferrina permiten clasificar como CDG tipo I o tipo II, dependiendo de si las glicofomas asialo- y diasialo-Tf (CDG-I) se incrementan o si también se incrementan las glicofomas monosialo- y trisialo-Tf (CDG-II) (M. Van Scherpenzeel, E. Willems, DJ. Lefeber. *Glycoconj. J.*,2016, 33:345-358).

20 Por otro lado, en los individuos que consumen una excesiva cantidad de alcohol durante largos periodos de tiempo, la cantidad de transferrina con menor glicosilación (asialo-Tf y disialo-Tf) se ve incrementada (T. Arndt. *Clinical Chemistry*,2001, 47:13-27).

25 En el caso, de la pérdida de líquido cefalorraquídeo se observa un aumento de la asialotransferrina, la cual es producida por la actividad de la enzima neuraminidasa presente en el cerebro. Esta enzima elimina el ácido siálico de la Tf resultando la formación de la asialo -Tf. Se toma muestra de las secreciones de la nariz u oídos del paciente y se mide la presencia de la asialo-Tf.

30 Según la Federación Internacional de Química Clínica y de Laboratorio (*International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Chemistry*) (grupo de trabajo IFCC-CDT-WG), el método analítico de referencia se basa en el uso de equipos de

cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección UV a 460 nm. De esta manera, se consiguen separar las distintas glicofomas de la transferrina y se puede obtener el porcentaje de CDT (cantidad de asialo- y disialotransferrina respecto el total de glicofomas de transferrina).

5

Otros laboratorios usan una alternativa a esta técnica empleando electroforesis capilar con detección UV. Esta técnica es similar a la anterior, con la separación de las distintas glicofomas y el cálculo del porcentaje de CDT. De hecho, muchas compañías han desarrollado equipos automáticos de alto rendimiento específicos para esta aplicación (“Capillarys”, Sebia, Francia; “Helena BiosciencesV8 Nexus”, Helena laboratorios, Reino Unido).

10

También existen algunos kits comerciales basados en anticuerpos (por ejemplo, NLatex CDT assay DadeBehring, IL, EEUU, distribuido por Siemens, Alemania) que permiten medir el nivel de transferrina deficiente en carbohidratos, pero su uso es más reducido que los anteriores métodos analíticos.

15

A continuación, se recogen las patentes encontradas para la determinación de la transferrina deficiente en carbohidratos:

20

- Dipstick for carbohydrate-free transferrin assay (US 6,716,641 B1)
- CDT assay (US 5,798,212)
- Capillary electrophoresis of transferrin glycoforms (US 5,993,626)
- Assay for glycosylation deficiency disorders (US 5,432,059)
- 25 - Quantification of carbohydrate deficient transferrin in high alcohol consumption by HPLC (US 5,788,845)
- JP2007256216
- Diagnosis of human glycosylation disorders (US 7,273,711 B1)
- Analytical method for the identification of at least one glycoform of the transferrin protein (EP 3117217)

30

Respecto a las técnicas de separación (HPLC, electroforesis capilar...) en las que se basan las patentes US 5,993,626, US 5,788,845 y EP 3117217, están bien establecidas,

pero requieren de una instrumentación cara. Además, estos equipos requieren ser instalados en laboratorios centralizados y deben ser utilizados por personal cualificado. Asimismo, los métodos basados en las mismas muestran algunas inexactitudes cuando aparecen variantes genéticas en la transferrina, que pueden hacer variar los tiempos de migración de las diferentes glicofomas y generar incertidumbre en la asignación de picos.

Los kits basados en anticuerpos (patentes JP2007256216, US 6,716,641 B1 y US 5,798,212) son rápidos y satisfacen la necesidad de ser usados cerca del punto de atención al paciente (*point-of-care*, POC) pero su problema aparece en la cantidad de biorreactivos que se deben usar en la técnica, así como el incremento económico que esto supone. Además, estos reactivos tienen períodos muy cortos de caducidad, lo que incrementa los costes de esta técnica.

Los criterios necesarios para construir un *point-of-care* adecuado que permita un diagnóstico rápido de las enfermedades mencionadas anteriormente son, entre otros, ultraminiaturización instrumental que asegure la portabilidad, bajo consumo de muestra, tiempos de análisis cortos, posibilidad para la medida *in situ* y facilidad de manejo por usuarios no especializados (personal sanitario e incluso pacientes).

Por todo lo anteriormente expuesto, se propone la creación (diseño y desarrollo) de un dispositivo electroquímico para la evaluación rápida y sencilla del nivel de glicosilación de la transferrina para el diagnóstico de los defectos congénitos de la glicosilación (CDG), el abuso crónico de alcohol y en la pérdida de líquido cefalorraquídeo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se basa en una metodología analítica que permite determinar de una manera muy sencilla y con bajo coste el grado de glicosilación de la transferrina, el cual es el biomarcador más usado para el diagnóstico de CDG y para la identificación clínica de personas alcohólicas. La determinación se realiza en muestras de suero o sangre, preferiblemente. Además, al basarse en un sistema analítico sencillo, portátil y

desechable, esta metodología puede ser utilizada de forma descentralizada fuera de los laboratorios clínicos y ponerse al servicio del paciente/usuario.

