

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 079 579**

21 Número de solicitud: 202530172

51 Int. Cl.:

G01N 15/14 (2014.01) **G01N 33/68** (2006.01)
G01N 15/149 (2014.01)
G01N 15/1433 (2014.01)
G01N 33/49 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/563 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

28.02.2025

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.09.2026

71 Solicitantes:

SERVICIO ANDALUZ DE SALUD (60,00%)
Avda. de la Constitución, 18
41071 Sevilla (Sevilla) ES;
CONSORCIO CENTRO DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA EN RED M.P. (30,00%) y
UNIVERSIDAD DE GRANADA (10,00%)

72 Inventor/es:

MARTÍNEZ HEREDIA, Luis;
GARCIA FONTANA, Beatriz;
GARCIA FONTANA, Cristina;
MUÑOZ TORRES, Manuel y
CARAZO GALLEGU, Ángel

74 Agente/Representante:

ESCUDEUO PRIETO, Nicolás Enrique

54 Título: **MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIPOFOSFATASIA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

57 Resumen:

La presente invención se refiere a un método in vitro para el diagnóstico de hipofosfatasia (HPP) en un paciente, donde el método comprende determinar la expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente, donde una reducción del porcentaje de la población de neutrófilos que expresa TNSALP de al menos el 15 % con respecto a un valor de referencia o donde detectar la expresión de TNSALP en menos de un 30 % de la población de neutrófilos es indicativo de que el paciente sufre de hipofosfatasia. La invención también describe un método para seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasia, así como un kit para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente y usos del kit.

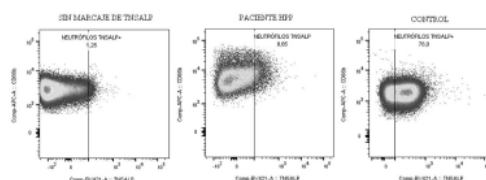


FIG. 2

ES 3 079 579 A1

DESCRIPCIÓN**MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE HIPOFOSFATASIA
MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO**

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra, dentro del sector de la biotecnología médica, en el diagnóstico de enfermedades genéticas. Más concretamente, la invención se refiere a
10 métodos diagnósticos para detectar hipofosfatasia (HPP) en un paciente.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La hipofosfatasia (HPP) es una enfermedad genética rara causada por mutaciones en el
15 gen ALPL, que resultan en la pérdida de función de la enzima fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP), crucial para la mineralización ósea (Villa-Suárez, J.M. et al, "Hypophosphatasia: A Unique Disorder of Bone Mineralization", *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 4303). Los pacientes con HPP suelen presentar una deficiente mineralización ósea. En este sentido, el diagnóstico de HPP es complicado debido al solapamiento de su
20 sintomatología con la de otras enfermedades de afectación ósea más prevalentes. Así, numerosos pacientes son diagnosticados erróneamente y, en consecuencia, no son tratados de forma adecuada. Evidencias recientes demuestran que la prevalencia de hipofosfatemia (HPP) en España podría ser el doble de la originalmente documentada (Martínez-Heredia L. et al, "Systemic effects of hypophosphatasia characterization of two
25 novel variants in the ALPL gene", *Front. Endocrinol.* 2024, 14:1320516).

El diagnóstico estándar de HPP en la práctica clínica puede incluir la medición de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) en suero, la secuenciación del gen ALPL, y/o pruebas radiográficas:

30

- Pruebas bioquímicas: El diagnóstico estándar de HPP incluye la medición de la actividad de fosfatasa alcalina (ALP) total en suero. Los niveles de ALP total en suero son indicativos de actividad de TNSALP porque esta contribuye en un 80% aproximadamente a la actividad total. Para la interpretación del resultado se han de
35 consultar los valores de referencia establecidos por la Federación Internacional de Química Clínica (IFCC) o el estudio CALIPER en población pediátrica para cada sexo

o grupo de edad. A la hora de establecer el diagnóstico de HPP es también decisivo determinar la concentración en suero de sustratos de TNSALP, tales como piridoxal-5'-fosfato (PLP), que pueden ser indicativos del grado de severidad. La interpretación de los resultados se basa en valores de referencia establecidos por la IFCC. No obstante, la presencia de niveles normales de PLP no descarta el diagnóstico de HPP ya que, en algunas ocasiones, existen mutaciones en el gen ALPL que dan lugar a una actividad deficiente de TNSALP sin elevación de sustratos como PLP.

Con respecto a las pruebas bioquímicas, la determinación de actividad ALP total en sangre es la medida más fiable mientras que las determinaciones de PLP suelen ser complementarias. Sin embargo, actualmente existe una falta de estandarización de los valores de referencia de los niveles de ALP circulante en la práctica clínica. Por otra parte, aunque la mayor contribución a la actividad de ALP total procede de TNSALP, hay otras isoenzimas de fosfatasa alcalina (ALP) que pueden compensar la actividad de TNSALP. Debido a todo esto, se han diagnosticado casos de hipofosfatasia con valores cercanos a la normalidad e incluso dentro del rango establecido por la IFCC lo que pone de manifiesto algunos de los problemas que dan lugar a un infradiagnóstico de esta enfermedad.

