

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: **3 032 610**

21) Número de solicitud: 202430051

51) Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/487** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22) Fecha de presentación:

**22.01.2024**

43) Fecha de publicación de la solicitud:

**22.07.2025**

71) Solicitantes:

**INSTITUTO DE SALUD CARLOS III (50.00%)  
C/ Sinesio Delgado, 6  
28029 Madrid (Madrid) ES y  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(50.00%)**

72) Inventor/es:

**MONTERO CALLE, Ana;  
BARDERAS MANCHADO, Rodrigo;  
REJAS GONZÁLEZ, Raquel;  
VALVERDE DE LA FUENTE, Alejandro;  
CAMPUZANO RUIZ, Susana y  
GUZMÁN ARÁNGUEZ, Ana Isabel**

74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

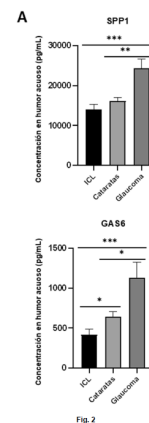
La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico

54) Título: **USO *IN VITRO* DE LA PROTEÍNA GAS6 PARA EL DIAGNÓSTICO DE GLAUCOMA O CATARATAS EN UN SUJETO**

57) Resumen:

Uso *in vitro* de la proteína GAS6 para el diagnóstico de glaucoma o cataratas en un sujeto.

La presente invención se refiere al uso *in vitro* de la proteína GAS6 para el diagnóstico de glaucoma o cataratas en un sujeto. Además, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, que comprende cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto. La presente invención también se refiere al uso *in vitro* de la proteína GAS6 en combinación con la proteína SPP1 para el diagnóstico de glaucoma o cataratas en un sujeto. Así, la presente invención se refiere además a un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, que comprende cuantificar los niveles de la proteína GAS6 y SPP1 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto.



ES 3 032 610 A1

## DESCRIPCIÓN

### Uso *in vitro* de la proteína GAS6 para el diagnóstico de glaucoma o cataratas en un sujeto

5

La presente invención se refiere a métodos y un kit para determinar si un sujeto padece cataratas o glaucoma. Por lo tanto, la presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las enfermedades oculares crónicas representan un creciente problema de salud pública debido al envejecimiento general de la población y los cambios en el estilo de vida. El glaucoma y las cataratas, que causan una pérdida progresiva y grave de la  
15 visión, se encuentran entre las patologías oculares más destacadas y son responsables de la mayoría de los casos de ceguera en todo el mundo. El glaucoma, la principal causa de ceguera irreversible, afecta a más de 70 millones de personas (el 10% de ellas con ceguera bilateral) y se estima que su prevalencia aumentará a 112 millones en 2040 (Tham et al., 2014, Aung y C.Y. Cheng, Ophthalmology 121, 2081-2090).

20

Los sujetos que desarrollan cataratas presentan opacidad del cristalino, y dicha patología es responsable del 33% de las deficiencias visuales y el 51% de la ceguera en todo el mundo según la OMS (Pascolini y Mariotti, 2012, Ophthalmol 96, 614-618). Se estima que actualmente 95 millones de personas padecen esta afección. De hecho,  
25 las cataratas son la principal causa de ceguera reversible en los países desarrollados y de ceguera irreversible en los países subdesarrollados (Liu et al., 2017, Lancet 390, 600-612). Aunque el principal tratamiento de las cataratas es la cirugía, puede haber complicaciones como la rotura capsular del cristalino o la pérdida del vítreo, así como complicaciones postoperatorias como la endoftalmitis u opacificación capsular posterior.  
30 Dado el envejecimiento general de la población en todo el mundo, se espera una mayor prevalencia de estas enfermedades oculares en el futuro, lo que implicará un gran costo económico para los sistemas de salud pública.

El glaucoma es una patología que se caracteriza por la muerte progresiva de las células  
35 ganglionares de la retina y sus axones, que forman el nervio óptico, acompañada de

una pérdida gradual del campo visual (Quigley, 2011, Lancet 377, 1367-1377). La presión intraocular (PIO) está determinada por el equilibrio entre el humor acuoso secretado en el ojo por el cuerpo ciliar y la cantidad que se drena del ojo a través de las dos principales vías de salida: la malla trabecular y la vía uveoescleral. Se considera  
5 que el aumento de la PIO es un importante factor de riesgo para el inicio y la progresión del glaucoma, y, en consecuencia, las terapias utilizadas tienen como objetivo reducir la PIO.

Sin embargo, la alta incidencia de glaucoma de tensión normal (30-40% de los  
10 pacientes) y la recurrencia de pacientes que continúan perdiendo la visión incluso cuando se controlan con éxito los valores de la PIO destacan el hecho de que el aumento de la PIO no es el único factor determinante en el desarrollo de la enfermedad, y su control no es suficiente para retrasar o detener su evolución. Además, el aumento de la PIO solo puede detectarse después de una pérdida significativa del campo visual. En  
15 este sentido, el glaucoma de ángulo abierto primario (el más frecuente) se ha denominado ceguera silenciosa, ya que generalmente no produce síntomas hasta las etapas avanzadas.

Por lo tanto, es necesario establecer biomarcadores que permitan el diagnóstico  
20 temprano del glaucoma y cataratas de una forma rápida y eficiente, permitiendo así mejorar el manejo y tratamiento de esta enfermedad.

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

25 Los presentes inventores aislaron y caracterizaron los exosomas del humor acuoso de sujetos con cristalino transparente (ICL, controles), pacientes con cataratas y pacientes con glaucoma. Además, llevaron a cabo una caracterización del contenido proteico exosomal en el humor acuoso utilizando cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), detectando cambios significativos en  
30 el contenido proteico entre los diferentes grupos de sujetos, e indicando la existencia de perfiles proteicos exosomales específicos en estas enfermedades oculares. Posteriormente, se utilizaron los humores acuosos para validar la desregulación observada a nivel de exosomas mediante Western blot (WB) utilizando muestras individuales o agrupadas de pacientes y controles. Finalmente, se evaluó la capacidad  
35 de la proteína específica de crecimiento 6 (GAS6) y la osteopontina (SPP1) como

biomarcadores para el diagnóstico del glaucoma y cataratas en el humor acuoso.

Los presentes inventores encontraron que los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en humores acuosos aislados de sujetos controles y pacientes con cataratas y  
5 glaucoma, permiten la discriminación de pacientes de glaucoma, pacientes de cataratas e individuos sin estas patologías. Además, los presentes inventores determinaron que la combinación del marcador GAS6 con el marcador SPP1 dio lugar a una mejora de la capacidad diagnóstica. Por lo tanto, en vista de los hallazgos de los presentes  
10 inventores, los niveles del marcador proteico GAS6, o la combinación de los niveles de la proteína GAS6 con los niveles de la proteína SPP1, cuantificados en una muestra biológica aislada de un sujeto, preferiblemente humor acuoso, se presentan como nuevos marcadores para el diagnóstico de glaucoma o cataratas, permitiendo así un diagnóstico temprano que deriva en un mejor manejo clínico de los sujetos que padecen dichas enfermedades.

15

Por lo tanto, en un aspecto la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, donde dicho método comprende cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra biológica aislada de un sujeto, de ahora en adelante "método GAS6 de la invención".

20

Para establecer el diagnóstico, los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en una muestra biológica aislada del sujeto pueden ser comparados con un límite o límites de referencia previamente establecidos.

25 Así, en una realización preferida del método GAS6 de la invención, dicho método comprende los siguientes pasos:

- a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra biológica aislada del sujeto, y
- 30 b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R1 y/o un límite de referencia R2,

en donde:

- 35 - si los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en a) son iguales o mayores que

- el límite de referencia R2, el sujeto padece glaucoma; o
- si los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en a) son iguales al límite de referencia R1, o si los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en a) se encuentran entre los límites de referencia R1 y R2, el sujeto padece cataratas.

5

En la presente invención el término “diagnosticar” se refiere al acto de identificar una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de uno o varios parámetros clínicos o síntomas característicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes y/o de un sujeto que no padece dicha enfermedad. En la presente invención las enfermedades a identificar son enfermedades oculares. Específicamente, las enfermedades a identificar son glaucoma o cataratas y los parámetros clínicos son los niveles de la proteína GAS6, o los niveles de la proteína GAS6 en combinación con los niveles de la proteína SPP1, cuantificados en una muestra biológica aislada de un sujeto.

10  
15

En la presente invención el término “glaucoma” se refiere a una afección ocular en la que el nervio óptico del ojo es dañado de forma progresiva, derivando en una pérdida de visión.

20

En la presente invención, el término “cataratas” se refiere a una afección ocular en la cual el cristalino del ojo se vuelve opaco de manera progresiva. Los síntomas de los sujetos que padecen cataratas incluyen visión empañada, borrosa, o doble visión; sensibilidad a la luz o dificultad para ver en la oscuridad.

25

Para establecer el diagnóstico en el método GAS6 de la invención, primero se lleva a cabo el paso a), el cual consiste en cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra biológica aislada de un sujeto.