5 Se entiende por “defectos congénitos de la glicosilación” (CDG) un tipo de enfermedad rara. Esta enfermedad presenta un conjunto de defectos genéticos que muestran el mismo fenotipo; una alteración de la glicosilación de las proteínas. Esta enfermedad rara, o conjunto de defectos genéticos, se agrupa bajo el término “defectos congénitos de la glicosilación”.

10 La metodología se basa en el uso de un complejo de osmio (VI) (marcaje electroquímico), el cual se unirá de manera selectiva a los carbohidratos presente en la muestra (fluido biológico), incluidos aquellos carbohidratos presentes estructuralmente en la glicoproteína (en este caso, la transferrina (Tf)). Por lo tanto, la cantidad de osmio que se unirá a esta glicoproteína será proporcional a la cantidad de carbohidratos
15 presentes en la misma. Una vez unida la Tf con el complejo Os (VI), este aducto es purificado con ayuda de inmunopartículas magnéticas o una inmunocolumna, consiguiendo aislarlo del resto de componentes presentes en el fluido biológico.

A continuación, una vez aislado el aducto, se lleva a cabo la medida electroquímica
20 empleando electrodos serigrafados y voltamperometría adsorbtiva de redisolución anódica mediante onda cuadrada (AdSWV). En el voltamperograma se obtienen dos señales: una procedente de los carbohidratos (señal electroquímica del complejo de osmio VI que se ha unido a dichos carbohidratos) y otra debida a los aminoácidos (electroactivos) presentes en la Tf (señal electroquímica intrínseca de la Tf). La relación
25 entre ambas señales (señal carbohidratos/señal proteína) es un indicador del grado de glicosilación (indicador electroquímico de la glicosilación, IEG), el cual muestra una buena correlación ($r=0.990$) con el %CDT (medido mediante electroforesis capilar con detección ultravioleta CE-UV) (F. Bortolotti, D. Sorio, A. Bertaso, F. Tagliaro, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 147:2-12; B.C. Giordano, M. Muza, A. Trout, J.P. Landers, *J.*
30 *Chromatogr. B*, 2000, 742:79–89).

Todo el procedimiento es fácil de ejecutar y puede ser integrado dentro de un kit diagnóstico.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) en una muestra aislada de un sujeto que comprende las siguientes etapas:

- 5 a) contactar la muestra con un complejo de complejo Os (VI) para formar un aducto Tf-complejo Os (VI) por unión del complejo de Os(VI) a los carbohidratos presentes en la Tf,
- b) aislar el aducto formado en la etapa anterior mediante inmunopartículas magnéticas o inmunocolumna,
- 10 c) realizar una medida electroquímica del aducto aislado, dicha medida se realiza mediante voltamperometría adsorptiva de redisolución anódica mediante onda cuadrada, para obtener así un voltamperograma en el que aparece una señal procedente de los carbohidratos presentes en la Tf y otra debida a los aminoácidos presentes en la Tf, de manera que la relación entre las intensidades de ambas señales es un indicador del grado de glicosilación de la misma. Este valor se
15 compara con uno de referencia para diagnosticar CDG, para identificar personas alcohólicas o para detectar la pérdida de líquido cefalorraquídeo.

La voltamperometría adsorptiva de redisolución anódica mediante onda cuadrada es una técnica electroquímica que consiste en la adsorción del compuesto de interés (aducto
20 Tf-complejo Os (VI)) sobre la superficie del electrodo de trabajo y su posterior oxidación mediante un barrido de potencial. Este barrido de potencial es de tipo onda cuadrada (perfil de potencial) y se monitoriza la intensidad de corriente generada en función del potencial aplicado.

25 En el caso de que el aislamiento del aducto en la etapa b) se realice mediante inmunopartículas magnéticas, éstas se resuspenderán en una solución tampón antes de realizar la medida electroquímica de la etapa c).

En una realización preferida, la disolución tampón utilizada para resuspender las
30 inmunopartículas magnéticas que han aislado el aducto es tampón Britton-Robinson pH=3.

En una realización preferida, el volumen de la disolución tampón utilizado para resuspender las inmunopartículas magnéticas que han aislado el aducto es de entre 5 y 20 μL , aún más preferiblemente, de 10 μL .

5 Si la etapa b) de aislamiento se realiza mediante una inmunocolumna, el eluato obtenido se utilizará directamente en la etapa c) de medida electroquímica.

La muestra aislada del sujeto es preferiblemente un fluido biológico, más preferiblemente sangre, suero o plasma.