- Pruebas genéticas: El diagnóstico de HPP se puede confirmar con la presencia de mutaciones en el gen ALPL. La detección de mutaciones se lleva a cabo habitualmente mediante secuenciación de las zonas codificantes del gen ALPL y los límites exón/intrón. Sin embargo, en la práctica clínica no se secuencian regiones no codificantes o promotoras del gen, por lo que algunas mutaciones pueden pasar desapercibidas si se localizan en zonas intrónicas o reguladoras. Estudios recientes han mostrado que algunos pacientes con niveles disminuidos de ALP presentan mutaciones en regiones no codificantes del gen ALPL que pueden originar una actividad deficiente en TNSALP. Además, tampoco se secuencian otros potenciales genes reguladores que pueden afectar a la actividad de TNSALP. Debido a esto, aquellos pacientes que presenten mutaciones en zonas reguladoras o intrónicas de ALPL o en otros genes reguladores de TNSALP, serán infradiagnosticados debido a las limitaciones en las técnicas convencionales.
- Pruebas radiográficas: Los hallazgos radiográficos constituyen un factor importante en la confirmación del diagnóstico de HPP, sobre todo en las formas perinatal y pediátricas, y pueden ofrecer evidencias de hipomineralización y otros rasgos característicos. Por

otra parte, pese a que las pruebas radiográficas funcionan muy bien en pacientes que muestran síntomas desde el nacimiento o la niñez, la enfermedad cursa con elevada variabilidad genética y clínica cuando se desarrolla en etapas más adultas. Así, el cuadro clínico suele ser bastante amplio confundiéndose con otro tipo de patologías más prevalentes como puede ser la osteoporosis. Además, aunque la disminución de la mineralización ósea es uno de los síntomas patognomónicos de la enfermedad, existen pacientes con HPP sin afectación ósea, por lo que este tipo de prueba no implica la realización de un diagnóstico certero de HPP.

En este contexto, se requiere un método de diagnóstico complementario que aumente la sensibilidad del diagnóstico para aquellos pacientes en los que no se haya identificado la causa de hipofosfatemia debido a alguna de las situaciones mencionadas con anterioridad a pesar de presentar manifestaciones clínicas y bioquímicas compatibles con HPP.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En vista de la necesidad detectada en el estado de la técnica, la presente invención propone un método diagnóstico para detectar hipofosfatemia (HPP) en un paciente mediante citometría de flujo, de tal manera que se puedan determinar los porcentajes de células que expresan el marcador TNSALP en neutrófilos.

Así, en un primer aspecto la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de hipofosfatemia (HPP) en un paciente, donde el método comprende determinar el nivel de expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente, donde una reducción en el porcentaje de la población de neutrófilos que expresa TNSALP de al menos el 15% con respecto a un valor de referencia o donde detectar la expresión de TNSALP en menos de un 30% de la población de neutrófilos es indicativo de que el paciente sufre de hipofosfatemia.

En el contexto de la invención, el término “neutrófilos” se refiere a un tipo de glóbulos blancos dentro de la categoría de los granulocitos o células polimorfonucleares, y habitualmente contienen un núcleo dividido en 2-5 lóbulos. Su función principal es la fagocitosis. Los neutrófilos son el tipo de leucocito más abundante en sangre en el ser humano, donde puede representar el 50-60% del total de glóbulos blancos. En el contexto de la invención, el término “eosinófilos” se refiere a otro tipo de granulocito (células

polimorfonucleares) dentro de los leucocitos, y se caracteriza por poseer un núcleo bilobulado. Los eosinófilos están involucrados en la defensa contra parásitos y sus mecanismos de acción han sido ampliamente estudiados en las alergias. Los eosinófilos suponen entre un 1-3% del total de glóbulos blancos. En el contexto de la invención, el término “monocitos” se refiere a un tipo de glóbulos blancos (leucocitos) agranulocitos. Su principal función es la de fagocitar diferentes microorganismos o restos celulares. Los monocitos humanos se dividen en tres poblaciones principales; clásico (CD14+CD16-), no clásico (CD14^{dim}CD16+) e intermedio (CD14+CD16+). Cada uno de estos subconjuntos se distingue entre sí por la expresión de distintos marcadores de superficie y por sus funciones en la homeostasis y la enfermedad. Los monocitos representan el 2-8 % de los leucocitos en la sangre. Las distintas subpoblaciones de glóbulos blancos de interés se determinan mediante la combinación de anticuerpos específicos, dirigidos a marcadores de dichas subpoblaciones de interés. Así, en un modo de realización, los neutrófilos se determinan como una población de células CD16+ y CD66b+. De manera similar, en un modo de realización, los eosinófilos se determinan como una población de células CD16- y CD66b+. Finalmente, en un modo de realización, los monocitos se determinan como una población de células CD14+, CD16-, CD66b- (monocitos clásicos), como una población de células CD14+, CD16+, CD66b- (monocitos intermedios), y/o como una población de células CD14-, CD16+, CD66b- (monocitos no clásicos).

En el contexto de la invención, el término “hipofosfatasa” (HPP) define una enfermedad rara del metabolismo mineral óseo causada por un déficit de actividad de la fosfatasa alcalina, debido a la existencia de mutaciones en el gen ALPL. En 2019 se estimó que la prevalencia de HPP leve en España podría ser de aproximadamente 1/3100, y que podría haber más de 15.000 pacientes potenciales afectados con formas leves de HPP infradiagnosticadas debido a la falta de reconocimiento en la práctica clínica. Las manifestaciones clínicas más comunes ocurren a nivel óseo, pero la HPP tiene una expresión clínica muy variada: defectos de mineralización ósea, mayor riesgo de fracturas, pérdidas dentales prematuras, así como síntomas musculares, respiratorios, renales y reumatológicos. Dependiendo de la mutación concreta que pueda sufrir un paciente, existen distintos grados de afectación, por lo que se han clasificado varios subtipos de HPP: hipofosfatasa letal perinatal, hipofosfatasa benigna perinatal, hipofosfatasa infantil, hipofosfatasa letal perinatal, hipofosfatasa de inicio en la infancia, hipofosfatasa adulta, odontohipofosfatasa.