El término “proteína GAS6” se refiere a la proteína (Referencia UniProt: Q14393, GAS6\_HUMAN. Proteoma de referencia Uniprot UP000005640\_9606 Homo sapiens base de datos de 2022) codificada por el gen *GAS6* (del inglés, “*growth arrest specific 6*”; Referencia Ensembl: ENSG00000183087.15). Preferiblemente, la proteína GAS6 comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1:

30  
35

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLAAECALAALLPAREATQFLRPRQRRAFQVFEEAKQ  
 GHLERECVEELCSREEAREVFENDPETDYFYPRYLDCINKYGSPYTKNSGFATCVQN  
 LPDQCTPNPCDRKGTQACQDLMGNFFCLCKAGWGGRLCDKDVNECSQENGGCLQI  
 CHNKPGSFHCSCHSGFELSSDGRTCQDIDECADSEACGEARCKNLPGSYSCLCDEG  
 5 FAYSSQEKACRDVDECLQGRCEQVCVNSPGSYTCHCDGRGGLKLSQDMDTCECILP  
 CVPFSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLFAGGH  
 QDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELARNLVIKVNRD  
 AVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLTVGGIPFHEKDLVQPINPRLDGC MRSWNWLNGED  
 TTIQETVKVNTRMQCFVTERGSFYPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAH  
 10 IRPAADTGVL FALWAPDLRAVPLSVALVDYHSTKCLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCD  
 GQEHVVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAGGLPD  
 VPVTSAPVTA FYRGCM TLEVNRRLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAA

El término “proteína SPP1” se refiere a una proteína (Referencia Uniprot: P10451,  
 15 OSTP\_HUMAN. Proteoma de referencia Uniprot UP000005640\_9606.fasta Homo  
 sapiens (human) base de datos de 2022) codificada por el gen *SPP1* (del inglés,  
 “*secreted phosphoprotein 1*”, Referencia Ensembl: ENSG00000118785.15).  
 Preferiblemente la proteína SPP1 comprende, preferiblemente consiste en, la secuencia  
 de aminoácidos SEQ ID NO: 2:

20 MRIAVICFLLGITCAIPVKQADSGSSEEKQLYNKYPD AVATWLNPDPSQKQNLLAPQ  
 NAVSSEETNDFKQETLPSKSNESHDMDDMDEDDDDHVDSQDSIDSNDSDDVDDT  
 DDSHQSDESHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFVPTVPTVDTYDGRGDSVYGLRSKS  
 KKFRRPDIQYPDATDEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYETS  
 25 QLDDQSAETHSHKQSRLYKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDML  
 VVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN

La cuantificación de marcadores proteicos en una muestra biológica aislada se puede  
 llevar a cabo mediante métodos conocidos por el experto en la materia, tales como, pero  
 30 sin limitación, métodos basados en fluorescencia, inmunoensayos, luminiscencia,  
 mediante el uso de biosensores electroquímicos o espectrometría.

Así, en una realización preferida del método GAS6 de la invención, el paso a) de  
 cuantificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado de la lista que consiste  
 35 en: Western blot, espectrometría de masas, ELISA (ensayo de inmunosorbente ligado

a enzima, del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), RIA (Radioinmunoensayo, del inglés “Radioimmunoassay”), EIA Competitivo (Inmunoensayo Enzimático Competitivo, del inglés “Competitive Enzyme Immunoassay”), DAS-ELISA (ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo, del inglés “Double antibody Sandwich-ELISA”), biosensores electroquímicos y biochips o microarrays de proteínas.

De forma ventajosa, los niveles de la proteína GAS6 (sola o en combinación con los niveles de la proteína SPP1) pueden ser cuantificados en una muestra aislada de un sujeto que va a ser sometido a una operación ocular, por ejemplo, un sujeto que padece cataratas y que se va a someter a una operación para tratar las cataratas, donde la muestra biológica es tomada antes o durante la operación. Por lo tanto, los marcadores de la invención pueden ser usados para el diagnóstico de glaucoma en un sujeto que padece de cataratas.

Así, en una realización preferida, el método GAS6 de la invención es un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma en un sujeto, donde dicho sujeto padece cataratas (es decir, el sujeto ha sido diagnosticado previamente con cataratas), y donde dicho método comprende los siguientes pasos:

- a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto que padece cataratas, y
- b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R2,

en donde:

- si los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en a) son iguales o mayores que el límite de referencia R2, el sujeto además padece glaucoma.

En la presente invención se entiende por “muestra” a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación. En particular, en la presente invención el término muestra abarca muestras de origen biológico, que son aisladas de un sujeto, que incluyen sin limitar a, muestras de lágrimas, humor vítreo o humor acuoso.

Así, en otra realización preferida del método GAS6 de la invención, la muestra biológica es una muestra de líquido; preferiblemente un líquido ocular. El experto en la materia conoce las técnicas/metodologías necesarias para el aislamiento de una muestra de un  
5 líquido ocular de un sujeto.

Así, en otra realización preferida del método GAS6 de la invención, la muestra biológica aislada se selecciona de una lista que consiste en una muestra de lágrimas, humor acuoso y humor vítreo; más preferiblemente la muestra es de humor acuoso.

10

Preferiblemente, la obtención de una muestra aislada de humor acuoso de un sujeto se puede llevar a cabo mediante una incisión en la córnea del sujeto, seguida de un aspirado del humor acuoso a través de la incisión con jeringuilla.

15 En la presente invención, el término “lágrima” se refiere al líquido secretado por las glándulas lagrimales de un sujeto.

En la presente invención, el término “humor vítreo” se refiere al gel o líquido que se encuentra albergado en la cavidad vítrea o cavidad posterior del ojo de un sujeto.

20

En la presente invención el término “humor acuoso” se refiere al líquido biológico contenido en la cámara anterior del ojo, es decir, entre la córnea y el cristalino de un sujeto (por ejemplo, un humano o animal no humano).

25 Los niveles de la proteína GAS6, y los niveles de la proteína SPP1, en una muestra biológica aislada se refieren a la cantidad de dichos marcadores en la muestra aislada. La cantidad se puede representar como la concentración de los marcadores en la muestra aislada, donde preferiblemente, si la muestra es un líquido, la cantidad de las proteínas GAS6 y SPP1 se representan en unidades de pg/ml (ej. picogramos de  
30 proteína/ mililitros de muestra de humor acuoso).

La muestra aislada del sujeto puede comprender exosomas, los cuales son pequeñas vesículas lipídicas (con un diámetro medio de entre 30 y 200 nm) que se originan por exocitosis de endosomas multivesiculares y contienen proteínas, ácidos nucleicos y  
35 lípidos.

Así, en realizaciones preferidas, la muestra biológica aislada del sujeto comprende exosomas.

De acuerdo con los resultados de los inventores, los exosomas de humor acuoso de los  
5 sujetos estudiados contienen las proteínas GAS6 y SPP1. Por lo tanto, los niveles de la proteína GAS6, sola o en combinación con los niveles de la proteína SPP1, pueden ser cuantificados en exosomas obtenidos tras su aislamiento de la muestra biológica.

Por lo tanto, los niveles de la proteína GAS6, sola o en combinación con los niveles de  
10 la proteína SPP1, pueden ser cuantificados en la muestra biológica total aislada o también se pueden cuantificar en exosomas aislados de una muestra biológica aislada de un sujeto.

En realizaciones preferidas, los niveles de la proteína GAS6, sola o en combinación con  
15 los niveles de la proteína SPP1, se cuantifican en exosomas aislados de la muestra biológica aislada de un sujeto, preferiblemente exosomas aislados de una muestra de humor acuoso. Tal y como conoce la persona experta en la materia, los exosomas de una muestra biológica pueden ser aislados mediante técnicas tales como, sin limitación, precipitación, centrifugación diferencial, ultracentrifugación, ultrafiltración, cromatografía  
20 de exclusión por tamaño o inmunoafinidad.

En la presente invención, el término "sujeto" se refiere a un humano o animal no humano, preferiblemente donde el animal no humano es un mamífero, de cualquier edad, sexo o  
25 raza.

Así, en realizaciones preferidas de los métodos de la invención, el sujeto es un humano o un animal no humano.

Tras el paso a), el método GAS6 de la invención comprende un paso b) en la que se  
30 comparan los niveles de GAS6 con límites de referencia para establecer el diagnóstico del sujeto.

En la presente invención, el término "límite de referencia" se refiere, en el contexto de un método de diagnóstico, a un valor de referencia de la cantidad de un marcador que  
35 permite establecer, tras su comparación con el valor de la cantidad de dicho marcador

medido en una muestra aislada de un sujeto el cual va a ser diagnosticado, si el sujeto padece o no una enfermedad o condición concreta. Preferiblemente, el/los límite/s de referencia se pueden establecer previamente al proceso de diagnóstico. Más preferiblemente, el valor de un límite de referencia se puede establecer previamente a

5 partir del análisis estadístico de los niveles de un marcador o marcadores cuantificados en una muestra de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que padecen una condición o enfermedad, comparados con los niveles del marcador cuantificados de una muestra aislada de un sujeto o grupo de sujetos que se conoce que no padecen la enfermedad o condición. En la práctica de rutina, los límites de referencia para métodos

10 diagnósticos se pueden obtener a partir del análisis mediante metodologías estadísticas conocidas para el experto en la materia tales como las curvas ROC (del inglés, "*Receiver Operating Characteristic Curve*"). Los límites de referencia pueden ser previamente definidos permitiendo establecer el diagnóstico de un sujeto con los mejores valores de sensibilidad y especificidad. En la presente invención los términos "límite de referencia"

15 y "punto de corte de referencia" (del inglés "*cut-off reference value*"), son equivalentes y pueden ser usados de manera intercambiable.

En la presente invención, el término "límite de referencia R1" se refiere al valor de referencia de los niveles de la proteína GAS6 que permite establecer si un sujeto padece

20 cataratas tras su comparación con los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en una muestra biológica aislada de dicho sujeto. El límite de referencia R1 se puede obtener a partir de análisis estadístico de los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en la muestra biológica aislada de un sujeto o en un grupo de muestras biológicas aisladas de sujetos que no padecen cataratas (sujetos sanos) y los valores de los niveles de la

25 proteína GAS6 cuantificados en las muestras biológicas aisladas de un sujeto o en un grupo de muestras biológicas aisladas de sujetos que padecen cataratas; preferiblemente donde dicho análisis estadístico se realiza mediante curvas ROC.