10

En una realización preferida, el volumen de muestra utilizado en la etapa a) está entre 100 y 300 μL .

15

En una realización preferida, el complejo de Os(VI) es seleccionado de la que comprende $\text{Os(VI)O}_2(\text{OH})_2(2\text{-(dimetilaminometil)piridina})$, $\text{Os(VI)O}_2(\text{OH})_2(2,2'\text{-bipiridina})$, $\text{Os(VI)O}_2(\text{OH})_2\text{piridina}$, más preferiblemente, el complejo de Os (VI) es $\text{Os(VI)O}_2(\text{OH})_2\text{N,N,N',N'-tetramilenediamina}$.

20

En una realización preferida el complejo de Os que se pone en contacto con la muestra en la etapa a) está en una disolución de tampón fosfato, más preferiblemente tampón fosfato 50 mM, pH=7. La concentración del complejo de osmio en la disolución tampón es preferiblemente 30,3 mM.

25

En una realización preferida, por cada 200 μL de muestra se añaden entre 225 y 675 μg de complejo de osmio, más preferiblemente 558 μg de complejo de osmio.

30

En una realización preferida, la muestra y el complejo de osmio se mantienen en la etapa a) en agitación a una temperatura de entre 20 y 40°C, más preferiblemente a 37°C durante un tiempo entre 1 y 20 h, más preferiblemente durante 16 horas.

En una realización preferida, el aducto Tf-complejo Os (VI) es purificado mediante inmunopartículas magnéticas que contienen un anticuerpo selectivo frente a transferrina que permite la extracción selectiva del aducto de la muestra biológica.

En otra realización preferida, el aducto Tf-complejo Os (VI) es purificado mediante una inmunocolumna.

5 Inmunopartículas magnéticas son partículas con un diámetro de 1-5 μm que comprenden un núcleo magnético y una superficie que se ha modificado con un anticuerpo policlonal o monoclonal específico frente a Tf. Estas inmunopartículas se pueden preparar fácilmente mediante incubación de partículas magnéticas funcionalizadas con proteína G (accesibles comercialmente) con un anticuerpo frente a Tf (también accesible comercialmente).

10 Una inmunocolumna es una columna cromatográfica cuyo relleno contiene un anticuerpo policlonal o monoclonal específico frente a Tf. Existen multitud de procedimientos para preparar dichas inmunocolumnas, uno de los más sencillos es hacer pasar un anticuerpo biotinilado (accesible comercialmente) por una columna comercial con estreptavidina o avidina, de tal manera que el anticuerpo se queda retenido en dicha columna.

15 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un equipo de medida para llevar a cabo la etapa c) (medida electroquímica del aducto purificado) del procedimiento descrito en el primer aspecto de la invención.

El equipo de medida comprende los siguientes elementos:

- un electrodo serigrafiado de medida en gota (sistema electródico) desechable, configurado para depositar la muestra de aducto purificado, donde dicho electrodo comprende un electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia, donde el electrodo del trabajo, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia están conjuntamente integrados en un soporte cerámico o plástico, y
- un dispositivo de medida portátil que comprende:
 - un potencióstato,
 - un dispositivo electrónico que lleva un software asociado para transformar la señal electroquímica obtenida del potencióstato en una señal digital numérica (se denominará a esta señal como “indicador electroquímico de la glicosilación”),

- una pantalla digital para la visualización de datos,
- una ranura configurada para introducir el electrodo serigrafiado de manera que éste, una vez introducido en la misma, quede en contacto con el potencióstato,
- 5 - botones de encendido/apagado (On/Off) y botones para el controlar el comienzo y final de la medida (Start/Stop).

La versatilidad intrínseca del equipo descrito permite modificar la configuración del soporte electródico, siendo posible utilizar cualquier diseño que permita la medida en gota, de tal manera que sea adaptable a cualquier dimensión y forma, proporcionando así diseños adaptados a cada necesidad. Sus dimensiones son tales que el electrodo sería desechable y de fácil manejo permitiendo su acoplamiento al sistema de medida (potencióstato). Además, los electrodos serigrafiados son fabricados en cadena y podrían comercializarse con un bajo coste, lo que facilitaría su aplicación como herramienta de *point-of-care* y, por tanto, su uso *in situ* por el usuario no especializado, acoplando este electrodo desechable al dispositivo principal mediante una ranura (contacto eléctrico con el potencióstato miniaturizado). El potencióstato miniaturizado presenta unas dimensiones tales que el dispositivo sea portátil y de fácil manejo (de tamaño similar a los glucómetros comerciales), además tendrá un software capaz de interpretar la señal analítica obtenida, todo ello integrado dentro de un dispositivo aislante/protector. En la pantalla del dispositivo se mostrará el valor numérico del grado de glicosilación. Por otro lado, posee una interfaz sencilla para facilitar el uso por personal no especializado, contando con botones para realizar las medidas (*on/off* y *start/stop*).