En el contexto de la invención, el término “paciente” o “sujeto” se refiere a un humano de cualquier edad o raza. Tal como se utiliza en el presente documento, “muestra” o “muestra biológica” significa material biológico aislado del sujeto. La muestra biológica puede contener cualquier material biológico adecuado para determinar el nivel de expresión de

5 TNSALP en una población de neutrófilos, en una población de eosinófilos y/o en una población de monocitos del sujeto. La muestra puede aislarse de cualquier tejido o fluido biológico adecuado como, por ejemplo, sangre. Así, en un modo de realización, la muestra biológica es una muestra de sangre. En el contexto de la invención, el término “valor de referencia”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un valor de laboratorio

10 utilizado como referencia para los datos obtenidos por exámenes de laboratorio de sujetos o muestras recogidas de sujetos. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior y/o inferior; un rango de valores; un valor mediano, un valor medio o un valor en comparación con un valor de control determinado. Se tienen en cuenta varias consideraciones a la hora de determinar

15 el valor de referencia del marcador. Entre tales consideraciones se encuentran la edad, o la condición física referida a la salud general de los sujetos control. Un valor de referencia puede basarse en el valor de una muestra individual, como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que se está analizando, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, por ejemplo, de una

20 población de sujetos de un grupo de edad cronológicamente emparejado. Por ejemplo, se puede tomar, como grupo de referencia, un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 o preferiblemente más de 1000 sujetos, clasificados preferiblemente de acuerdo con las consideraciones anteriores, por ejemplo, según varias categorías de edad.

25 En la presente invención, la comprobación de si existe una reducción del porcentaje de la población de neutrófilos, del porcentaje de la población de eosinófilos y/o del porcentaje de la población de monocitos que expresa TNSALP con respecto a un valor de referencia se realiza comparando el número relativo de células en cada subgrupo de glóbulos blancos de interés que expresa TNSALP en la muestra del paciente, con el número relativo de

30 células en dichos subgrupo de glóbulos blancos que expresa TNSALP en una muestra control, por ejemplo, en una muestra procedente de un sujeto sano o de sujetos sanos (es decir, sujetos que no padecen HPP). Una vez establecido el valor de referencia, se puede comparar el porcentaje de la población de neutrófilos, el porcentaje de la población de eosinófilos y/o el porcentaje de la población de monocitos que expresa TNSALP entre la

35 muestra del paciente sospechoso de padecer HPP y la muestra del sujeto (o sujetos) control. Así, se pueden asignar un nivel de “reducción” si se observan diferencias que

puedan resultar significativas usando métodos estadísticos conocidos para el experto en la materia. En modos particulares de realización de la invención, una disminución en el valor del porcentaje de la población de neutrófilos, del porcentaje de la población de eosinófilos y/o del porcentaje de la población de monocitos que expresa TNSALP por debajo del valor de referencia de al menos el 15%, el 20%, el 30%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 97,5%, el 99%, el 99,5% de reducción o incluso más reducción en comparación con el valor de referencia se considera un nivel de expresión "reducido". Es decir, en modos particulares de realización de la invención, una disminución en el valor del porcentaje de la población de neutrófilos, del porcentaje de la población de eosinófilos y/o del porcentaje de la población de monocitos que expresa TNSALP por debajo del valor de referencia de al menos 0,85 veces (i.e., reducción del 15%), 0,8 veces, 0,7 veces, 0,6 veces, 0,5 veces, 0,4 veces, 0,3 veces, 0,2 veces, 0,1 veces, 0,05 veces, 0,025 veces, 0,01 veces, 0,005 veces o incluso menos en comparación con el valor de referencia se considera un nivel de expresión "reducido". En modos de realización de la invención, se puede determinar que un paciente sufre de hipofosfatasia cuando se detecta la expresión de TNSALP en menos de un 30%, en menos de un 25%, en menos de un 20%, en menos de un 15%, en menos de un 10%, menos de un 9%, menos de un 8%, menos de un 7%, menos de un 6%, menos de un 5%, menos de un 4%, menos de un 3%, menos de un 2%, o menos de un 1% de la población de neutrófilos. En un modo de realización de la invención, la población de neutrófilos que expresa TNSALP se refiere al valor mediano.