En una realización preferida, el límite de referencia R1 es de 638,22 pg/ml;

30 preferiblemente donde dicho límite de referencia R1 es obtenido a partir de los niveles de GAS6 cuantificados en muestras de líquido ocular, más preferiblemente humor acuoso.

En la presente invención, el término "límite de referencia R2" se refiere al valor de

35 referencia de los niveles de la proteína GAS6 que permite establecer si un sujeto padece

glaucoma tras su comparación con los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en una muestra biológica aislada de dicho sujeto. El límite de referencia R2 se puede obtener a partir de análisis estadístico de los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en la muestra biológica aislada de un sujeto o en un grupo de muestras biológicas aisladas de sujetos que no padecen glaucoma (sujetos sanos o sujetos que padecen cataratas pero no glaucoma) y los valores de los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en la muestra biológica aislada de un sujeto o en un grupo de muestras biológicas aisladas de sujetos que padecen glaucoma (padecen glaucoma pero no cataratas o padecen glaucoma y cataratas); preferiblemente donde dicho análisis estadístico se realiza mediante curvas ROC.

De acuerdo con los hallazgos de los presentes inventores, los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en muestras aisladas de sujetos que padecen glaucoma fueron superiores a los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en muestras aisladas de sujetos que no padecen glaucoma ni cataratas, y mayores que en muestras aisladas de sujetos que no padecen glaucoma, pero sí cataratas. Por lo que, consecuentemente, el valor del límite de referencia R2, previamente establecido, es mayor que el valor del límite de referencia R1, previamente establecido.

Así en realizaciones preferidas, el límite de referencia R2 es mayor que el límite de referencia R1, más preferiblemente, el límite de referencia R2 es entre 1,02 veces y 1,20 veces mayor que el límite de referencia R1.

En una realización preferida, el límite de referencia R2 es de 735,25 pg/ml; preferiblemente donde dicho límite de referencia R2 es obtenido a partir de los niveles de GAS6 cuantificados en muestras de líquido ocular, más preferiblemente humor acuoso.

De acuerdo con los resultados obtenidos por los presentes inventores, la combinación de los niveles de la proteína GAS6 con los niveles de la proteína SPP1, mejoraron los resultados diagnósticos de cataratas o glaucoma en un sujeto.

Así en otro aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, donde dicho método comprende cuantificar los niveles de las proteínas GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada

de un sujeto, de ahora en adelante “método GAS6/SPP1 de la invención”.

Para establecer el diagnóstico, los niveles de las proteínas GAS6 y SPP1 cuantificados en una muestra biológica aislada del sujeto pueden ser comparados con límites de referencia previamente establecidos.

En una realización preferida, el método GAS6/SPP1 de la invención comprende los siguientes pasos:

- 10           a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada del sujeto, y
- b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R1 y/o un límite de referencia R2, y comparar los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R3,

15

en donde:

- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales o mayores que el límite de referencia R2, y si los niveles de la proteína SPP1 son iguales o mayores que el límite de referencia R3, el sujeto padece glaucoma; o
- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales al límite de referencia R1 o se encuentran entre los límites de referencia R1 y R2, el sujeto padece cataratas.

20

Para establecer el diagnóstico en el método GAS6/SPP1 de la invención, primero se lleva a cabo el paso a), el cual consiste en cuantificar los niveles de las proteínas GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada de un sujeto.

25

Así, en una realización preferida del método GAS6/SPP1 de la invención, el paso a) de cuantificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado de la lista que consiste en: Western blot, espectrometría de masas, ELISA (ensayo de inmunosorbente ligado a enzima, del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”), RIA (Radioinmunoensayo, del inglés “Radioimmunoassay”), EIA Competitivo (Inmunoensayo Enzimático Competitivo, del inglés “Competitive Enzyme Immunoassay”), DAS-ELISA (ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo, del inglés

30

“Double antibody Sandwich-ELISA”), biosensores electroquímicos y biochips o microarrays de proteínas.

En otra realización preferida del método GAS6/SPP1 de la invención, la muestra biológica es una muestra de líquido; preferiblemente un líquido ocular.

En otra realización más preferida del método GAS6/SPP1 de la invención, la muestra biológica aislada se selecciona de una lista que consiste en una muestra de lágrimas, humor acuoso y humor vítreo; más preferiblemente la muestra es de humor acuoso.

10

Tras el paso a), el método GAS6/SPP1 de la invención comprende un paso b) en la que se comparan los niveles de GAS6 y SPP1 con límites de referencia para establecer el diagnóstico del sujeto. Concretamente los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en una muestra biológica aislada del sujeto, se comparan con los límites de referencia R1 y/o R2 (ambos límites de referencia previamente definidos en la presente invención).

15

Los niveles de la proteína SPP1 de una muestra biológica aislada del sujeto, se comparan con el límite de referencia R3. En la presente invención, el término “límite de referencia R3” se refiere al valor de referencia de los niveles de la proteína SPP1 que permite establecer si un sujeto padece glaucoma tras su comparación con los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en una muestra biológica aislada de dicho sujeto. El límite de referencia R3 se puede obtener a partir de análisis estadístico de los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en la muestra biológica aislada de un sujeto o en un grupo de muestras biológicas aisladas de sujetos que no padecen glaucoma (sujetos sanos o sujetos que padecen cataratas pero no glaucoma) y los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en la muestra de un sujeto o en un grupo de muestras de sujetos que padecen glaucoma (padecen glaucoma pero no cataratas o padecen glaucoma junto con cataratas); preferiblemente donde dicho análisis estadístico se realiza mediante curvas ROC.

20

25

30

En una realización preferida, el límite de referencia R3 es de 21586 pg/ml; preferiblemente donde dicho límite de referencia R3 es obtenido a partir de los niveles de SPP1 cuantificados en una muestra de líquido ocular, más preferiblemente humor acuoso.

35

En una realización preferida, el método GAS6/SPP1 de la invención es un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma en un sujeto, donde dicho sujeto padece cataratas (es decir, el sujeto ha sido diagnosticado previamente con cataratas), y donde dicho método comprende los siguientes pasos:

5

a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada de sujeto que padece cataratas, y

b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R2, y comparar los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R3,

10

en donde:

- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales o mayores que el límite de referencia R2, y si los niveles de la proteína SPP1 son iguales o mayores que el límite de referencia R3, el sujeto además padece glaucoma.

15

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso *in vitro* de la proteína GAS6 para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, de ahora en adelante “uso diagnóstico de GAS6 de la invención”.

20

En una realización preferida, el uso diagnóstico de GAS6 de la invención se refiere al uso *in vitro* de los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en una muestra biológica aislada para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto.

25

En otra realización preferida, el uso diagnóstico de GAS6 de la invención se refiere al uso *in vitro* de la proteína GAS6 para diagnosticar glaucoma en un sujeto, en donde el sujeto padece cataratas (es decir, el sujeto ha sido diagnosticado previamente con cataratas).

30

En una realización preferida del uso diagnóstico de GAS6 de la invención, el sujeto es un humano o un animal no humano.

En otra realización preferida del uso diagnóstico de GAS6 de la invención, la muestra biológica se selecciona de una lista que consiste en una muestra de lágrimas, humor

35

acuoso y humor vítreo; preferiblemente humor acuoso.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso *in vitro* de las proteínas GAS6 y SPP1 para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, de ahora en adelante “uso  
5 diagnóstico de GAS6/SPP1 de la invención”.

En una realización preferida, el uso diagnóstico de GAS6/SPP1 de la invención se refiere al uso *in vitro* de los niveles de las proteínas GAS6 y SPP1 cuantificados en una muestra biológica aislada para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto.  
10

En otra realización preferida, el uso diagnóstico de GAS6/SPP1 de la invención se refiere el uso *in vitro* de las proteínas GAS6 y SPP1 para diagnosticar glaucoma en un sujeto, en donde el sujeto padece cataratas (es decir, el sujeto ha sido diagnosticado previamente con cataratas).  
15

En una realización preferida del uso diagnóstico de GAS6/SPP1 de la invención, el sujeto es un humano o un animal no humano.

En otra realización preferida del uso diagnóstico de GAS6/SPP1 de la invención, la muestra biológica se selecciona de una lista que consiste en una muestra de lágrima, humor acuoso y humor vítreo; preferiblemente humor acuoso.  
20

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “kit GAS6 de la invención” que comprende medios para determinar *in vitro* los niveles de las proteínas GAS6 en una muestra biológica aislada de un sujeto.  
25

Los medios para determinar los niveles incluyen sin limitación sondas y/o anticuerpos capaces de detectar específicamente la proteína GAS6.

Así en una realización preferida, los medios para determinar *in vitro* los niveles de la proteína GAS6 del kit de la invención comprenden anticuerpos que detectan de forma específica la proteína GAS6 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto.  
30

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un kit, de ahora en adelante “kit GAS6/SPP1 de la invención” que comprende medios para determinar *in vitro* los niveles  
35

de las proteínas GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada de un sujeto.

Los medios para determinar los niveles incluyen sin limitación sondas y/o anticuerpos capaces de detectar específicamente las proteínas GAS6 y SPP1.

5

Así en una realización preferida, los medios para determinar *in vitro* los niveles de las proteínas GAS6 y SPP1 del kit de la invención comprenden anticuerpos que detectan de forma específica las proteínas GAS6 y SPP1 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto.