25

En una realización preferida, tanto el electrodo de trabajo como el auxiliar son de carbono y el electrodo de referencia es de plata o plata/cloruro de plata.

30

En una realización preferida, el electrodo de trabajo presenta un área de entre 0,3 y 1 cm², más preferiblemente 0,5 cm².

El electrodo serigrafiado está configurado preferiblemente para hacer la medida con un volumen mínimo de 50 µL de muestra.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para llevar a cabo el procedimiento descrito en el primer aspecto de la invención, donde dicho kit comprende:

- una disolución del complejo de Os(VI) en tampón fosfato (como se ha comentado anteriormente, el complejo Os(VI) reacciona selectivamente con los grupos hidroxilo de los carbohidratos y permite el marcaje electroquímico de la transferrina) y
- inmunopartículas magnéticas, que contienen un anticuerpo selectivo frente a transferrina, o bien, una inmunocolumna.

5

10

En una realización preferida, el kit comprende también el equipo de medida descrito en el segundo aspecto de la invención.

En una realización preferida, la disolución presenta una concentración 30,3 mM del complejo de osmio.

15

En otra realización preferida, el tampón que conforma la disolución del complejo de osmio es un tampón fosfato 50 mM, pH=7.

20

Un último aspecto de la invención se refiere al uso del equipo de medida y/o del kit definidos anteriormente para determinar el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) en una muestra aislada de un sujeto.

25

En una realización preferida, la invención se refiere al uso del equipo de medida y/o del kit para el diagnóstico de defectos congénitos de la glicosilación (CDG) en una muestra aislada de un individuo.

En otra realización preferida, la invención se refiere al uso del equipo de medida y/o del kit para la identificación de personas con pérdida de líquido cefalorraquídeo.

30

En otra realización preferida, la invención se refiere al uso del equipo de medida y/o del kit para la identificación y seguimiento de la evolución de personas alcohólicas.

Tanto el equipo de medida como el kit se caracterizan por su sencillez y fácil manejo por lo que pueden ser usados por personal no cualificado en cualquier lugar y a cualquier

hora, siendo de gran utilidad, por ejemplo, a los terapeutas y familiares en el control del tratamiento de personas alcohólicas.

5 La metodología y el kit descritos en la presente invención son directamente aplicables en el sector clínico tanto para diagnosticar los defectos congénitos de la glicosilación (CDG) como para identificar y monitorizar a aquellas personas alcohólicas o con pérdidas de líquido cefalorraquídeo. Respecto a la primera aplicación, esta metodología podría ser implementada como una prueba de cribado neonatal para el diagnóstico temprano de CDG lo cual permitiría un tratamiento inmediato de dicha enfermedad rara. 10 Respecto a la segunda, podría servir de apoyo durante los procesos de desintoxicación de las personas alcohólicas aportando información inmediata sobre el grado de seguimiento del tratamiento.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

15 Para completar esta descripción y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña de un juego de dibujos en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

20 **Fig. 1:** muestra el esquema del procedimiento de la invención. Así, los carbohidratos presentes en la muestra biológica se marcan con un complejo de osmio; la transferrina (ya unida al osmio) es aislada del resto de componentes mediante el empleo de un anticuerpo unido a inmunopartículas magnéticas y, finalmente, 10 μ L de muestra son usados para llevar a cabo la medida del indicador electroquímico de glicosilación (IEG) 25 sobre un electrodo serigrafiado.

Fig. 2: muestra un voltamperograma (potencial frente a intensidad) obtenido de acuerdo al procedimiento de la presente invención en el que aparecen dos picos relevantes: uno procedente de los carbohidratos presentes en la Tf y otro debida a los aminoácidos de la Tf. También se muestra como se calcula el grado de glicosilación de la transferrina, que es el cociente entre las intensidades de ambos picos (indicador electroquímico de glicosilación). 30

Fig. 3: muestra el grado de correlación entre el % CDT (parámetro oficial para indicar el grado de glicosilación de la transferrina: F. Bortolotti, D. Sorio, A. Bertaso, F. Tagliaro, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 147:2-12; B.C. Giordano, M. Muza, A. Trout, J.P. Landers, *J. Chromatogr. B*, 2000, 742:79–89) y el indicador electroquímico de glicosilación que se obtiene de acuerdo con el procedimiento de la presente invención.

Fig. 4: muestra el diseño de un electrodo serigrafiado de medida en gota (2) (sistema electródico) desechable basado en tres electrodos: electrodo de trabajo (21) de carbono, electrodo de referencia (22) de plata o plata/cloruro de plata y electrodo auxiliar (23) de carbono.

Fig. 5: muestra una imagen del equipo de medida que está formado por el dispositivo de medida (1) y el electrodo serigrafiado de medida en gota desechable (2).