En el contexto de la invención, el término "TNSALP" (también conocido como ALPL, HOPS, TNALP, TNAP, TNSALP) se refiere a la fosfatasa alcalina no específica de tejido codificada por el gen ALPL con número de registro en la base de datos de Ensembl: ENSG00000162551. TNSALP es una isoforma de fosfatasa alcalina con un 50% de identidad con las otras tres fosfatasas alcalinas presentes en humanos, las otras tres son específicas de tejido: isoforma placentaria (PLAP), isoforma de células germinales (GCAP) e isoforma intestinal (IAP). Por su parte, TNSALP se encuentra mayoritariamente en hueso, hígado y riñón. Tal y como se usa en el presente documento, el término "TNSALP" se refiere a la isoforma ósea (BAP), que es la expresada por neutrófilos. TNSALP es una ectoenzima que se une a la membrana plasmática a través de una molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI). En un modo de realización de la invención, la evaluación del porcentaje de la población de neutrófilos que expresa TNSALP se refiere a la expresión de esta proteína en la superficie celular. En un modo de realización de la invención, la determinación del nivel de expresión de TNSALP se lleva a cabo por citometría de flujo.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasa (HPP), donde el método comprende determinar el nivel de expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente, donde una reducción del porcentaje de la población de neutrófilos que expresa TNSALP de al menos un 15% con respecto a un valor de referencia o donde detectar la expresión de TNSALP en menos de un 30% de la población de neutrófilos es indicativo de que el paciente es seleccionado para tratamiento para hipofosfatasa.

En el contexto de la invención, el término “tratamiento” se refiere a cualquier tipo de terapia que tenga como objetivo prevenir, mejorar o reducir la susceptibilidad a una afección clínica como se describe en este documento. El efecto del tratamiento puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente la aparición de un trastorno o de síntomas del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o un efecto adverso atribuible al trastorno. En un modo de realización de la invención, el tratamiento para hipofosfatasa (HPP) es un tratamiento de sustitución enzimática, preferiblemente un tratamiento con asfotasa alfa, más preferiblemente un tratamiento infantil con asfotasa alfa, indicado para niños. En otro modo de realización, el tratamiento para hipofosfatasa (HPP) es un tratamiento paliativo con vitamina D y/o calcio.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un kit que comprende reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente, donde los reactivos son un set de anticuerpos que se unen específicamente a: (a) CD16, CD66b, y a (b) TNSALP, donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos totales presentes en el kit.

En el diseño del kit de la invención hay que tener en cuenta que los neutrófilos expresan CD15, CD16 y CD66b, que los monocitos expresan CD14, que los eosinófilos no expresan CD16 y que los basófilos expresan CD123. Por tanto, podría elaborarse un kit que llevara CD15, CD16, CD66b para la determinación positiva de neutrófilos y exclusión de eosinófilos, CD14 para la exclusión de monocitos y CD123 para la exclusión de basófilos, además de añadir el anticuerpo anti TNSALP (isoforma ósea). Así, en un modo de realización, el kit comprende reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos, el porcentaje de una población de eosinófilos y/o el porcentaje de una población de monocitos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente, donde los reactivos son un set de anticuerpos que se unen específicamente a: (a) CD14, CD16, y/o CD66b, y a (b) TNSALP, donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los

- reactivos totales presentes en el kit. En otro modo de realización, el kit comprende reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos, el porcentaje de una población de eosinófilos, el porcentaje de una población de basófilos y/o el porcentaje de una población de monocitos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente,
- 5 donde los reactivos son un set de anticuerpos que se unen específicamente a: (a) CD14, CD15, CD16, CD66b, y/o CD123 y a (b) TNSALP, donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos totales presentes en el kit. En modos de realización de la invención, los reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos, el porcentaje de una población de eosinófilos y/o el porcentaje de una población
- 10 de monocitos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente comprende al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, o el 100% de los reactivos totales presentes en el kit.
- 15 En un cuarto aspecto, la invención se refiere a un uso de un kit de acuerdo con la presente invención en un método *in vitro* para el diagnóstico de hipofosfatasa (HPP) en un paciente, o en un método para seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasa (HPP).
- 20 En un quinto aspecto, la invención se refiere a un uso del nivel de expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente, para la obtención de datos útiles para:
- a. el diagnóstico de hipofosfatasa (HPP), y
 - b. seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasa (HPP).
- 25 Otros aspectos de la invención se describen las reivindicaciones del presente documento.
- Todos los términos y modos de realización descritos anteriormente son aplicables a cualquier aspecto y modo de realización de la invención. De acuerdo con la presente
- 30 invención, el término en singular “el”, “la”, “un”, “uno”, “una”, se refiere igualmente a su correspondiente en plural “los”, “las”, “unos”, “unas”, salvo que se desprenda del contexto que claramente el término se refiere a una especie en el singular. El término “comprende” o “que comprende”, tal y como se usa en el presente documento, también describe “consiste en” o “que consiste en” de acuerdo con la práctica de patentes generalmente
- 35 aceptada.

EJEMPLOS

La siguiente invención se describe por medio de los siguientes ejemplos, que deben interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

5

Ejemplo 1: Detección de TNSALP en glóbulos blancos por citometría de flujo como marcador de hipofosfatasia (HPP)

Tal y como se ha indicado anteriormente, la hipofosfatasia (HPP) se debe a mutaciones en el gen ALPL que resultan en la pérdida de función de la enzima fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNSALP). En este sentido, se sabe desde hace tiempo que los leucocitos expresan actividad fosfatasa alcalina y que la baja producción de TNSALP en la hipofosfatasia se puede utilizar como marcador de esta afección (Beisel WR, "Absence of leukocyte alkaline phosphatase activity in hypophosphatasia", *Blood* 1959, 14:975-7).