10

Además, el kit puede comprender otros componentes útiles en la realización de la presente invención, tales como, tampones, vehículos de entrega, portadores de material, componentes de control positivo y/o negativo, etc. Opcionalmente, dichos controles comprenden anticuerpos con modificaciones para su uso como controles, por ejemplo, anticuerpos que no reconocen los marcadores de la invención. Además de los componentes mencionados, los kits también pueden incluir instrucciones para practicar el objeto de la invención. Estas instrucciones pueden estar presentes en el kit mencionado en una variedad de formas, por ejemplo, en una hoja u hojas de papel en las que se imprime la información, en el envase del kit, en un prospecto, etc. Otro medio sería un soporte legible por ordenador, por ejemplo, un CD, un USB, etc., en el que la información esté registrada. Otro medio que puede estar presente es una dirección de sitio que puede utilizarse a través de Internet para acceder a la información de un sitio remoto. Cualquier medio conveniente puede estar presente en los kits.

15

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit GAS6 de la invención para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto "de ahora en adelante uso del kit GAS6 de la invención".

25

En otra realización preferida, el uso del kit GAS6 de la invención es para diagnosticar glaucoma en un sujeto, en donde el sujeto padece cataratas (es decir, el sujeto ha sido diagnosticado previamente con cataratas).

30

En una realización preferida del uso del kit GAS6 de la invención, el sujeto es un humano o un animal no humano.

35

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso del kit GAS6/SPP1 de la invención para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto “de ahora en adelante uso del kit GAS6/SPP1 de la invención”.

- 5 En otra realización preferida, el uso del kit GAS6/SPP1 de la invención es para diagnosticar glaucoma en un sujeto, en donde el sujeto padece cataratas (es decir, el sujeto ha sido diagnosticado previamente con cataratas).

10 En una realización preferida del uso del kit GAS6/SPP1 de la invención, el sujeto es un humano o un animal no humano.

En la presente invención se contempla a cada una de las realizaciones preferidas de los diferentes aspectos, ya sea solas o en combinación con el resto de las realizaciones preferidas.

15

## **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Fig. 1.** Western blot de muestras de humores acuosos agrupadas (A) y muestras individuales (B) para las proteínas GAS6 y SPP1.

20

**Fig. 2.** Análisis de los niveles de proteína GAS6 y SPP1 en las muestras de humores acuosos de pacientes con cataratas, glaucoma e ICL. **A.** Concentración de GAS6 y SPP1 en humores acuosos determinada mediante ELISA. **B.** Análisis ROC del valor diagnóstico de GAS6 y SPP1 de manera individual. **C.** Análisis ROC del valor diagnóstico de GAS6 y SPP1 de manera combinada.

25

## **EJEMPLOS**

### **1. MATERIALES Y MÉTODOS**

30

#### **Recogida de muestras de humor acuoso**

Los aspectos clínicos y éticos del estudio fueron aprobados por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario Infanta Leonor (Madrid, España), el Instituto Ophthalmedic y el Instituto I.P.O. (Palma de Mallorca, España). Todos los pacientes fueron informados y dieron su consentimiento por escrito para el uso de sus

35

muestras biológicas con fines de investigación. Se siguieron los principios éticos establecidos por España (LOPD 15/1999) y la Unión Europea (2000/C364/01). Todos los datos de los pacientes se procesaron de acuerdo con la Declaración de Helsinki (última revisión en 2013) y la Ley Nacional de Investigación Biomédica de España (14/2007, de 3 de julio).

Los humores acuosos se recogieron al comienzo de la cirugía con gotas anestésicas de lidocaína al 2% (p/v). Se empleó una cánula de Rycroft de calibre 30 en una jeringa de tuberculina de 1 ml para aspirar el humor acuoso. Se extrajo a través de una microincisión corneal (mics de 1 mm) bajo visión de microscopio quirúrgico, moviendo la cánula en paralelo al limbo desde la periferia hacia el centro de la cámara anterior del ojo. Se recogió el humor acuoso (0.3-0.4 ml) y se conservó a -20°C.

Para el estudio se utilizaron humores acuosos de sujetos de 3 grupos diferentes: ICL, cataratas y glaucoma (Tabla 1). El grupo ICL estaba formado por pacientes con un cristalino transparente (sujetos sin cataratas ni glaucoma) que se sometieron a una cirugía refractiva basada en la inclusión de una lente intraocular. El grupo de cataratas incluía a pacientes remitidos para cirugía de cataratas sin glaucoma y con cataratas no diabéticas. El grupo de glaucoma estaba formado por muestras de humor acuoso de pacientes con glaucoma remitidos para cirugía de cataratas. Se excluyeron a los pacientes con otras enfermedades oftalmológicas. Para el análisis de proteómica se agruparon muestras de cada condición mientras que para la validación se usaron tanto muestras agrupadas como individuales.

**Tabla 1.** Información de las muestras de humores acuosos empleadas.

| Muestras |           | Número (N) | Edad media $\pm$ SD (años) | Edad mínima (años) | Edad máxima (años) | Sexo (N) |       |
|----------|-----------|------------|----------------------------|--------------------|--------------------|----------|-------|
|          |           |            |                            |                    |                    | Hombre   | Mujer |
| TMT      | ICL       | 19         | 42.10 $\pm$ 11.42          | 22                 | 59                 | 8        | 11    |
|          | Cataratas | 40         | 67.27 $\pm$ 10.03          | 40                 | 82                 | 15       | 25    |
|          | Glaucoma  | 13         | 67.54 $\pm$ 15.72          | 26                 | 89                 | 4        | 9     |
| WB       | ICL       | 4          | 47.5 $\pm$ 14.43           | 26                 | 57                 | 1        | 3     |
|          | Cataratas | 5          | 68.6 $\pm$ 7.73            | 60                 | 79                 | 3        | 2     |
|          | Glaucoma  | 5          | 66.4 $\pm$ 12.66           | 51                 | 80                 | 1        | 4     |

|              |                        |    |                       |    |    |    |    |
|--------------|------------------------|----|-----------------------|----|----|----|----|
|              | <b>Grupo ICL</b>       | 4  | 45.25 ( $\pm 12.34$ ) | 31 | 57 | 1  | 3  |
|              | <b>Grupo cataratas</b> | 5  | 73.6 ( $\pm 14.10$ )  | 55 | 89 | 2  | 3  |
|              | <b>Grupo glaucoma</b>  | 4  | 62.25 ( $\pm 11.00$ ) | 55 | 74 | 1  | 3  |
| <b>ELISA</b> | <b>ICL</b>             | 39 | 43.38 $\pm$ 12.05     | 22 | 59 | 10 | 29 |
|              | <b>Cataratas</b>       | 92 | 69.32 $\pm$ 10.67     | 41 | 91 | 35 | 57 |
|              | <b>Glaucoma</b>        | 31 | 70.19 $\pm$ 20        | 26 | 89 | 10 | 21 |

\*TMT: análisis de proteómica, etiqueta de masas en tándem (del inglés “tándem tag mass”); WB: “Western blot”; ELISA: enzoinmunoanálisis de adsorción (del inglés: “Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay”).

5

#### **Aislamiento y purificación de exosomas**

Los exosomas presentes en los humores acuosos se aislaron utilizando la solución de precipitación comercial ExoQuick (EXOQ20A-1, System Biosciences). Las muestras de humor acuoso de las diferentes condiciones se agruparon según su estado patológico en un volumen de 500  $\mu$ l y luego se centrifugaron a 4°C, 3000 g durante 15 minutos para eliminar los restos celulares. Posteriormente, se agregó la solución de precipitación al sobrenadante y se incubó durante la noche (O/N) según las especificaciones del fabricante. Seguidamente, los humores acuosos se centrifugaron a 12000 g durante 90 minutos y a 4°C para precipitar los exosomas. Se desechó el sobrenadante y los pellets se resuspendieron en 250  $\mu$ l de PBS 1X y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Finalmente, los exosomas se diluyeron 1:100 en PBS 1X para su análisis en un NanoSight NS300 (Malvern Panalytical, Reino Unido) (Montero-Calle et al., 2021).

Para las muestras de humor acuoso y exosomas, se determinó la concentración de proteína utilizando el kit comercial MicroBCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) y se verificó mediante tinción con azul de Coomassie y plata después de SDS-PAGE al 10% (Garranzo-Asensio et al., 2022a, Mol Oncol 16, 2672-2692; Montero-Calle et al., 2023b, Cell Mol Life Sci 80, 141).

#### **25 Microscopía electrónica**

Los exosomas aislados a partir de 900  $\mu$ l de humores acuosos se resuspendieron en

110 µl de PBS 1X y de estos, 10 µl se utilizaron directamente para el análisis de microscopía electrónica con tinción negativa (Montero-Calle et al., 2021, Engineering 7, 1393-1412). Los exosomas se fijaron en PBS 1X y 4% de paraformaldehído durante 5 minutos y se incubaron en rejillas con revestimiento de carbono activado durante 5 minutos. Luego, las muestras se tiñeron negativamente con acetato de uranilo acuoso al 2%. Finalmente, las muestras se analizaron en un microscopio electrónico FEI Tecnai 12 equipado con un filamento LaB6 programado a 120 kV. Las imágenes se adquirieron con una cámara digital Ceta de FEI (Montero-Calle et al., 2021, Engineering 7, 1393-1412).