MODO DE REALIZACIÓN

Ejemplo 1: Determinación el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) en una muestra aislada de un sujeto

Para realizar esta determinación se partió de 200 μ l de volumen de muestra del sujeto (suero).

En primer lugar se preparó el complejo de Os ($\text{Os(VI)O}_2(\text{OH})_2\text{N,N,N',N'}$ -tetrametilenediamina) siguiendo la metodología descrita en: Trefulka M, Paleček E. Voltammetry of Os(VI)-modified polysaccharides at carbon electrodes. *Electroanalysis*. **2009**;21:1763–1766. En particular, se disolvió en un vial 18,4 mg de osmato (VI) de potasio dihidrato (Sigma-Aldrich, Alemania) en 1,22 mL de agua ultrapura. A continuación, se añadieron 5.8 mg de N,N,N',N'-tetrametilenediamina y 0,41 mL de una disolución 0,2 M de tampón fosfato pH=7,0. Finalmente, se añadieron 10 μ L de una disolución 10 M de HCl. Se mantuvo en agitación durante 1 hora y después se filtró a través de un filtro de jeringa de nylon 0.22 μ m (Tecno-Air, España). La concentración final de complejo de Os(VI) en dicha disolución es 30,3 mM.

Seguidamente, 200 μL del fluido biológico se hicieron reaccionar con un exceso de complejo de osmio (49,5 μL de la disolución 30,3 mM $\text{Os(VI)O}_2(\text{OH})_2\text{N,N,N',N'}$ -tetrametilenediamina), que se une selectivamente a los carbohidratos presentes en la muestra (reacción en agitación a 37 °C durante 16 horas). Tras ello, el aducto Tf-Os(VI) fue capturado y separado del resto de componentes con ayuda de inmunopartículas magnéticas.

Las inmunopartículas magnéticas se prepararon previamente mediante la unión de un anticuerpo policlonal comercial frente a Tf (Abcam, Reino Unido) a unas partículas magnéticas comerciales funcionalizadas con proteína G (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Para ello, se mezcló 1 μL de la suspensión de partículas magnéticas con 50 μL del anticuerpo policlonal frente a Tf en una concentración de 7,46 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se dejó en incubación a 25°C durante 45 minutos en agitación. La partícula magnética con el anticuerpo unido se retuvo con un imán, se retiró el sobrenadante y se procedió a un doble lavado con tampón PBS pH 7.4 para eliminar los compuestos no retenidos.

El aducto Tf-Os(VI) unido a las inmunopartículas se resuspendió en 10 μL de tampón Britton-Robinson pH=3 a fin de hacer la medida electroquímica. La Figura 1 muestra en esquema el procedimiento realizado.

Los 10 μL de suspensión obtenida se añadieron sobre electrodo de trabajo del sistema electródico (área 0,5 cm^2) y se esperó 5 minutos para que el aducto Tf-Os(VI) unido a las inmunopartículas se adsorbiera sobre la superficie del mismo. Se lavó la superficie del electrodo con agua ultrapura para eliminar aquellos compuestos que no estaban fuertemente adsorbidos. A continuación, se añadieron 50 μL de tampón Britton-Robinson pH=3.0. Entonces se procedió a llevar a cabo la medida electroquímica mediante AdSWV. Los parámetros de la medida electroquímica mediante AdSWV fueron los siguientes: potencial de inicio -1.3 V, potencial final +1.2 V, paso de potencial 5 mV, amplitud 50 mV y frecuencia 100 Hz.

El proceso de medida comenzó con el acoplamiento de un electrodo serigrafiado (desechable) sobre el dispositivo de medida. El software de éste es capaz de obtener la relación entre las señales generadas (señal carbohidratos/señal proteína), indicando el

grado de glicosilación de la transferrina (indicador electroquímico de glicosilación). El voltamperograma obtenido se muestra en la Figura 2.

5 En la pantalla digital aparece el valor del indicador electroquímico de glicosilación. Este valor se compararía con un valor umbral o de referencia a partir del cual se diagnosticaría la enfermedad.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) en una muestra aislada de un sujeto caracterizado por comprender las siguientes etapas:
 - 5 a) contactar la muestra con un complejo de complejo Os (VI) para formar un aducto Tf-complejo Os (VI) por unión del complejo de Os(VI) a los carbohidratos presentes en la Tf,
 - b) aislar el aducto formado en la etapa anterior mediante inmunopartículas magnéticas o inmunocolumna,
 - 10 c) realizar una medida electroquímica del aducto aislado, dicha medida se realiza mediante voltamperometría adsorptiva de redisolución anódica mediante onda cuadrada, para obtener así un voltamperograma en el que aparece una señal procedente de los carbohidratos presentes en la Tf y otra debida a los aminoácidos presentes en la Tf, de manera que la relación entre las intensidades
15 de ambas señales es un indicador del grado de glicosilación de la misma.