Dentro del conjunto de los glóbulos blancos, TNSALP se expresa particularmente en la membrana plasmática y en compartimentos intracelulares de los neutrófilos. Por este motivo, estudios previos han usado la determinación de fosfatasa alcalina en neutrófilos como herramienta para el diagnóstico de HPP (Iqbal S.J. et al, "Neutrophil alkaline phosphatase (NAP) score in the diagnosis of hypophosphatasia", *Clinica Chimica Acta* 302 (2000) 49-57). Sin embargo, en los métodos ya conocidos en el estado de la técnica, la presencia de TNSALP en neutrófilos se observa mediante técnicas colorimétricas que tiñen el interior celular, ya que se pensaba que la expresión de TNSALP se daba exclusivamente en el interior celular de los neutrófilos en unos compartimentos de gránulos específicos y no en la membrana celular. Por este motivo, esta técnica anterior se considera cualitativa y no cuantitativa. En este sentido, el artículo Iqbal S.J. et al (*supra*) menciona que aquellos pacientes con mutaciones en heterocigosis pueden presentar un NAP score dentro de rango, por lo que esta medida es mucho menos sensible que la que se propone para la presente invención.

Así, dado que TNSALP se expresa en la superficie de los neutrófilos y no solo en el interior, se ha desarrollado un método de detección de la proteína más sensible mediante citometría de flujo, usando un anticuerpo monoclonal específico. Esta técnica es rápida, eficaz y económica, permitiendo detectar a pacientes que podrían ser infradiagnosticados con los métodos tradicionales.

35

1.1 Citometría de flujo para la cuantificación de granulocitos (neutrófilos y/o eosinófilos) y monocitos que expresan TNSALP

Para el presente estudio preparó una cohorte que incluía 10 individuos control sanos y 10
 5 pacientes con hipofosfatasia macheados por edad y sexo y mayores de 18 años. Los
 pacientes proceden del Hospital Universitario Clínico San Cecilio, Granada, España, y son
 provenientes de distintas áreas de la provincia de Granada y Málaga. Se recolectaron 2 mL
 de sangre de cada participante en tubos de Heparina de Litio BD Vacutainer de 2 mL. Para
 cada panel se utilizaron 200 µL de sangre fresca diluidos en 100 µL de tampón salino de
 10 fosfato (PBS). La sangre se incubó con 1.5 uL de los anticuerpos anti-CD14, anti-CD16,
 anti-CD66b y anti-TNSALP (Tabla 1) durante 20 minutos.

Tabla 1. Panel de anticuerpos para la detección de granulocitos y monocitos que expresan TNSALP, junto con indicación de los fluoróforos utilizados.

Granulocitos y Monocitos	
Anticuerpo	Fluoróforo
CD14	FITC
CD16	PE
CD66b	APC
TNSALP	BV421

15 FITC = Isotiocianato de fluoresceína, PE = ficoeritrina, APC = alofococianina, BV421 =
 Brilliant Violet™ 421.

Una vez terminado el periodo de incubación, se lisaron los glóbulos rojos y se fijaron los
 glóbulos blancos utilizando 1 mL del RBC Lysis/ Fixation Solution (10X) (rebajado con H₂O
 20 destilada al 1X). Las muestras se dejaron fijando durante 20 minutos. Terminado el tiempo
 de fijación, las muestras se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. A continuación,
 se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 mL del RBC Lysis/ Fixation
 Solution (10X) (rebajado con H₂O destilada al 1X) para terminar de eliminar los glóbulos
 rojos restantes. Las células se volvieron a centrifugar 10 minutos a 4000 rpms y se descartó
 25 el sobrenadante. Finalmente, las células se resuspendieron en 300 uL de PBS y se pasaron
 por el citómetro.

La determinación de las poblaciones linfocitarias y la expresión de TNSALP de cada grupo
 se determinaron mediante el citómetro Cytex™ Northern Lights Flow Cytometry System.
 30 En este sentido, los granulocitos (CD66b+) se dividieron en neutrófilos (CD66b+/CD16+) y

eosinófilos (CD66b+/CD16-) mientras que los monocitos (CD66b-) se dividieron en clásicos (CD66b-/CD14+/CD16-), intermedios (CD66b-/CD14+/CD16+) y no clásicos (CD66b-/CD14-/CD16+), de acuerdo con la tabla 2. La figura 1 muestra el procedimiento de *gating* para la inmunofenotipación de las subpoblaciones de glóbulos blancos de interés: neutrófilos, eosinófilos y monocitos. La expresión de TNSALP se determinó para cada una de estas poblaciones. Así, la figura 2 muestra la cuantificación del porcentaje de neutrófilos que expresan TNSALP en controles sanos y pacientes de hipofosfatasa (HPP) frente a “fluorescencia menos uno” (FMO) de TNSALP-BV421.

- 10 Tabla 2. Panel de marcadores para la identificación de las poblaciones linfocitarias de interés: neutrófilos, eosinófilos y monocitos.

	CD14	CD16	CD66b
Neutrófilos	-	+	+
Eosinófilos	-	-	+
Monocitos clásicos	+	-	-
Monocitos intermedios	+	+	-
Monocitos no clásicos	-	+	-

1.2 Porcentaje de neutrófilos, eosinófilos y monocitos que expresan TNSALP en pacientes de HPP frente a sujetos sanos

15

Las tres poblaciones de células que expresaron TNSALP fueron significativamente superiores en sujetos sanos (control) que en pacientes de hipofosfatasa (HPP):

- En neutrófilos, la mediana fue de 63.2% en sujetos sanos frente al 4.85% en pacientes (figura 3).
- 20 – En eosinófilos, la mediana fue de 24.5% en controles frente al 2.37% en pacientes.
- En los monocitos, la mediana fue del 6.4% en controles frente al 0.77% en pacientes.

Observando todos los resultados, puede apreciarse que las células que presentan mayores diferencias en la expresión de TNSALP son en los neutrófilos. Por su parte, se observan también diferencias de expresión de TNSALP en eosinófilos y monocitos. Sin embargo, en el caso de eosinófilos y monocitos existe una alta variabilidad de expresión entre réplicas (por ejemplo, los eosinófilos y monocitos no mantienen una misma expresión en los controles), lo que pone en cuestión su utilidad como herramienta de diagnóstico. Tras realizar varias pruebas, se ha visto que utilizar solamente neutrófilos como marcador genera mejores datos de sensibilidad y especificidad ya que se produce una menor

30

variabilidad de resultados. Por este motivo, la presente invención propone utilizar la expresión de TNSALP únicamente en neutrófilos para el diagnóstico de hipofosfatasia. Mediante esta metodología, se observa una amplia diferencia de expresión de esta proteína en la superficie celular observando una reducción significativa (nula o mínima
 5 detección) de TNSALP en neutrófilos de los pacientes que presentan mutaciones en el gen ALPL, mediante su determinación por citometría de flujo.

La detección de la expresión de TNSALP en neutrófilos por citometría de flujo podría tener, como alternativas:

- 10 – Evaluación de la expresión de TNSALP (isoforma ósea) en suero mediante kits ELISA. Sin embargo, se ha comprobado que, en los pacientes con hipofosfatasia estudiados, casi la mitad de ellos presenta valores de TNSALP en suero dentro de rango.
- Evaluación de la expresión del gen ALPL (que codifica la proteína TNSALP) mediante PCR. Sin embargo, no se han encontrado diferencias entre la expresión genética del
 15 gen ALPL a nivel ARN mensajero entre pacientes y sujetos sanos.

En vista de estos resultados, se puede concluir que el uso de la metodología propuesta por determinación mediante citometría de flujo presenta claras ventajas frente a posibles técnicas alternativas de evaluación de la expresión de TNSALP únicamente en neutrófilos.

- 20 Esta tecnología de determinación por citometría de flujo de la expresión de la proteína TNSALP en la superficie celular en neutrófilos supone además un método barato, rápido y eficaz a la hora de diagnosticar esta enfermedad. Otro punto positivo de esta metodología es que no precisa de nuevas infraestructuras en hospitales, ya que el citómetro de flujo es una herramienta que se encuentra en la mayoría de ellos, tanto en España como en el
 25 resto de Europa y América del Norte. Teniendo en cuenta este hecho, esta tecnología podría implantarse a nivel mundial, ahorrando tiempo y dinero a la hora de diagnosticar esta enfermedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30

Figura 1: Representación del proceso de *gating* para inmunofenotipación de eosinófilos, neutrófilos y monocitos. FSC-A = Forward scatter area, SSC-A = Side scatter area, Comp-PE-A::CD16 = anti-CD16; Comp-APC-A::CD66b = anti-CD66b, Comp-BV421-A::TNSALP = TNSALP.

35

Figura 2: Porcentaje de neutrófilos que expresan TNSALP en controles sanos y pacientes de hipofosfatasia (HPP). Comp-APC-A::CD66b = anti-CD66b, Comp-BV421-A::TNSALP = TNSALP.

- 5 Figura 3: Porcentaje de Neutrófilos que expresan TNSALP en controles sanos y pacientes de hipofosfatasia (HPP). *** $P \leq 0.001$.

REIVINDICACIONES

1. Uso del nivel de expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente, para la obtención de datos útiles para:
 - a. el diagnóstico de hipofosfatasa (HPP), y
 - b. seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasa (HPP).
2. Un método *in vitro* para el diagnóstico de hipofosfatasa (HPP) en un paciente, donde el método comprende determinar el nivel de expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente según la reivindicación 1, y donde
 - una reducción en el porcentaje de la población de neutrófilos que expresa TNSALP de al menos el 15% con respecto a un valor de referencia, o donde
 - detectar la expresión de TNSALP en menos de un 30% de la población de neutrófiloses indicativo de que el paciente sufre de hipofosfatasa.
3. Un método para seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasa (HPP), donde el método comprende determinar el nivel de expresión de TNSALP en una población de neutrófilos obtenida de una muestra del paciente según la reivindicación 1, y donde
 - una reducción del porcentaje de la población de neutrófilos que expresa TNSALP de al menos el 15% con respecto a un valor de referencia, o donde
 - detectar la expresión de TNSALP en menos de un 30% de la población de neutrófiloses indicativo de que el paciente es seleccionado para tratamiento para hipofosfatasa.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, donde el tratamiento para hipofosfatasa (HPP) es un tratamiento de sustitución enzimática, preferiblemente un tratamiento con asfotasa alfa.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la determinación de la expresión de TNSALP se lleva a cabo por citometría de flujo.
6. Un kit que comprende reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente, donde los reactivos son un set de anticuerpos que se unen específicamente a:

a) CD16, CD66b, y a

b) TNSALP,

donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos totales presentes en el kit.

5

7. Un kit que comprende reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos, el porcentaje de una población de eosinófilos y/o el porcentaje de una población de monocitos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente, donde los reactivos son un set de anticuerpos que se unen específicamente a:

10

a) CD14, CD16, y CD66b, y a

b) TNSALP,

donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos totales presentes en el kit.

15

8. Un kit que comprende reactivos adecuados para determinar el porcentaje de una población de neutrófilos, el porcentaje de una población de eosinófilos, el porcentaje de una población de basófilos y/o el porcentaje de una población de monocitos que expresa TNSALP en una muestra de un paciente, donde los reactivos son un set de anticuerpos que se unen específicamente a:

20

c) CD14, CD15, CD16, CD66b, y CD123 y a

d) TNSALP,

donde dichos reactivos comprenden al menos el 10% de los reactivos totales presentes en el kit.

25

9. Uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, para la obtención de datos útiles para un método *in vitro* para el diagnóstico de hipofosfatasia (HPP) en un paciente, o para un método para seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasia (HPP).

30

10. Uso de un kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en un método *in vitro* para el diagnóstico de hipofosfatasia (HPP) en un paciente, o en un método para seleccionar un paciente para recibir tratamiento para hipofosfatasia (HPP).

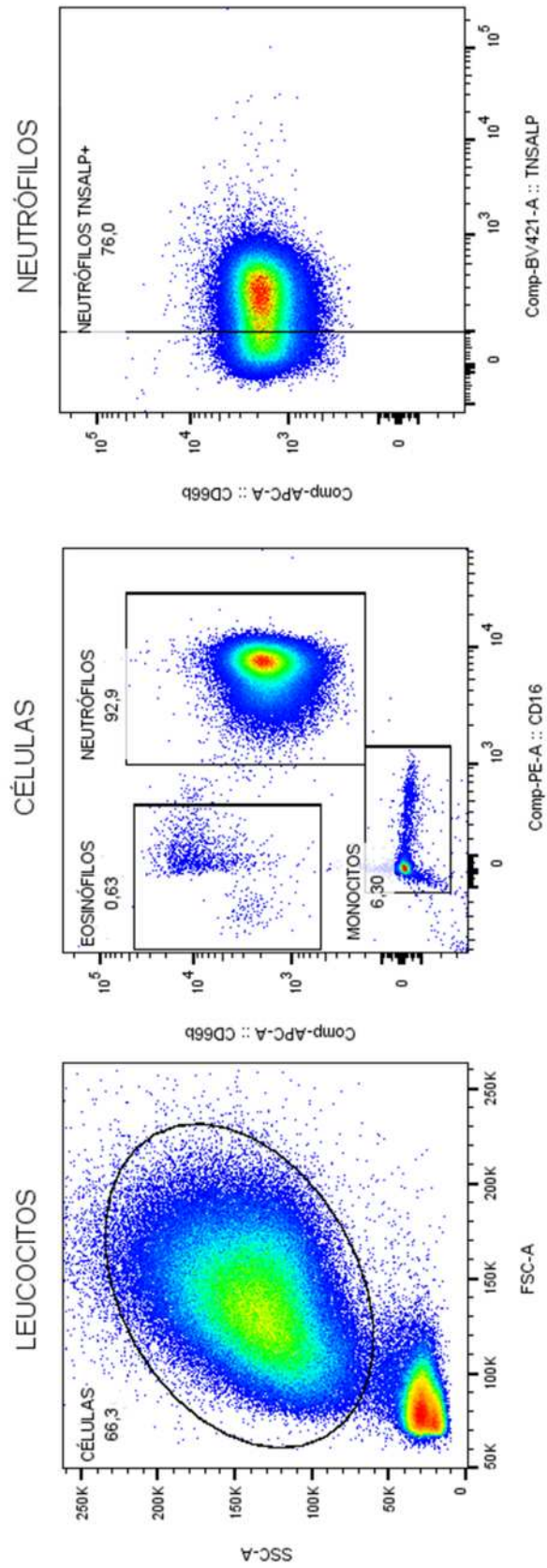


FIG. 1

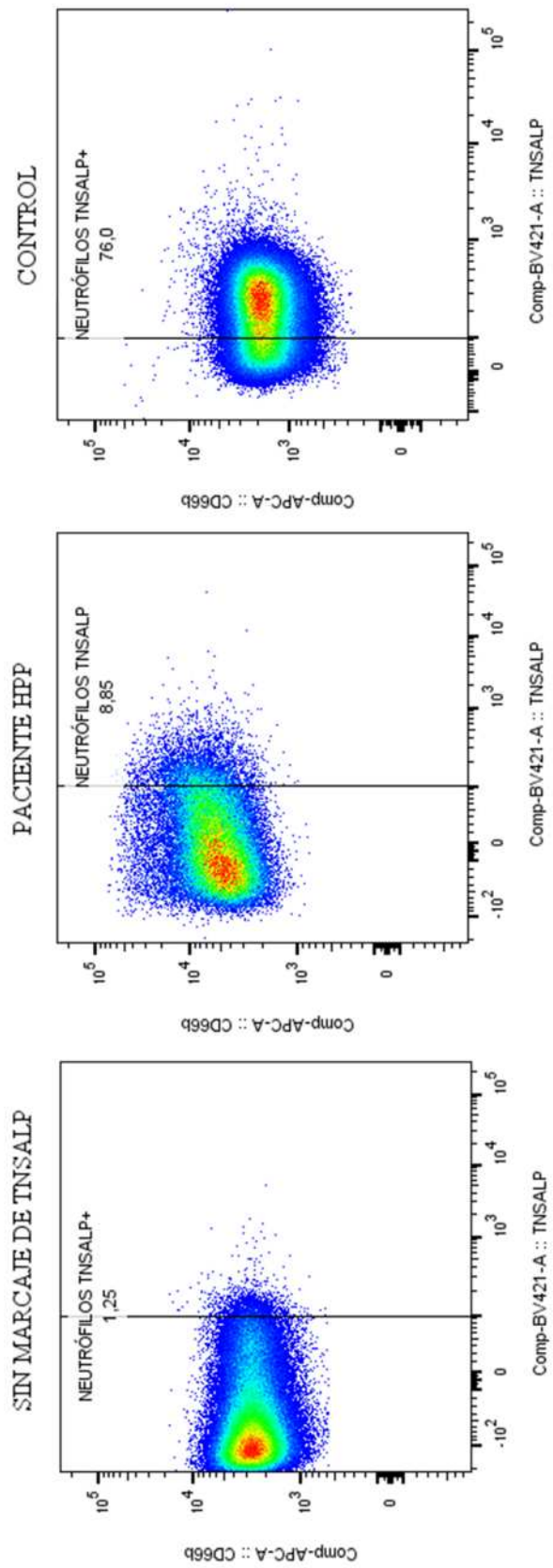


FIG. 2

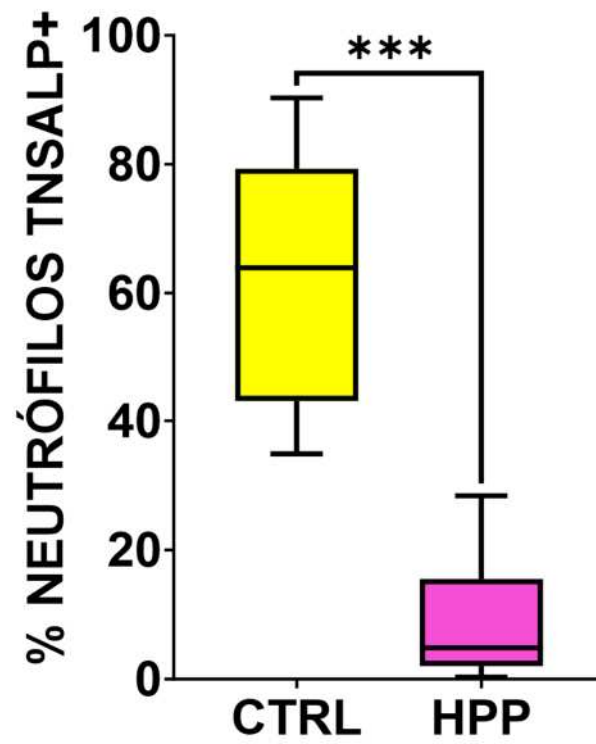


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 202530172
②② Fecha de presentación de la solicitud: 28.02.2025
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. ci.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	WHYTE, M. P. Hypophosphatasia-aetiology, nosology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Nature Reviews Endocrinology. 19/02/2016, Vol. 12, Nº 4, Páginas 233-246. DOI: 10.1038/nrendo.2016.14. URL: https://www.nature.com/articles/nrendo.2016.14 Resumen. Página 241, columna 2, líneas 31-36.	1-10
Y	RAMBALDI, A. et al. Flow cytometry of leucocyte alkaline phosphatase in normal and pathologic leucocytes. British Journal of Haematology. 31/03/1997, Vol. 96, Nº 4, Páginas 815-822. DOI: 10.1046/j.1365-2141.1997.d01-2103.x URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9074426/ Página 821, columna 1, líneas 38-54.	1-10
A	BARDINA, J. et al. Flow Cytometric Quantification of Granulocytic Alkaline Phosphatase Activity in Unlysed Whole Blood. Current protocols in cytometry. 16/06/2020, Vol. 93, Nº 1, artículo nº e76 DOI: 10.1002/cpcy.76 URL: https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpcy.76 Página 9, columna 2, líneas 9-15.	1-10
A	MARTÍNEZ-HEREDIA, L. et al. Systemic effects of hypophosphatasia characterization of two novel variants in the ALPL gene. Frontiers in endocrinology. 03/01/2024, Vol. 14, artículo nº 1320516. DOI: 10.3389/fendo.2023.1320516 URL: https://www.frontiersin.org/journals/endocrinology/articles/10.3389/fendo.2023.1320516/full Página 05, col.1, líneas 36-46 y col.2, líneas 1-11	1-10
A	COSSARIZZA, A. et al. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. European Journal of Immunology. 07/12/2021, Vol. 47, Nº 10, Páginas 1584-1797 DOI: 10.1002/eji.201646632 URL: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/eji.202170126 Todo el documento.	1-10
Categoría de los documentos citados X: de particular relevancia Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría A: refleja el estado de la técnica O: referido a divulgación no escrita P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud		
El presente informe ha sido realizado ☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:		
Fecha de realización del informe 20.02.2026	Examinador M. Munar Palmer	Página 1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

- G01N15/14 (2024.01)
- G01N15/149 (2024.01)
- G01N15/1433 (2024.01)
- G01N33/49 (2006.01)
- G01N33/50 (2006.01)
- G01N33/53 (2006.01)
- G01N33/563 (2006.01)
- G01N33/577 (2006.01)
- G01N33/68 (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, GOOGLE SCHOLAR, BIOSIS