10

### **Espectrometría de masas**

Para el análisis de proteómica cuantitativa, se analizaron 5 µg del contenido de exosomas de las muestras de humor acuoso según protocolos establecidos (Montero-Calle et al., 2021, Engineering 7, 1393-1412; Montero-Calle et al., 2023, Cell Oncol (Dordr) 46, 697-715; Montero-Calle et al., 2023, Cell Mol Life Sci 80, 141; Solis-Fernandez et al., 2022, Cells 11). Los exosomas se resuspendieron en 100 µl de RIPA y luego se redujeron con 10 µl de TCEP a 100 mM durante 45 minutos a 37°C y 600 rpm. Después, las muestras se alquilaron con cloracetamida (concentración final de 40 mM) durante 35 minutos a temperatura ambiente (TA), en oscuridad y 600 rpm. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 30 minutos a TA con 200 µl de acetonitrilo al 100% (ACN) y 2.5 µl de una mezcla de bolitas magnéticas SeraMag (50% de bolitas hidrofílicas - 50% de bolitas hidrofóbicas, GE Healthcare) por muestra. Las bolitas magnéticas con las proteínas ancladas se lavaron dos veces con etanol al 70% y una vez con ACN. Se desechó el sobrenadante y las proteínas se digirieron O/N a 37°C y 600 rpm con 0.5 µg de tripsina porcina (Thermo Fisher Scientific) en 100 µl de HEPES a 200 mM, pH 8. Se recogieron los sobrenadantes después de 2 minutos de sonicación y cada una de las 10 muestras se marcó por separado con un reactivo Tandem Mass Tags (TMT) 10-plex diferente (Thermo Fisher Scientific). El marcaje consistió en dos pasos de incubación de 30 minutos a TA y 600 rpm con 10 µl del reactivo TMT correspondiente, y una incubación final con 10 µl de glicina a 1 M, pH 2.7 durante 30 minutos a TA y 600 rpm. Finalmente, las muestras se secaron al vacío y se reconstituyeron en 300 µl de ácido trifluoroacético al 0.1% (TFA) en H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>q antes de la separación de péptidos utilizando el kit de fraccionamiento (High pH Reversed-Phase Peptide Fractionation Kit, Thermo Fisher Scientific). En primer lugar, se equilibraron las columnas dos veces con 300 µl de ACN y dos veces con 300 µl de TFA al 0.1% en

35

H<sub>2</sub>Omq. Después de cargar los péptidos, las columnas se lavaron dos veces con 300 µl de TFA al 0.1% en H<sub>2</sub>Omq y los péptidos se separaron en 12 fracciones de 300 µl en trietilamina al 0.1% y cantidades crecientes de ACN (2.5-100%). Finalmente, las fracciones se secaron al vacío y se almacenaron a -80°C hasta su uso. Las muestras se reconstituyeron en 10 µl de ácido fórmico al 0.1% (FA) antes del análisis por LC-MS/MS.

El TMT de exosomas de humor acuoso se analizó en un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 480 (Thermo Fisher Scientific) equipado con la tecnología FAIMS Pro Duo. Se utilizó el Sistema UHPLC Vanquish Neo (Thermo Fisher Scientific) para la separación de péptidos. Cada fracción se cargó en una precolumna PepMap 100 C18 de 3 µm, 75 µm x 2 cm Nanoviper Trap 1200BA (Thermo Fisher Scientific) y se eluyó en una columna Easy-Spray PepMap RSLC C18 de 2 µm, 75 µm x 50 cm (Thermo Fisher Scientific) calentada a 50°C. La velocidad de flujo de la fase móvil fue de 300 nl/min y la composición de los tampones de elución fue de 0.1% de FA en H<sub>2</sub>Omq (Buffer A) y 0.1% de FA en 80% ACN (Buffer B). Los tampones se utilizaron en un gradiente de elución de 2 h: 0%-2% de buffer B durante 4 min, 2% de buffer B durante 2 min, 2%-42% de buffer B durante 100 min, 42%-72% de buffer B durante 14 min, 72%-95% de buffer B durante 5 min y 95% de buffer B durante 10 min. Las muestras se resuspendieron en 10 µl de buffer A, y se inyectaron 6 µl (fracciones 1 a 4) o 8 µl (fracciones 5 a 12) de cada muestra en el espectrómetro de masas. La ionización se realizó con un voltaje de 1900 V y una temperatura del capilar de 280°C. El método de escaneo consistió en un m/z de 350-1400, una resolución de Orbitrap de 60000 (a m/z 200), un valor de control automático de ganancia (Automatic Gain Control, AGC) del 300% y un tiempo máximo de inyección (IT) de 25 ms. Para la fragmentación mediante MS/MS, se seleccionaron los 12 iones precursores más intensos. La energía de colisión utilizada para la fragmentación fue de 34 y se adquirieron escaneos de MS/MS con una primera masa de 100 m/z, 100% de AGC, una resolución de 15000 (a m/z 200), un umbral de intensidad de  $2 \times 10^4$ , una ventana de aislamiento de 0.7 unidades de m/z, un IT máximo de 22 ms y el TurboTMT habilitado. Durante el cribado se rechazaron iones no asignados, con carga simple y mayor o igual a siete protones. El tiempo de exclusión dinámica utilizado para discriminar los iones seleccionados previamente fue de 30 s. Para el FAIMS, se utilizó un flujo de nitrógeno de 4 l/min y CVs -60V y -45V.

### **Análisis de datos**

El análisis de datos de espectrometría de masas (MS) se realizó con MaxQuant (versión

2.1.3). Los archivos de espectros de masa se buscaron en la base de datos Uniprot UP000005640\_9606.fasta Homo sapiens (humano) 2022 (20577 entradas, descargada en marzo de 2022). La tolerancia de masa del precursor se estableció en 4.5 ppm y la tolerancia de masa del reportero en 0.003 Da, permitiendo hasta dos fallos en el corte.

5 La carbamidometilación de cisteínas se estableció como modificación fija y la oxidación de metionina, la acetilación N-terminal y la fosforilación de Ser, Thr y Tyr se establecieron como modificaciones variables. Tanto los péptidos únicos como los péptidos "razor" con una longitud mínima de 7 aminoácidos y una masa máxima de 4600 Da se consideraron para la cuantificación. Los péptidos identificados se filtraron por su

10 fracción de intensidad de precursor (PIF) con un *false discovery rate* (FDR) del 0.01. Se excluyeron las proteínas identificadas como posibles contaminantes, mientras que las proteínas con un *ion score* superior al 99% y al menos un péptido único se seleccionaron para un análisis más detallado. La estimación de la cobertura de secuencia para las proteínas específicas se calculó con el porcentaje de aminoácidos coincidentes de los

15 péptidos identificados con una confianza mayor o igual al 95% dividido por el número total de aminoácidos en la secuencia. Para evitar interferencias debido a superposiciones, las intensidades de los iones reporteros se corrigieron de acuerdo con la hoja de datos del fabricante.

20 Se realizó una normalización del experimento TMT para igualar las diferencias en la suma total de señales de cada canal TMT, ya que se marcó la misma cantidad de proteína en cada muestra. Se realizó una normalización según la carga de la muestra (SL) y de la *Trimmed Mean* (TMM) siguiendo un protocolo establecido con R Studio (versión 4.1.1), utilizando los paquetes "tidyverse", "psych", "gridExtra", "scales" y

25 "ggplot2". Para determinar el agrupamiento de las muestras, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el paquete "stats" de R. Antes del análisis estadístico, se eliminaron los contaminantes y las proteínas *reverse*, se filtraron los datos (se consideraron las proteínas identificadas en al menos el 50% de las muestras para el análisis) y se realizó la imputación de datos no cuantificados mediante selección

30 aleatoria en una distribución gaussiana utilizando el paquete "imputeLCMD" de R. Se realizó un análisis de estadísticas t moderado con los paquetes de R Studio "dplyr", "tidyverse", "limma", "edgeR", "ggplot2" y "rstatix". Las proteínas desreguladas seleccionadas como estadísticamente significativas fueron aquellas identificadas con al menos un péptido único y una relación de expresión  $\geq 1.5$  o  $\leq 0.67$  y un valor  $p \leq 0.05$ .

35

**SDS-PAGE y Western blot**

Para el análisis de expresión de proteínas, se llevó a cabo Western blot después de SDS-PAGE. Se cargaron 5 µg de las muestras de humor acuoso (ICL N=4, Cataratas N=5 y Glaucoma N=5) en un gel de SDS-PAGE al 10% y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Posteriormente, las membranas se bloquearon durante 1 hora a TA con PBS-Tween (0.1%) suplementado con leche desnatada al 3% (buffer de bloqueo). Seguidamente, las membranas se incubaron con anticuerpos primarios a diluciones optimizadas en el buffer de bloqueo O/N a 4°C y con agitación (Tabla Suplementaria S2). Después de tres lavados de 10 minutos con PBS-Tween al 0.1%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (anticuerpos conjugados con HRP) diluidos en el buffer de bloqueo durante 1 hora (Tabla Suplementaria S2). Después de otros tres lavados, se utilizó el reactivo quimioluminiscente ECL Pico Plus (Thermo Fisher Scientific) para desarrollar la señal y el equipo Amersham Imager 800 (GE Healthcare, EE. UU.) para detectar la señal y obtener las imágenes. Se utilizó el software Image J para la cuantificación de las intensidades de las bandas.

**ELISA**

Se realizaron ensayos de ELISA para cuantificar la expresión de GAS6 y SPP1 (DY885B y DY1433, R&D) en muestras de humor acuoso de ICL (N=39), pacientes con cataratas (N=92) y pacientes con glaucoma (N=31), según protocolos establecidos (Garranzo-Asensio et al., 2019; Garranzo-Asensio et al., 2020; Garranzo-Asensio et al., 2022b). Para los ensayos de ELISA se usaron las muestras de humores acuosos completas, sin aislar los exosomas. En resumen, las microplacas de 96 pocillos se tapizaron con el anticuerpo de captura y se incubaron O/N. Después de tres lavados con PBS-Tween al 0.05%, las placas se bloquearon durante 2 horas con 200 µl de PBS suplementado con 0.5% de albúmina sérica bovina (BSA). Los lavados se repitieron después de cada incubación. Luego, se cargaron 2.5 µl de cada muestra de humor acuoso diluida en PBS-BSA al 0.05% por pocillo y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Después de otros tres lavados, se añadió el anticuerpo de detección a las placas y se incubó a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, las placas se incubaron de nuevo con estreptavidina-HRP a TA durante 20 minutos antes del revelado. La concentración de cada reactivo se preparó siguiendo las especificaciones del fabricante (R&D Systems). La concentración de proteína se determinó leyendo la densidad óptica a 495 nm en el lector de microplacas Spark multimode microplate reader (Tecan Trading AG).

### **Análisis estadístico**

Se utilizó Microsoft Excel para obtener la media, el error estándar de la media (SEM), los gráficos y la prueba t. El programa R Studio (versión 4.1.1) se utilizó para obtener los valores de la prueba U de Mann-Whitney no paramétrica y las curvas ROC (paquetes "ModelGood", "Epi" y "pROC"). Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0.05.

## **2. RESULTADOS**

En este estudio, se analizaron exosomas de humores acuosos, un fluido biológico poco explorado, para identificar proteínas asociadas a glaucoma que podrían ser útiles para su detección temprana después de la cirugía de cataratas o la inserción de una lente intraocular (LIO). Para ello, se ha empleado un enfoque de proteómica cuantitativa aprovechando una solución comercial de precipitación de exosomas -ExoQuick-. Los exosomas utilizados para el análisis mediante proteómica se aislaron de tres diferentes grupos de estudio: cataratas, glaucoma e ICL (individuos con lente transparente y ninguna de las patologías, cataratas ni glaucoma). Tras su análisis mediante espectrometría de masas TMT 10-plex y el análisis bioinformático de los datos, identificamos proteínas desreguladas en los tres grupos utilizando el software MaxQuant y el programa R. Posteriormente, se utilizaron los humores acuosos para validar la desregulación observada a nivel de exosomas mediante Western blot (WB) utilizando muestras individuales o agrupadas por patología. Finalmente, se evaluó la capacidad de GAS6 y SPP1 como biomarcadores de glaucoma en humores acuosos, y para discriminar a pacientes de glaucoma de controles ICL y cataratas mediante ELISA utilizando una colección de 162 muestras individuales de humores acuosos (39 ICL, 92 cataratas y 31 glaucoma).

### **Caracterización de los exosomas presentes en los Humores Acuoso**

Para identificar proteínas exosomales desreguladas asociadas a patologías oculares, se agruparon muestras de humor acuoso de pacientes con glaucoma (N = 13) y de individuos con ICL (N = 19) en 3 réplicas biológicas de cada grupo de estudios, mientras que las muestras de pacientes con cataratas (N = 40) se agruparon en 4. Primero se precipitaron las vesículas extracelulares presentes en los humores acuosos de los grupos de glaucoma, cataratas e ICL. Antes de realizar su análisis mediante espectrometría de masas, se realizaron controles de calidad de las muestras aisladas

para confirmar que se había realizado un aislamiento adecuado de los exosomas. Para su verificación, se utilizó Nanosight (NS300), microscopía electrónica (EM) y WB en muestras representativas. El Nanosight reveló vesículas aisladas en suspensión y proporcionó datos de tamaño y concentración para los tres grupos de pacientes. Las vesículas aisladas de las muestras de cataratas mostraron más heterogeneidad de tamaño, oscilando el tamaño promedio entre 130 y 170 nm, en concordancia con el tamaño de los exosomas. Además, el recuento de vesículas fue mayor en los pacientes de glaucoma ( $8.99 \times 10^8$  partículas/ml) que en cataratas e ICL ( $2.09 \times 10^8$  y  $5.12 \times 10^8$  partículas/ml, respectivamente). La microscopía electrónica mostró vesículas de no más de 150 nm, compatibles con el tamaño de vesículas exosomales. Finalmente, los análisis mediante tinción con Azul de Coomassie, tinción con plata y WB confirmaron diferencias en el contenido proteico entre los exosomas y los humores acuosos en los mismos grupos de pacientes. Es importante destacar que se observó la presencia de CD63, un marcador de proteínas específico de vesículas extracelulares, en las muestras de exosomas. En conjunto, estos hallazgos confirmaron un aislamiento exitoso de los exosomas de los humores acuosos.

### **Identificación de Proteínas Desreguladas en los Exosomas de Humores Acuoso**

Tras la caracterización de los exosomas, se lisaron 5  $\mu$ g de cada grupo de exosomas en un volumen final de 100  $\mu$ L del tampón RIPA y se analizaron mediante proteómica cuantitativa TMT 10-plex. Después de la digestión con tripsina, cada grupo de exosomas se etiquetó individualmente con un reactivo TMT diferente, y los péptidos se separaron en 12 fracciones según su hidrofobicidad, que posteriormente se analizaron individualmente mediante espectrometría de masas utilizando el espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 480 acoplado a FAIMS Pro Duo.

Los datos en crudo del espectrómetro de masas se analizaron con el software MaxQuant para la identificación y cuantificación de péptidos y proteínas. Después de la normalización de datos, se identificaron y cuantificaron un total de 828 péptidos y 192 proteínas en los humores acuosos. Posteriormente, antes de llevar a cabo los análisis de expresión diferencial, se investigaron más a fondo las proteínas identificadas utilizando diversas herramientas de bioinformática. Primero, se utilizó el análisis de ontología de genes para la identificación de los componentes celulares y los procesos biológicos enriquecidos. La ontología de genes reveló que más del 70% de las proteínas identificadas se han descrito previamente como proteínas extracelulares o exosomales.

Además, observamos que la mayoría de las proteínas identificadas y cuantificadas estaban relacionadas con la respuesta inmunológica, los procesos metabólicos o la respuesta a estímulos, asociados al papel biológico del humor acuoso. Estos resultados confirmaron la solidez de las proteínas identificadas y cuantificadas en las muestras biológicas utilizadas, el aislamiento adecuado de los exosomas de las muestras de humores acuosos y la calidad de los exosomas utilizados para el análisis de LC-MS/MS.

A continuación, mediante el análisis de PCA observamos grupos separados para el glaucoma, las cataratas y las muestras de control ICL, lo que sugiere la presencia de proteínas con expresión diferencial entre los grupos. Finalmente, se utilizaron todas las muestras para el análisis de datos y la identificación de proteínas con desregulación en las tres condiciones.

Se identificaron proteínas con desregulación utilizando el *moderated t test* con ratios de expresión  $\geq 1.5$  (sobrexpresadas) o  $\leq 0.67$  (subexpresadas), y un p-valor  $\leq 0.05$ . En total, se identificaron 6 proteínas subexpresadas en los exosomas de glaucoma y 10 proteínas con desregulación en los exosomas de cataratas (7 sobreexpresadas y 3 subexpresadas) en comparación con los exosomas de individuos con ICL. Además, se encontraron 17 proteínas con desregulación (3 sobreexpresadas y 14 subexpresadas) en los exosomas de cataratas en comparación con los exosomas de pacientes con glaucoma. De todas las proteínas con desregulación identificadas, FGB se encontró subexpresada en ambas patologías al compararla con los individuos control ICL, lo que sugiere el potencial de esta proteína como biomarcador de patologías oculares. Es interesante destacar que 5 de estas proteínas mostraron desregulación opuesta en ambas patologías oculares (SLC4A1 y TRIM33, subexpresadas en glaucoma; GAS6 y SPP1, sobreexpresadas en cataratas; y C1R, subexpresada en cataratas), lo que resalta el potencial de estas proteínas como biomarcadores de exosomas de humores acuosos para discriminar pacientes de cataratas o glaucoma de individuos sanos con ICL. En conjunto, se identificaron un total de 29 proteínas exosomales mediante LC-MS/MS, cuya desregulación se asoció a cataratas y/o glaucoma, y, por lo tanto, con potencial como biomarcadores de estas enfermedades.

Adicionalmente, es importante destacar que la mayoría de las proteínas se encontraron previamente en exosomas de otras patologías, ya sea en plasma, células, orina o derrames pleurales, lo que destaca la solidez del análisis de proteómica realizado.

### Validación

Posteriormente, se procedió a verificar los resultados de GAS6 y SPP1 para validar su papel como biomarcadores de cataratas y/o glaucoma según: i) su ratio de expresión en los tres análisis estadísticos realizados, ii) su potencial papel o asociación con enfermedades oculares, y iii) la disponibilidad de anticuerpos. Además, dado que el volumen de muestra individual de humores acuosa variaba entre 25 y 150 µl, lo que impidió aislar exosomas de muestras individuales, se planteó la hipótesis de que la mayoría de las proteínas con desregulación en los exosomas de los humores acuosa podrían validarse directamente utilizando muestras de humores acuosa, y por lo tanto podrían servir como biomarcadores de glaucoma en humor acuoso.

Para abordar esta cuestión, se centró el análisis en las proteínas GAS6 y SPP1 con anticuerpos disponibles para su validación mediante análisis de WB, ya sea utilizando muestras agrupadas (**Fig. 1A**) o muestras individuales de humores acuosa (**Fig. 1B**). A pesar de no utilizar exosomas, sino humores acuosa, los resultados de WB fueron bastante consistentes con los datos de cuantificación de proteómica. La desregulación de GAS6 y SPP1, que mostraron potencial como biomarcadores de glaucoma, se confirmó mediante WB en la comparación de pacientes con cataratas y controles de ICL. En conjunto, aunque existen diferencias con respecto a los datos de proteómica que estarían relacionadas con el uso de humores acuosa en lugar de exosomas, los resultados de inmunotinción permitieron plantear la hipótesis de que GAS6 y SPP1 validadas mediante WB en los humores acuosa podrían servir como biomarcadores de glaucoma.

### 25 **Análisis de GAS6 y SPP1 como Biomarcadores de Humores Acuosa para el Diagnóstico de Glaucoma**

Con el fin de abordar esta cuestión, se analizaron y cuantificaron mediante ELISA las diferencias en los niveles de expresión de GAS6 y SPP1 en humores acuosa de pacientes con glaucoma en comparación con pacientes con cataratas e ICL. Usando 162 muestras individuales de humores acuosa (39 ICL, 92 cataratas y 31 muestras de glaucoma), los niveles en los humores acuosa de GAS6 y SPP1 discriminaron significativamente a los pacientes de glaucoma de los pacientes de ICL o cataratas (**Fig. 2A**). La concentración media en pg/ml para GAS6 fue de 416.57 en ICL, 646.89 en cataratas y 1185.36 en muestras de glaucoma. Para SPP1, se obtuvo una concentración

media (pg/ml) de 14063.73 en muestras de ICL, 16080.71 en cataratas y 24279.04 en pacientes de glaucoma.

Finalmente, se determinó la sensibilidad y especificidad de estos candidatos a biomarcadores de glaucoma mediante curvas ROC. El área debajo de la curva (AUC) individual para discriminar a los pacientes de glaucoma de los pacientes de ICL o cataratas fue del 73% y 68.5%, respectivamente, para GAS6 y del 74.9% y 66.2%, respectivamente, para SPP1 (**Fig. 2B**). La combinación de GAS6 y SPP1 aumentó los valores de AUC al 76.1% y 68.7% para discriminar a los pacientes de glaucoma de los pacientes de ICL o de cataratas, respectivamente (**Fig. 2C**), con una sensibilidad del 65.6% y una especificidad del 87.7% y 88.5%, respectivamente. Además, mediante las curvas ROC se determinaron las concentraciones umbral para diferenciar a un paciente de glaucoma de un paciente de ICL o cataratas (**Fig. 2B-C**).

En conjunto, estos resultados confirmaron el valor predictivo de GAS6 y SPP1, que mejora en combinación en términos de sensibilidad y especificidad, para la discriminación de pacientes de glaucoma de pacientes de ICL y cataratas, y destacan su utilidad en combinación para la identificación de pacientes de glaucoma temprano después de determinar su concentración y clasificar a los individuos en función de su valor umbral cuantificado mediante ELISA.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, donde dicho método comprende cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra biológica  
5 aislada de un sujeto.

2. Método según la reivindicación 1, donde dicho método comprende los siguientes pasos:

- 10 a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra de biológica aislada del sujeto, y  
b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R1 y un límite de referencia R2,

15 en donde:

- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales o mayores que el límite de referencia R2 el sujeto padece glaucoma; o
- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales al límite de referencia R1 o se  
20 encuentran entre los límites de referencia R1 y R2, el sujeto padece cataratas.

3. Método según la reivindicación 1 o 2 para diagnosticar glaucoma en un sujeto, donde dicho sujeto padece cataratas, y donde dicho método comprende los siguientes pasos:

- 25 a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 en una muestra biológica aislada de un sujeto que padece cataratas, y  
b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R2,

30 en donde:

- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales o mayores que el límite de referencia R2, el sujeto además padece glaucoma.

4. Un método *in vitro* para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto, donde dicho método comprende cuantificar los niveles de las proteínas GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada de un sujeto.

5 5. Método según la reivindicación 4, donde dicho método comprende los siguientes pasos:

a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada del sujeto, y

10 b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R1 y un límite de referencia R2, y comparar los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R3,

en donde:

15

- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales o mayores que el límite de referencia R2, y si los niveles de la proteína SPP1 son iguales o mayores que el límite de referencia R3, el sujeto padece glaucoma; o

20 - si los niveles de la proteína GAS6 son iguales al límite de referencia R1 o se encuentran entre los límites de referencia R1 y R2, el sujeto padece cataratas.

6. Método según la reivindicación 4 o 5 para diagnosticar glaucoma en un sujeto, donde dicho sujeto padece cataratas, y donde dicho método comprende los siguientes pasos:

25 a) Cuantificar los niveles de la proteína GAS6 y SPP1 en una muestra biológica aislada de sujeto que padece cataratas, y

b) Comparar los niveles de la proteína GAS6 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R2, y comparar los niveles de la proteína SPP1 cuantificados en el paso a) con un límite de referencia R3,

30

en donde:

- si los niveles de la proteína GAS6 son iguales o mayores que el límite de referencia R2, y si los niveles de la proteína SPP1 son iguales o mayores que el

límite de referencia R3, el sujeto además padece glaucoma.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el sujeto es un humano o un animal no humano.

5

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la cuantificación se lleva a cabo mediante un método seleccionado de la lista que consiste en: Western blot, espectrometría de masas, ELISA (ensayo de inmunosorbente ligado a enzima), RIA (Radioinmunoensayo), EIA Competitivo (Inmunoensayo Enzimático Competitivo), 10 DAS-ELISA (ensayo ELISA Sándwich con Doble Anticuerpo), biosensores electroquímicos y biochips o microarrays de proteínas.

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la muestra biológica se selecciona de una lista que consiste en una muestra de lágrimas, humor 15 acuoso y humor vítreo; preferiblemente humor acuoso.

10. Uso *in vitro* de la proteína GAS6 para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto.

20 11. Uso *in vitro* de la proteína GAS6 y SPP1 para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto.

12. Uso según la reivindicación 10 u 11 para diagnosticar glaucoma en un sujeto, en donde el sujeto padece cataratas.

25

13. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde el sujeto es un humano o un animal no humano.

14. Un kit que comprende medios para determinar *in vitro* los niveles de la proteína 30 GAS6 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto.

15. Kit según la reivindicación 14, en donde los medios comprenden anticuerpos que detectan de forma específica GAS6.

35 16. Un kit que comprende medios para determinar *in vitro* los niveles de las proteínas

GAS6 y SPP1 en una muestra de humor acuoso aislada de un sujeto.

17. Kit según la reivindicación 16, en donde los medios comprenden anticuerpos que detectan de forma específica GAS6 y SPP1.

5

18. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 14 o 15, o del kit según la reivindicación 16 o 17, para diagnosticar glaucoma o cataratas en un sujeto.

19. Uso *in vitro* según la reivindicación 18, para diagnosticar glaucoma en un sujeto, en  
10 donde el sujeto padece cataratas.