2. Procedimiento según reivindicación 1 donde la muestra aislada de un sujeto es una muestra de sangre, suero o plasma.

- 20 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 donde el complejo de Os (VI) es Os(VI)O₂(OH)₂N,N,N',N'-tetramilenediamina.

4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el aducto Tf-complejo Os (VI) es purificado en la etapa b) mediante la adición de inmunopartículas
25 magnéticas que contienen un anticuerpo selectivo frente a transferrina.

5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el aducto Tf-complejo Os (VI) es purificado en la etapa b) mediante una inmunocolumna.

- 30 6. Equipo de medida para llevar a cabo la medida electroquímica del aducto purificado según el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por comprender:
 - un electrodo serigrafiado de medida en gota desechable, configurado para depositar la muestra de aducto purificado, donde dicho electrodo comprende un

electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar y un electrodo de referencia, donde el electrodo del trabajo, el electrodo auxiliar y el electrodo de referencia están conjuntamente integrados en un soporte cerámico o plástico, y

- un dispositivo de medida portátil que comprende:

- 5 - un potencióstato,
- un dispositivo electrónico que lleva un software asociado para transformar la señal electroquímica obtenida del potencióstato en una señal digital numérica,
- una pantalla digital para la visualización de datos,
- una ranura configurada para introducir el electrodo serigrafiado de manera que
10 éste, una vez introducido en la misma, quede en contacto con el potencióstato,
- botones de encendido/apagado y botones para el controlar el comienzo y final de la medida.

7. Equipo de medida, según reivindicación 6, donde tanto el electrodo de trabajo como
15 el auxiliar son de carbono y el electrodo de referencia es de plata o plata/cloruro de plata.

8. Equipo de medida, según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7, donde el electrodo
de trabajo presenta un área de entre 0,3 y 1 cm².

9. Kit para llevar a cabo el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones
1 a 5, caracterizado por comprender:

- una disolución del complejo de Os(VI) en tampón fosfato y
- inmunopartículas magnéticas, que contienen un anticuerpo selectivo frente a
25 transferrina, o bien, una inmunocolumna.

10. Kit, según la reivindicación 9 que además comprende el equipo de medida descrito
en cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.

11. Kit, según la reivindicación 10 donde la disolución de Os (VI) presenta una
concentración 30,3 mM del complejo de osmio.

12. Kit, según la reivindicación 10 u 11, donde la disolución de Os (VI) es tampón fosfato
50 mM, pH=7.

13. Uso del kit definido anteriormente para determinar el grado de glicosilación de la transferrina (Tf) en una muestra aislada de un sujeto.

5 14. Uso, según reivindicación 13, para el diagnóstico de defectos congénitos de la glicosilación en una muestra aislada de un individuo.

15. Uso, según reivindicación 13, para la identificación de personas con pérdida de líquido cefalorraquídeo.

10

16. Uso, según reivindicación 13, para la identificación y seguimiento de la evolución de personas alcohólicas.

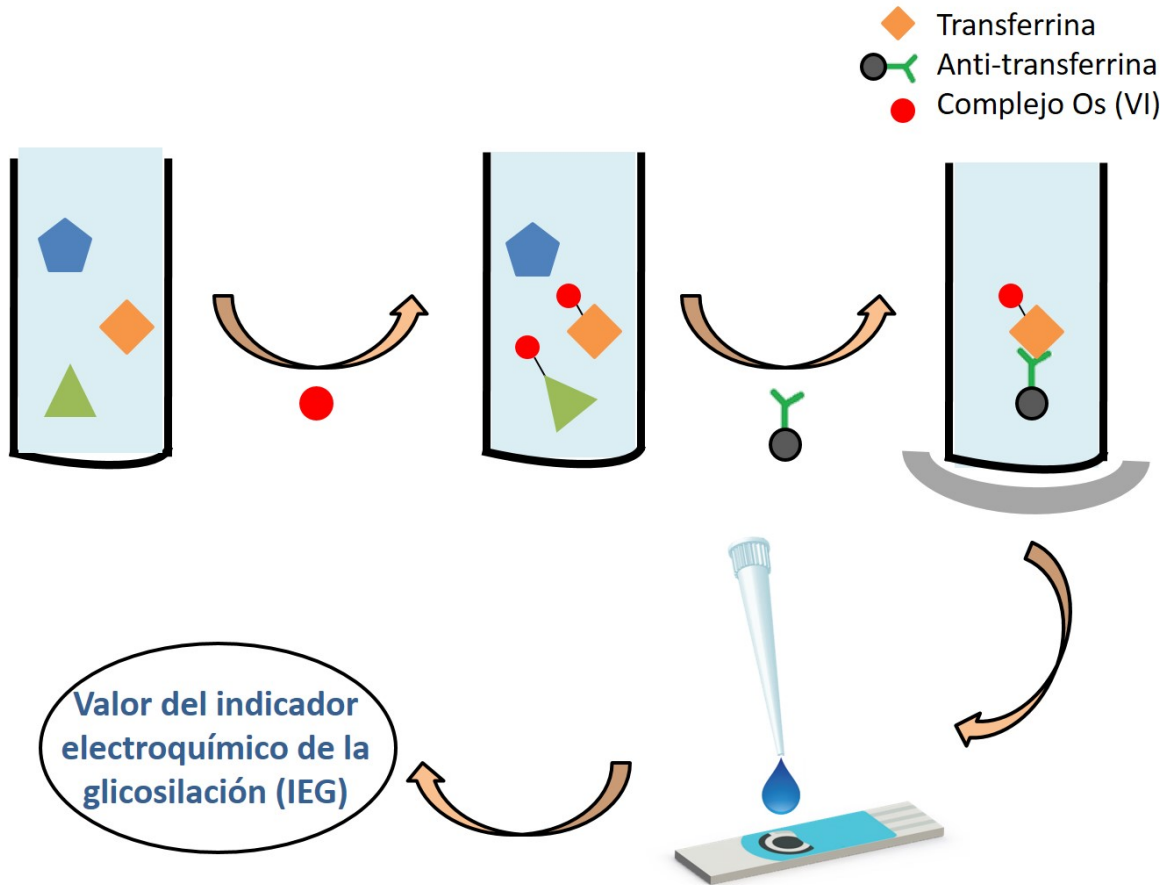
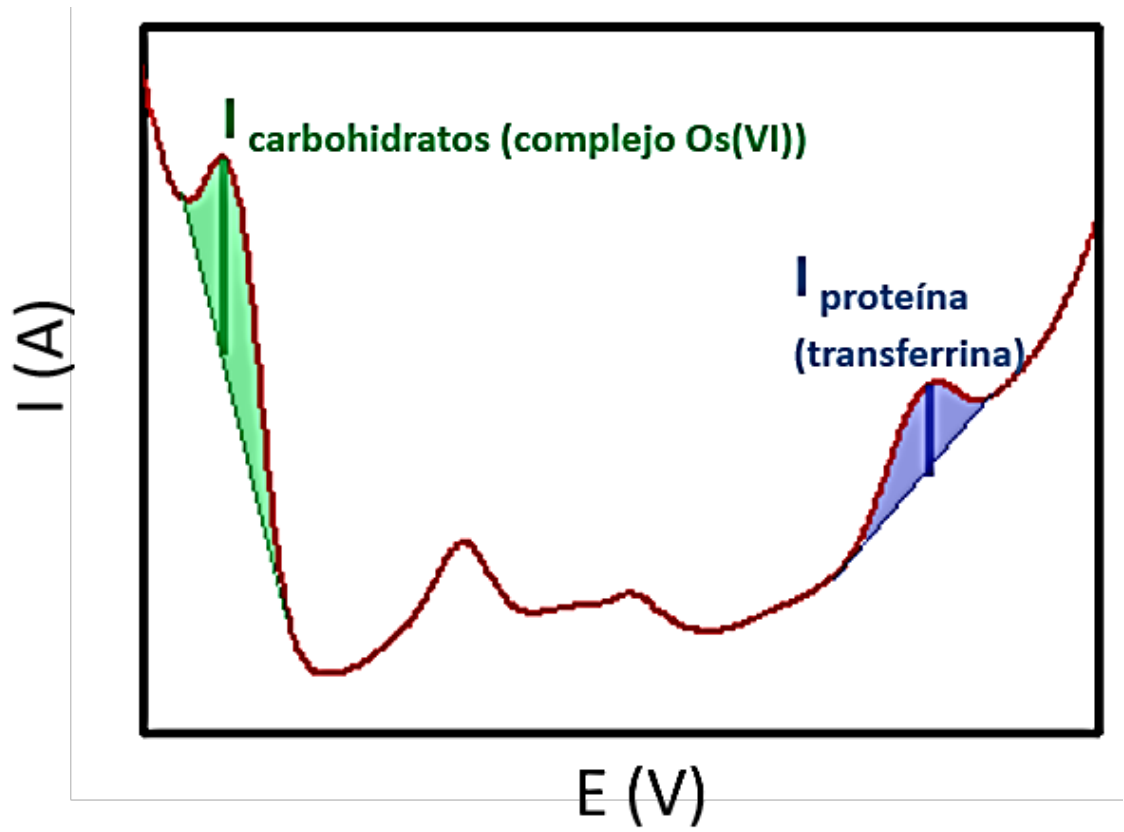


FIG. 1



$$\frac{I_{\text{carbohidratos}}}{I_{\text{proteína}}} = \text{índice de glicosilación}$$