20. Uso *in vitro* del kit según la reivindicación 19, donde el sujeto es un humano o un animal no humano.

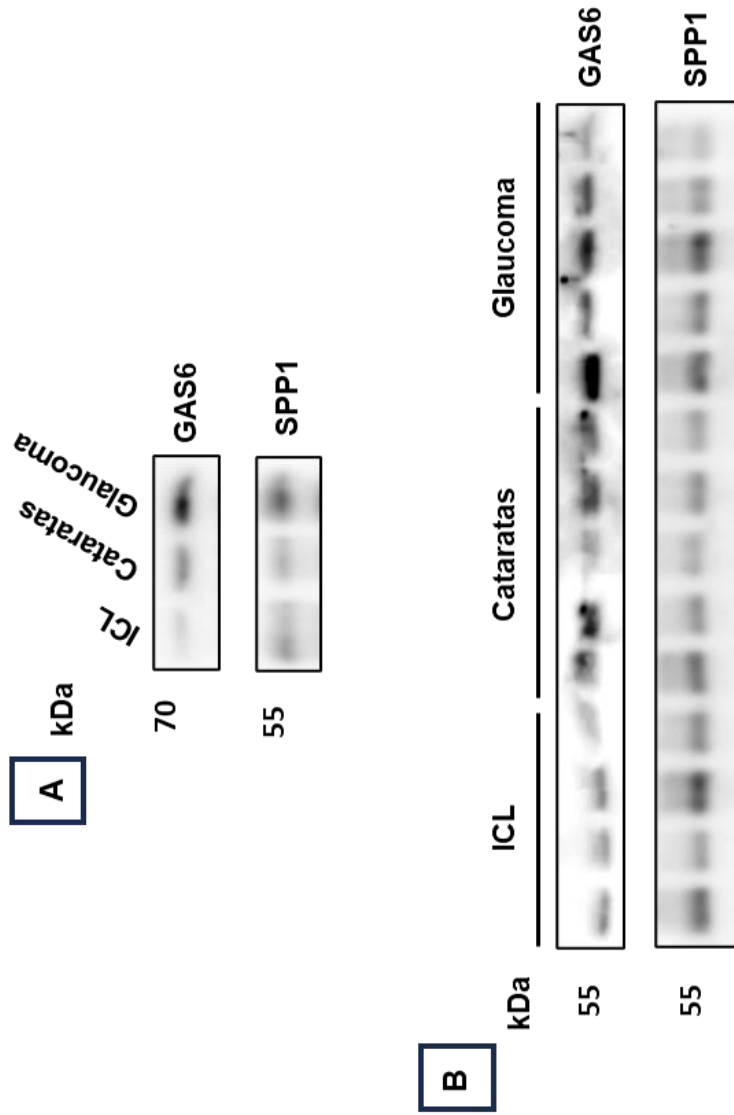


Fig. 1

**A**

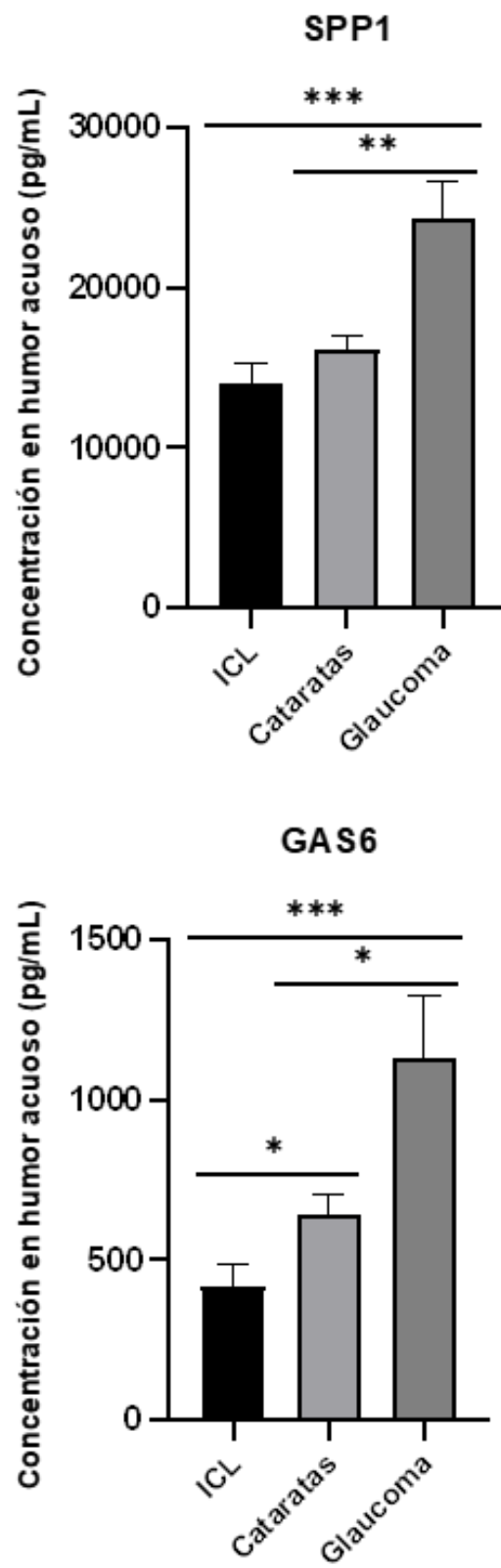


Fig. 2

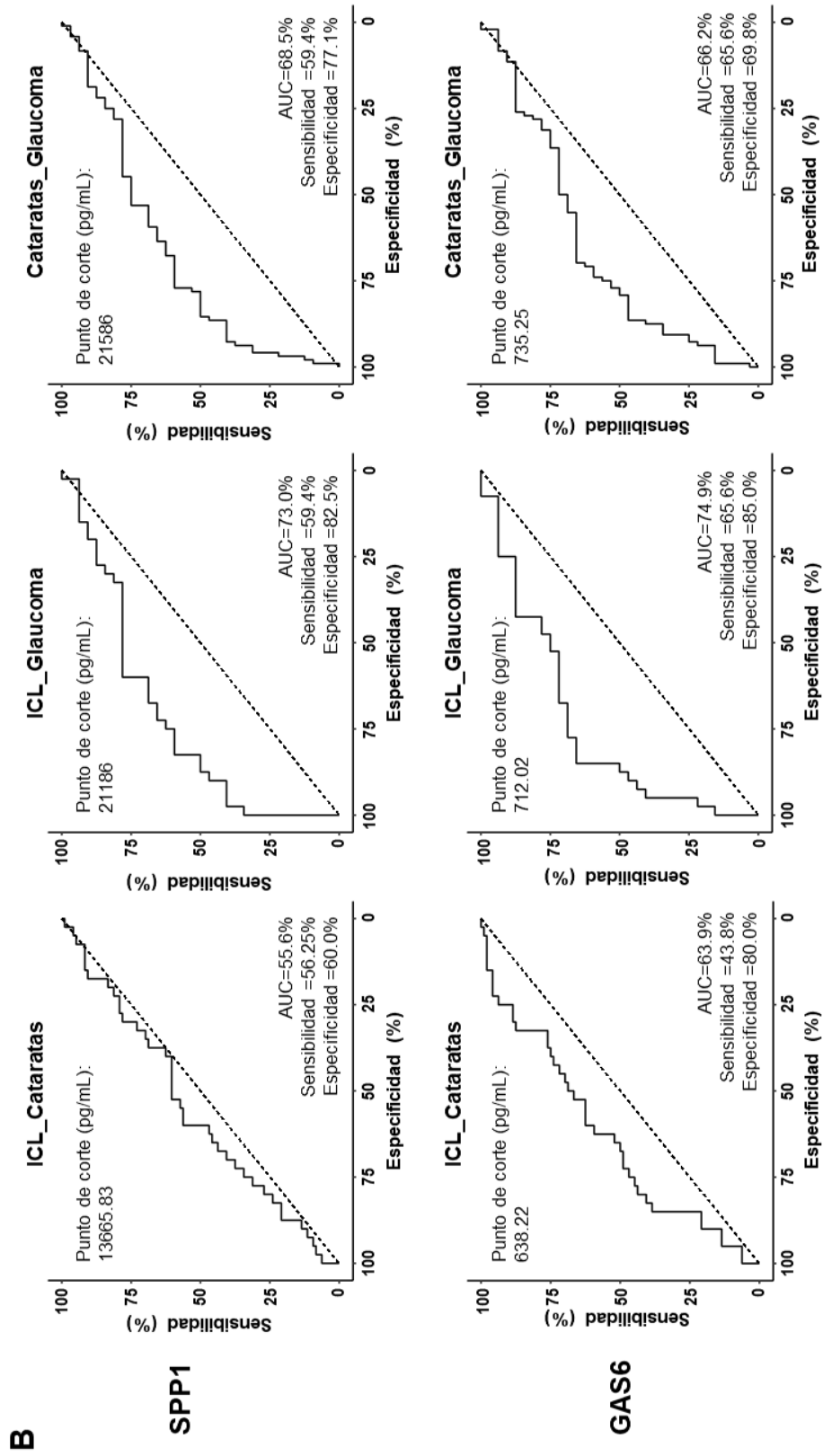


Fig. 2 (contin.)

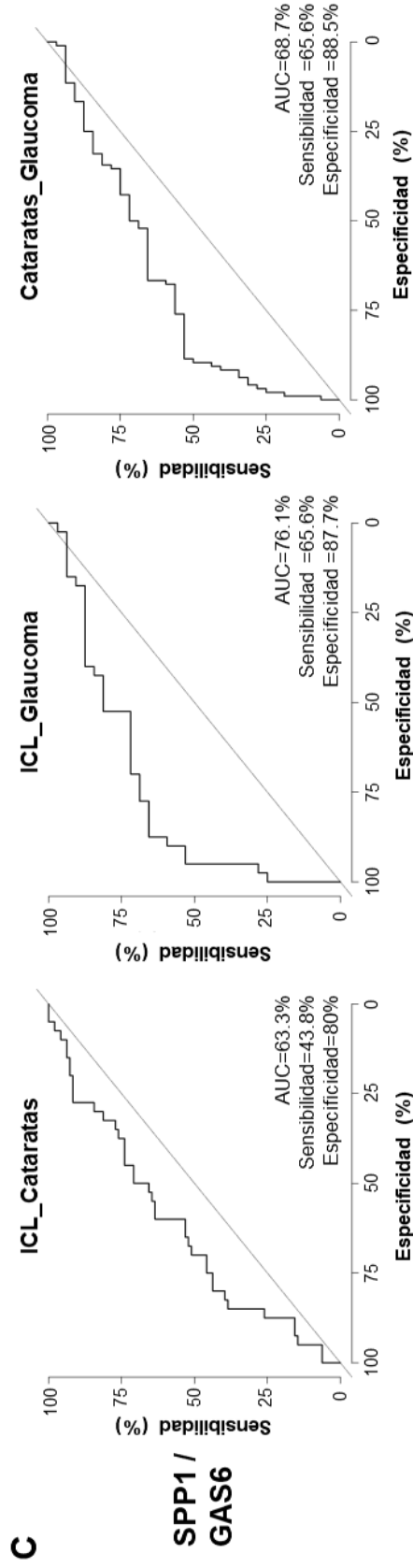


Fig. 2 (contin.)



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202430051

②② Fecha de presentación de la solicitud: 22.01.2024

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. cl.: **G01N33/68** (2006.01)  
**G01N33/487** (2006.01)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

| Categoría | ⑤⑥ Documentos citados  | Reivindicaciones afectadas |
|-----------|--|----------------------------|
| X         | WO 2020213969 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 22/10/2020, ejemplo 1,   | 14-15                      |
| A         | ZHAO, M. et al. Osteopontin drives retinal ganglion cell resiliency in glaucomatous optic neuropathy. Cell Reports, septiembre 2023, Vol. 42, Nº 9, artículo nº: 113038 [en línea] [recuperado el 05/11/2024], ISSN 2211-1247 <DOI: 10.1096/fj.202002218R>   | 1-20                       |
| A         | WO 2016100738 (RUGA CORPORATION; MIAO, YU REBECCA) 23/06/2016  | 1-20                       |
| A         | NIKHALASHREE, S. et al. Detection of proteins associated with extracellular matrix regulation in the aqueous humour of patients with primary glaucoma. Current Eye Research, septiembre 2019, Vol. 44, Nº 9, páginas 1018-1025 [en línea] [recuperado el 05/11/2024], ISSN 0271-3683 (print), ISSN 1460-2202 (online) <DOI: 10.1080/02713683.2019.1608261>. página 7, párrafo 2; | 1-20                       |

#### 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  
19.11.2024

Examinador  
M. Rodríguez Venegas

Página  
1/2

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, CAPLUS, WPI, INTERNET, BIOSIS