FIG. 2

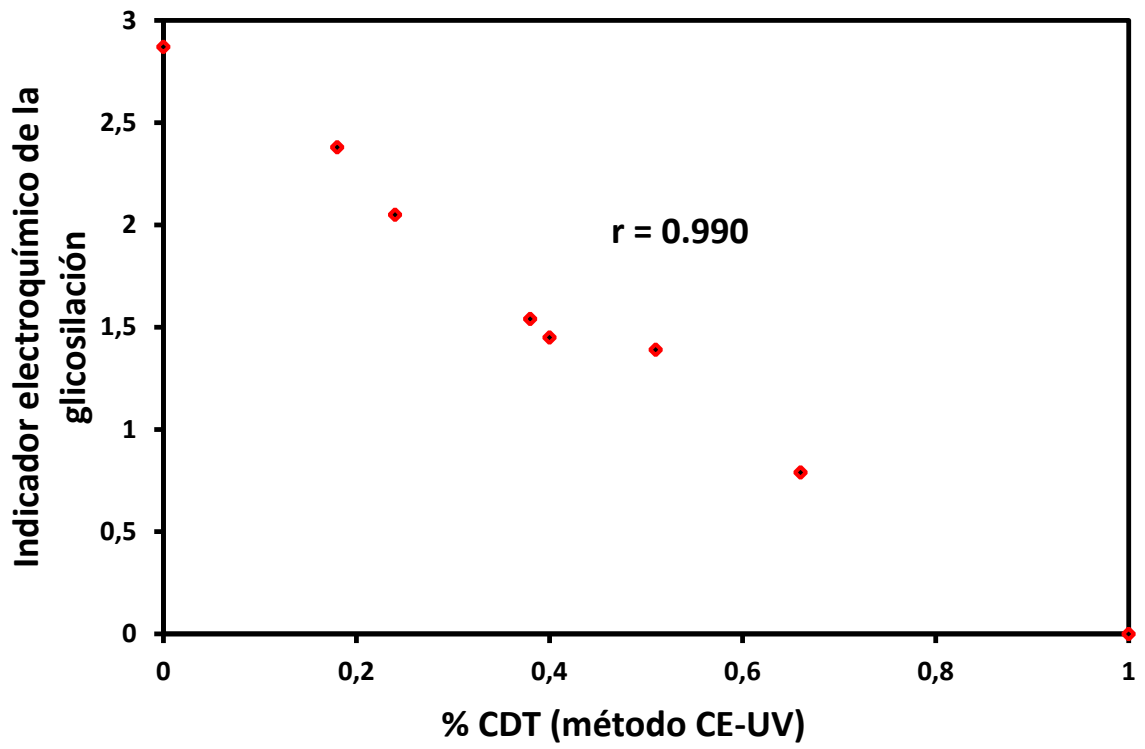


FIG. 3

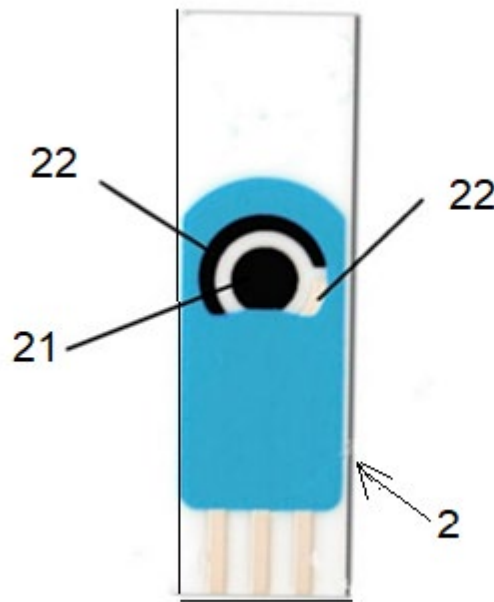


FIG. 4



FIG. 5



- ②① N.º solicitud: 202030806
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.07.2020
②③ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	SIERRA TANIA et al. "Determination of Glycoproteins by Microchip Electrophoresis Using Os(VI)-Based Selective Electrochemical Tag". Analytical chemistry United States 06 08 2019, 06/08/2019, Vol. 91, Páginas 10245 - 10250, ISSN 1520-6882 (Electronic), <DOI: doi:10.1021/acs.analchem.9b02375 pubmed: 31283879>. Ver resumen; sección experimental.	6-8
A	SIERRA TANIA et al. "Total alpha(1)-acid glycoprotein determination in serum samples using disposable screen-printed electrodes and osmium (VI) as electrochemical tag". Talanta APR 1 2018. 01/04/2018, Vol. 180, Páginas 206-210, ISSN 0039-9140(print) ISSN 1873-3573(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.talanta.2017.12.018>. Ver resumen; resultados.	1-16
A	US 5993626 A (LANDERS JAMES P et al.) 30/11/1999, Ejemplo 1; reivindicaciones 1-4.	1-16
A	US 5798212 A (SUNDREHAGEN ERLING) 25/08/1998, Reivindicación 1.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
17.05.2021

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

G01N33/49 (2006.01)

G01N33/487 (2006.01)

G01N27/447 (2006.01)

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS