

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 390**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.04.2017** **PCT/EP2017/058768**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017** **WO17178521**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2017** **E 17717159 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2024** **EP 3443353**

54 Título: **Métodos y kits para el diagnóstico y la estratificación de riesgo en pacientes con isquemia**

30 Prioridad:

**12.04.2016 EP 16382167**

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

**25.09.2024**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓ INSTITUT DE RECERCA DE  
L'HOSPITAL DE LA SANTA CREU I SANT PAU  
(50.0%)**

**Sant Quintí 77-79**

**08041 Barcelona, ES y**

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BADIMON MAESTRO, LINA;**

**CUBEDO RÀFOLS, JUDIT y**

**PADRÓ CAPMANY, TERESA**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 979 390 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Métodos y kits para el diagnóstico y la estratificación de riesgo en pacientes con isquemia

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a biomarcadores para el pronóstico, diagnóstico y estratificación de riesgo de individuos con isquemia miocárdica o cerebral, o daño tisular isquémico asociado a la misma, así como para la presentación de acontecimientos isquémicos recurrentes en individuos con arteriopatía coronaria (APC) estable.

10 **Antecedentes de la invención**

Los síndromes coronarios agudos (SCA) y los acontecimientos cerebrovasculares son las manifestaciones clínicas más frecuentes de la aterotrombosis y representan una causa importante de muerte y discapacidad a nivel mundial. El diagnóstico temprano es esencial debido a la importancia de la revascularización rápida y el elevado riesgo de muerte y/o pérdida de calidad de vida. Es en este contexto en el que los biomarcadores surgen como una herramienta importante para complementar la evaluación clínica para el diagnóstico, triaje, estratificación de riesgo y tratamiento de los pacientes con sospecha de SCA y para diferenciar entre ictus isquémico frente a hemorrágico. Estos biomarcadores deben ser informativos sobre el proceso patológico y representar una alternativa a otras técnicas de diagnóstico más complejas y costosas (como la resonancia magnética, entre otras).

De hecho, hay un elevado porcentaje de ingresos en urgencias debido a problemas no cardíacos que cursan con síntomas similares a los de los acontecimientos isquémicos cardíacos (dolor debido a patologías respiratorias o pulmonares). En el caso de la enfermedad cerebrovascular, hay una urgente necesidad de disponer de discriminantes entre ictus hemorrágico frente a isquémico de tal forma que pueda iniciarse el tratamiento del paciente de forma adecuada y rápida.

Por lo tanto, existe una necesidad no cubierta de identificar nuevos biomarcadores para la detección temprana, específica y sensible de la isquemia. Hasta ahora, se han estudiado marcadores de inflamación, función cardíaca y necrosis. Sin embargo, no está claro si su medición sería útil en el diagnóstico y pronóstico de los síndromes isquémicos. Normalmente, el daño isquémico en los órganos precede a la necrosis tisular y, si se detecta a tiempo, podría revertirse. Esta falta de marcadores existentes para la detección precisa y temprana de la isquemia incurre en unos elevados costes económicos innecesarios a nivel mundial.

Hoy en día, el diagnóstico y tratamiento de los síndromes coronarios agudos (SCA) se basan en la evaluación clínica, los hallazgos de electrocardiograma y los niveles de troponina (el único grupo de biomarcadores aceptado). La aplicación de este protocolo conlleva varias limitaciones que hacen indispensable la búsqueda de nuevos biomarcadores para el tratamiento de los pacientes con isquemia miocárdica. La primera desventaja es que las troponinas cardíacas (cTn) son marcadores de necrosis irreversible (muerte celular), un estadio avanzado de la lesión miocárdica. Además, los ensayos de cTn de alta sensibilidad (hs-cTn) han puesto de manifiesto una cierta inespecificidad. Adicionalmente, las directrices actuales destacan la necesidad de realizar mediciones en serie de hs-cTn para realizar un triaje adecuado de los pacientes con dolor torácico agudo.

Un método para detectar daño tisular isquémico basado en el cambio en el perfil de distribución de las isoformas de la apolipoproteína J (Apo J) se ha descrito en la publicación WO2011098645 así como en Cubedo, J., *et al.*, (J. Proteome Res., 2011, 10: 211-220). En esos estudios, se identificaron dos grupos diferentes de isoformas de Apo J, Apo J-15 y Apo J-29, mediante electroforesis bidimensional seguida de espectrometría de masas. Estas formas de Apo J estaban asociadas a lesión tisular y, específicamente, a daño cardíaco debido a un infarto agudo de miocardio (IAM). En el daño isquémico, la detección oportuna y precisa del acontecimiento isquémico es crucial para prevenir su evolución que podría llevar a la lesión irreversible del tejido. En este escenario, la metodología basada en electroforesis bidimensional seguida de espectrometría de masas para la determinación de los cambios en el perfil de distribución de Apo J no podría usarse en la práctica clínica ya que es demasiado compleja, larga y cara para usarse en el diagnóstico de la isquemia.

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de métodos mejorados para la detección del daño vascular y del IAM en particular.

**Sumario de la invención**

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para el diagnóstico de isquemia o daño tisular isquémico en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico o a un método para el diagnóstico de isquemia o daño tisular isquémico en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *Datura stramonium* o los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *Triticum vulgaris*.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un método para predecir la evolución de la isquemia en un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico o para determinar el pronóstico de un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente los niveles de Apo J glicosilada, en donde niveles de Apo J glicosilada reducidos con respecto a un valor de referencia son indicativos de que la isquemia está progresando o de un mal pronóstico del paciente.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para la determinación del riesgo de que un paciente que padece enfermedad coronaria estable padezca un acontecimiento isquémico recurrente, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente los niveles de Apo J glicosilada, en donde niveles de Apo J glicosilada reducidos con respecto a un valor de referencia son indicativos de que el paciente tiene un mayor riesgo de padecer un acontecimiento isquémico recurrente.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende

a. un primer reactivo que es una lectina que se une de forma específica a un residuo de glicano seleccionado de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina y ácido siálico, en donde el primer reactivo está inmovilizado, y

b. un segundo reactivo que es capaz de unirse de forma específica al polipéptido de Apo J,

para el diagnóstico de isquemia o daño tisular isquémico en un paciente, para la determinación de la evolución de la isquemia en un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico, para el pronóstico de un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico o para la determinación del riesgo de que un paciente que padece enfermedad coronaria estable padezca un acontecimiento isquémico recurrente.

En aún otro aspecto, los métodos de la invención pueden comprender la determinación de Apo J glicosilada en una muestra que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra con una lectina que se une específicamente a un residuo de glicano presente en la Apo J glicosilada en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre la Apo J glicosilada en la muestra y la lectina y

(ii) detectar la cantidad de complejo que contiene la lectina y la Apo J glicosilada.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Perfil 2-DE de Apo J. Patrón representativo del grupo de Apo J en geles de 2-DE de muestras de suero de controles y pacientes con isquemia pre-infarto agudo de miocardio (pre-IAM). La Apo J en el suero se detectó como un grupo de 13 manchas con un intervalo de pI de entre 4,5 y 5,0 y una masa molecular de entre 37,1 y 47,3 kDa. Las manchas identificadas como Apo J se numeraron desde el pH ácido hasta el básico. La mancha 2 solo era evidente en los pacientes con isquemia pre-IAM. Obsérvese que las manchas marcadas como 1, 3, 7, 8, 10, 11 y 13 representaban unos niveles de detección aumentados en los pacientes con isquemia pre-IAM, mientras que las manchas 6 y 9 representaban una intensidad reducida en los geles de isquemia pre-IAM en comparación con el grupo de control. Las manchas 3, 7, 8 y 11 son Apo J-29, y las manchas 6 y 9 son Apo J-15.

Figura 2. Formas glicosiladas de Apo J. Imágenes de 2-DE representativas del grupo de Apo J en la fracción glicosilada del suero (aislada mediante su unión a una mezcla de concavalina A y lectinas de *Triticum vulgaris*) de (A) donantes sanos y (B) pacientes con isquemia pre-IAM. Se detectaron seis manchas (1, 2, 4, 5, 8 y 11) que se corresponden en pI y PM con las de suero total. Como para la figura 1, las manchas se numeraron desde el pH ácido hasta el básico. La intensidad de las manchas de Apo J fue menor en los pacientes con isquemia pre-IAM que en los controles. La disminución fue más evidente en las manchas 4 y 8.

Figura 3. Formas O-glicosiladas de Apo J. Imagen de 2-DE representativa del grupo de Apo J en la fracción O-glicosilada del suero (aislada mediante su unión a la lectina de *Artocarpus integrifolia*). Se detectaron 9 manchas (1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 y 12) que se corresponden en pI y PM con las de suero total. Como para las figuras 1 y 2, las manchas se numeraron desde el pH ácido hasta el básico.

Figura 4. Abundancia de las formas glicosiladas de Apo J. Diagrama de barras que muestra la abundancia de las diferentes formas glicosiladas de Apo J en muestras de plasma humano mediante la medición específica con un novedoso y original ensayo de glicosilación enzimática de inmunoafinidad o EGA.

Figura 5. Valor de diagnóstico. (A) Diagrama de cajas que muestra los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en la fase temprana de la isquemia (N=38) y en sujetos sanos (N=144). (B) Curva de eficacia diagnóstica (ROC) que muestra el valor de diagnóstico para la presencia de isquemia miocárdica de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc con un área bajo la curva (AUC) de 0,934 (P<0,0001) y un valor de corte de 332 µg/ml con una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 71 %.

Figura 6. Valor de diagnóstico en pacientes con infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST (STEMI). (A) Diagrama de cajas que muestra los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en pacientes con STEMI en el momento del ingreso (N=212) y en sujetos sanos (N=144). (B) Curva de eficacia diagnóstica (ROC) que muestra el valor discriminante para la presencia de isquemia de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc con un área bajo la curva (AUC) de 0,713 ( $P<0,0001$ ) y un valor de corte de 409  $\mu\text{g/ml}$  con una sensibilidad del 80 % y una especificidad del 53 %. (C) Diagrama de cajas que muestra los niveles de Apo J-GlcNAc en pacientes con STEMI en el momento del ingreso (N=340) y en sujetos sanos (N=139). (D) Curva de eficacia diagnóstica (ROC) que muestra el valor discriminante para la presencia de isquemia de los niveles de Apo J-GlcNAc con un área bajo la curva (AUC) de 0,830 ( $P<0,0001$ ) y un valor de corte de 393  $\mu\text{g/ml}$  con una sensibilidad del 81 % y una especificidad del 72 %.

Figura 7. Evolución de la isquemia. (A) Gráfico de regresión que muestra la correlación inversa y significativa entre los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso y el tiempo de isquemia. (B) Diagrama de cajas que muestra la disminución progresiva de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en 82 pacientes con STEMI 3 días después del ingreso ( $t=72$  h). (C) Gráfico de regresión que muestra la correlación inversa y significativa entre los niveles de Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso y el tiempo de isquemia.

Figura 8. Valor pronóstico. Diagramas de cajas que muestran las diferencias significativas en los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso en relación a (A) el grado de flujo de TIMI final, que se sabe que está directamente relacionado con la mortalidad intrahospitalaria y a 6 meses; y (B) la presencia de choque cardiogénico (65 pacientes con choque cardiogénico y 147 sin choque cardiogénico) que está asociado a un peor pronóstico tras padecer un STEMI.

Figura 9. Estratificación de riesgo. (A) Gráfico de regresión que muestra la correlación inversa y significativa entre los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso y la puntuación de riesgo GRACE. (B) Diagrama de cajas que muestra la asociación entre los valores más altos de la puntuación de riesgo GRACE y la disminución de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc 3 días tras el ingreso en pacientes con STEMI. (C) Gráfico de regresión que muestra la correlación inversa y significativa entre los niveles de Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso y la puntuación de riesgo GRACE.

Figura 10. Acontecimientos recurrentes y mortalidad tras seguimiento de 6 meses en pacientes con STEMI. Curvas de Kaplan-Meier que muestran el impacto de: los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc (A) y troponina-T (B) en el momento del ingreso en presencia de un acontecimiento isquémico recurrente o muerte tras 6 meses de seguimiento; y niveles de Apo J-GlcNAc en el ingreso y mortalidad (C) o la combinación de un acontecimiento isquémico recurrente y muerte (D) después de 6 meses de seguimiento.

Figura 11. Valor predictivo de los niveles plasmáticos de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc. (A) Esquema que muestra los tiempos de recogida de muestras y seguimiento de pacientes con APC estable: los pacientes padecieron un síndrome coronario agudo (SCA) una media de  $0,6\pm 0,04$  años antes de la recogida de muestras y se les realizó un seguimiento durante los  $2,3\pm 0,3$  años posteriores. (B) Diagrama de cajas que muestra los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en pacientes con APC crónica que padecieron un acontecimiento isquémico recurrente en el seguimiento (N=16) en comparación con aquellos que no padecieron ningún acontecimiento recurrente (N=18). (C) Curva de eficacia diagnóstica (ROC) que muestra el valor predictivo de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc para la presentación de acontecimientos isquémicos recurrentes en pacientes con APC estable.

Figura 12. Valor de diagnóstico de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en isquemia cerebral. Diagrama de cajas que muestra los niveles plasmáticos de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en pacientes con ictus (N=174) y sujetos sanos (N=164).

## Descripción detallada de la invención

### Métodos de diagnóstico del daño tisular isquémico

Los autores de la presente invención han observado que los niveles de Apo J que contiene residuos de GlcNAc o los niveles de Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico (Neu5Ac) están disminuidos en la fase temprana de la isquemia con respecto a los niveles observados en sujetos de control. Mientras que la correlación entre los niveles de Apo J glicosilada y pacientes con isquemia cardíaca ya se ha descrito, este estudio se llevó a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada utilizando una mezcla de lectinas capaces de unirse a glicanos que contienen residuos de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa,  $(\text{GlcNAc})_2$  y Neu5Ac. Este método no permitió la identificación de las formas de Apo J glicosiladas que contribuían preferentemente a la discriminación de los pacientes de los sujetos de control. Los autores de la presente invención han sido capaces de identificar las formas glicosiladas de Apo J que contribuyen preferentemente a la discriminación de las muestras de pacientes que padecen isquemia de las muestras de control. De hecho, en el estudio previo, los autores notificaron que Apo J-29 estaba aumentada en pacientes con isquemia pre-IAM, al contrario de lo que pasa con la Apo J que contiene residuos de GlcNAc o la Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico (Neu5Ac). Además, los pacientes con isquemia pre-IAM mostraban una disminución

del 25 % en la Apo J detectada con residuos de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa, (GlcNAc)<sub>2</sub> y Neu5Ac, mientras que la detección específica de Apo J que contiene residuos de GlcNAc o Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico (Neu5Ac) dio como resultado una disminución del 45-50 % en los pacientes con isquemia pre-IAM. Por lo tanto, la determinación de estas formas glicosiladas de Apo J permite el diagnóstico de la isquemia con una mayor sensibilidad y especificidad con respecto al diagnóstico llevado a cabo utilizando las formas glicosiladas de Apo J determinadas mediante el uso del método descrito en la técnica anterior.

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método (a continuación en el presente documento el método de diagnóstico de la invención) para el diagnóstico de isquemia o de daño tisular isquémico en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico, en donde niveles reducidos de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina con respecto a un valor de referencia o niveles reducidos de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico con respecto a un valor de referencia, son indicativos de que el paciente padece isquemia o daño tisular isquémico. Este método para el diagnóstico de isquemia o daño tisular isquémico en un sujeto puede comprender determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *Datura stramonium* o los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *Triticum vulgare*, en donde niveles reducidos de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *Datura stramonium* o niveles reducidos de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *Triticum vulgare* con respecto a un valor de referencia, son indicativos de que el paciente padece isquemia o daño tisular isquémico.

El método de diagnóstico de la invención es especialmente ventajoso ya que permite la detección de un acontecimiento isquémico agudo previo al daño necrótico irreversible del órgano o tejido relacionado (independientemente de los niveles de troponina en el caso de SCA). Esto proporciona un valor de diagnóstico para la presencia de isquemia incluso dentro de las seis primeras horas desde el inicio del acontecimiento.

En el contexto de la presente invención, el término "diagnóstico" se refiere a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes con isquemia miocárdica o cerebral o daño tisular isquémico asociado a la misma y muestras de individuos que no han padecido este daño y/o lesión, cuando se aplica un método como el divulgado en el presente documento. Esta detección, tal y como entiende un experto en la materia, no pretende ser correcta al 100 % para todas las muestras. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas se clasifiquen correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede establecerla un experto en la técnica mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la isquemia o el daño isquémico en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de un determinado grupo o población sometido a prueba.

El término "isquemia" se utiliza en el presente documento de forma intercambiable con "acontecimiento isquémico" y se refiere a cualquier situación resultante de una disminución o interrupción del flujo sanguíneo a un órgano o tejido. La isquemia puede ser transitoria o permanente.

Las expresiones "daño tisular isquémico", "lesión tisular isquémica", "daño tisular debido a isquemia", "daño tisular asociado a isquemia", "daño tisular como resultado de la isquemia", "tejido dañado causado por isquemia" y "tejido dañado por isquemia" se refiere al daño morfológico, fisiológico y/o molecular de un órgano o tejido o célula como resultado de un periodo de isquemia.

En una realización, el daño causado por isquemia es un daño del tejido cardíaco. En una realización aún más preferida, el daño del tejido cardíaco está causado por una isquemia miocárdica.

El término "isquemia miocárdica" se refiere a perturbaciones circulatorias causadas por aterosclerosis coronaria y/o aporte de oxígeno inadecuado al miocardio. Por ejemplo, un infarto agudo de miocardio representa una lesión isquémica irreversible al tejido miocárdico. Esta lesión da como resultado un acontecimiento oclusivo (por ejemplo, trombótico o embólico) en la circulación coronaria y produce un entorno en el que las demandas metabólicas del miocardio sobrepasan el aporte de oxígeno al tejido miocárdico.

En aún otra realización, el daño está causado por una angina microvascular. El término "angina microvascular", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una afección que resulta del flujo sanguíneo inadecuado a través de los pequeños vasos sanguíneos cardíacos.

En una realización, el daño causado por la isquemia es un daño del tejido cerebral. En otra realización, el daño del tejido cerebral está causado por un ictus isquémico. El término "ictus isquémico" se refiere a una pérdida repentina de la función cerebral causada por un bloqueo de un vaso sanguíneo que va al cerebro (dando como resultado la falta de

oxígeno en el cerebro), caracterizada por pérdida del control muscular, disminución o pérdida de sensación o consciencia, mareo, dificultad para hablar u otros síntomas que varían con la extensión y la gravedad del daño al cerebro, también denominado accidente cerebral o accidente cerebrovascular. El término "isquemia cerebral" (o "ictus") también se refiere a una deficiencia en el aporte sanguíneo al cerebro, que a menudo da como resultado una falta de oxígeno en el cerebro.

El término "sujeto" o "individuo" o "animal" o "paciente" incluye cualquier sujeto, en particular un sujeto mamífero, para el que se desea la terapia. Los sujetos mamíferos incluyen seres humanos, animales domésticos, animales de granja y animales de zoo o mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado, vacas y demás. En una realización preferida de la invención, el sujeto es un mamífero. En una realización más preferida de la invención, el sujeto es un ser humano.

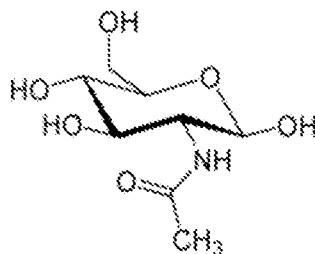
El término "muestra" o "muestra biológica", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al material biológico aislado de un sujeto. La muestra biológica contiene cualquier material biológico adecuado para detectar los niveles de formas glicosiladas de una proteína determinada, por ejemplo Apo J. La muestra puede aislarse de cualquier tejido o fluido biológico adecuado tal como, por ejemplo, sangre, saliva, plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) o heces. En una realización particular de la invención, la muestra es una muestra de tejido o un fluido biológico. En una realización más particular de la invención, el fluido biológico se selecciona del grupo consistente en sangre, suero o plasma.

Preferiblemente, la muestra que se utiliza para la determinación de los niveles de las diferentes formas glicosiladas de Apo J es del mismo tipo que la muestra utilizada para determinar el valor de referencia en caso de que la determinación se haga en términos relativos. A modo de ejemplo, si la determinación de Apo J que contiene residuos GlcNAc o de Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico se lleva a cabo en una muestra de plasma, entonces también se utilizará una muestra de plasma para determinar el valor de referencia. Si la muestra es un fluido biológico, entonces la muestra de referencia también se determinará en el mismo tipo de fluido biológico, por ejemplo, sangre, suero, plasma, líquido cefalorraquídeo.

El término "Apo J", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido también conocido como "clusterina", "mensaje de próstata reprimido por testosterona", "apolipoproteína J", "proteína SP-40,40 asociada al complemento", "inhibidor de la citólisis del complemento", "inhibidor de la lisis del complemento", "glicoproteína sulfatada", "proteína de unión a Ku70", "NA1/NA2", "TRPM-2", "KUB1", "CLI". La Apo J humana es el polipéptido proporcionado con el número de acceso P10909 en la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (versión de registro 187 del 16 de marzo de 2016).

El término "Apo J que contiene residuos de GlcNAc", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de Apo J que contiene al menos una repetición de GlcNAc en al menos una cadena de glicano, aunque, normalmente, la Apo J contendrá al menos una N-acetil-glucosamina en cada cadena de glicano. La "Apo J que contiene residuos de GlcNAc" incluye moléculas de Apo J que contienen al menos un residuo de GlcNAc en N-glicanos de alto contenido en manosa, N-glicanos de tipo complejo, oligosacáridos híbridos N-glicanos u O-glicanos. Dependiendo del tipo de N-glicanos, la GlcNAc puede encontrarse unida de forma directa a la cadena polipeptídica o en una posición distal en el N-glicano.

El término "GlcNAc" o "N-acetilglucosamina" se refiere a un derivado de glucosa que resulta de la amidación de la glucosamina por el ácido acético y que tiene la estructura general:



En una realización, la Apo J que contiene residuos de GlcNAc contiene dos residuos de GlcNAc y se denomina en el presente documento (GlcNAc)<sub>2</sub>. Las moléculas de Apo J que contienen residuos de (GlcNAc)<sub>2</sub> incluyen moléculas en las que la (GlcNAc)<sub>2</sub> se encuentra en N-glicanos de alto contenido en manosa, en N-glicanos de tipo complejo, en oligosacáridos híbridos N-glicanos o en O-glicanos. Dependiendo del tipo de N-glicanos, la (GlcNAc)<sub>2</sub> puede encontrarse unida de forma directa a la cadena polipeptídica o en una posición distal en el N-glicano.

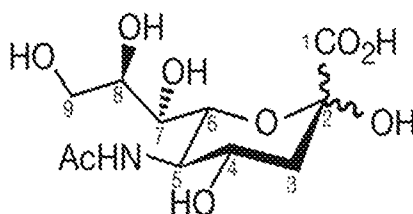
En una realización preferida, el nivel de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub> se define como el nivel de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *Datura stramonium*.

El término "unión específica", cuando se utiliza en la presente invención para referirse a la unión de una lectina a una forma glicosilada de Apo J, se entiende como la capacidad de la lectina para unirse específicamente a una forma glicosilada de Apo J por medio de la existencia de complementariedad entre las estructuras tridimensionales de las dos moléculas con una afinidad sustancialmente mayor para la unión no específica, de modo que la unión entre dicha lectina y la forma glicosilada de Apo J tiene lugar preferentemente antes que la unión de cualquiera de dichas moléculas con respecto a las otras moléculas presentes en la mezcla de reacción. Esto da como resultado que la lectina no reaccione de forma cruzada con otros glicanos que pueden o no estar presentes en la molécula de Apo J. La reactividad cruzada de una lectina en investigación puede someterse a ensayo, por ejemplo, mediante la evaluación de la unión de dicha lectina en condiciones convencionales al glicano de interés, así como a un número de glicanos más o menos estrechamente relacionados (estructural y/o funcionalmente). Solo si la lectina se une al glicano de interés pero no se une o no se une esencialmente a ninguno de los otros glicanos se considera específica para el glicano de interés. Por ejemplo, una unión puede considerarse específica si la afinidad de unión entre la lectina y la Apo J glicosilada tiene una constante de disociación ( $K_d$ ) de menos de  $10^{-6}$  M, menos de  $10^{-7}$  M, menos de  $10^{-8}$  M, menos de  $10^{-9}$  M, menos de  $10^{-10}$  M, menos de  $10^{-11}$  M, menos de  $10^{-12}$  M, menos de  $10^{-13}$  M, menos de  $10^{-14}$  M o menos de  $10^{-15}$  M.

En una realización preferida, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc" está sustancialmente libre de otros tipos de hidratos de carbono unidos a N o unidos a O. En una realización, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc" no contiene residuos de  $\alpha$ -manosa unidos a N o unidos a O. En otra realización, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc" no contiene residuos de  $\alpha$ -glucosa unidos a N o unidos a O. En aún otra realización, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc" no contiene residuos de  $\alpha$ -manosa unidos a N o unidos a O o residuos de  $\alpha$ -glucosa unidos a N o unidos a O.

El término "Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier molécula de Apo J que contiene al menos una repetición de N-acetil-glucosa en su cadena de glicano y al menos una repetición de residuo de ácido siálico.

El término "ácido siálico", como se usa en el presente documento, se refiere al monosacárido conocido como ácido N-acetilneuramínico (Neu5Ac) y que tiene la estructura general:



En una realización, la Apo J contiene dos residuos de GlcNAc y un residuo de ácido siálico (a continuación en el presente documento denominado  $(\text{GlcNAc})_2\text{-Neu5Ac}$ ). En otra realización, los residuos de GlcNAc y ácido siálico están conectados mediante uno o más monosacáridos.

En una realización, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico corresponden a los niveles de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *Triticum vulgaris*.

En una realización preferida, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico" está sustancialmente libre de otros tipos de hidratos de carbono unidos a N o unidos a O. En una realización, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico" no contiene residuos de  $\alpha$ -manosa unidos a N o unidos a O. En otra realización, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico" no contiene residuos de  $\alpha$ -glucosa unidos a N o unidos a O. En aún otra realización, la "Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico" no contiene residuos de  $\alpha$ -manosa unidos a N o unidos a O o residuos de  $\alpha$ -glucosa unidos a N o unidos a O.

En una realización preferida, la "Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris*" corresponde a cualquier forma glicosilada de Apo J que contiene al menos un residuo de ácido siálico o al menos un residuo de GlcNAc, incluyendo Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) pero no residuos de ácido siálico, Apo J que contiene residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$  pero no residuos de ácido siálico, Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y residuos de ácido siálico, Apo J que contiene residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$  y ácido siálico, así como Apo J que contiene ácido siálico pero no residuos de GlcNAc o  $(\text{GlcNAc})_2$ . Se entenderá que los residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$  y los residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$  pueden encontrarse en la misma cadena de glicano que los residuos de ácido siálico. Alternativamente, los residuos de ácido siálico pueden encontrarse en cadenas de glicanos que no contienen residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$  o residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$ .

En una realización preferida, la "Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium*" corresponde a cualquier forma glicosilada de Apo J que contiene al menos un residuo de GlcNAc, incluyendo Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y Apo J que contiene residuos de  $(\text{GlcNAc})_2$ .

El término “niveles reducidos” o “niveles bajos”, en relación a los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc), se refiere a cualquier nivel de expresión de Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) en una muestra más bajo que el valor de referencia. Por tanto, los niveles de expresión de Apo J que contiene residuos N-acetilglucosamina (GlcNAc) se considera que están reducidos o que son más bajos que su valor de referencia cuando son al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 110 %, al menos un 120 %, al menos un 130 %, al menos un 140 %, al menos un 150 % o aún más bajos que su valor de referencia.

El término “niveles reducidos” o “niveles bajos”, en relación a los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico, se refiere a cualquier nivel de expresión de Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico en una muestra más bajo que el valor de referencia. Por tanto, los niveles de expresión de Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico se considera que están reducidos o que son más bajos que su valor de referencia cuando son al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 110 %, al menos un 120 %, al menos un 130 %, al menos un 140 %, al menos un 150 % o aún más bajos que su valor de referencia.

El término “niveles reducidos” o “niveles bajos”, en relación a los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris*, se refiere a cualquier nivel de expresión de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* en una muestra más bajo que el valor de referencia. Por tanto, los niveles de expresión de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* se considera que están reducidos o que son más bajos que su valor de referencia cuando son al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 110 %, al menos un 120 %, al menos un 130 %, al menos un 140 %, al menos un 150 % o aún más bajos que su valor de referencia.

El término “niveles reducidos” o “niveles bajos”, en relación a los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium*, se refiere a cualquier nivel de expresión de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* en una muestra más bajo que el valor de referencia. Por tanto, los niveles de expresión de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* se considera que están reducidos o que son más bajos que su valor de referencia cuando son al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 110 %, al menos un 120 %, al menos un 130 %, al menos un 140 %, al menos un 150 % o aún más bajos que su valor de referencia.

El método de diagnóstico de la invención comprende comparar los niveles obtenidos en el sujeto objeto de estudio con un valor de referencia, mediante lo cual niveles reducidos de Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina con respecto a un valor de referencia o niveles reducidos de Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico con respecto a un valor de referencia son indicativos de que el paciente padece isquemia o daño tisular isquémico. El método de diagnóstico de la invención comprende alternativamente comparar los niveles obtenidos en el sujeto objeto de estudio con un valor de referencia, mediante lo cual niveles reducidos de Apo J capaz de unirse a lectina de *D. stramonium* con respecto a un valor de referencia o niveles reducidos de Apo J capaz de unirse a lectina de *T. vulgaris* con respecto a un valor de referencia son indicativos de que el paciente padece isquemia o daño tisular isquémico.

El término “valor de referencia”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior o un límite inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor mediana; un valor medio; o un valor comparado con un valor de control o basal particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de una muestra individual, como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está sometiéndose a prueba, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tales como poblaciones de sujetos de un grupo de la misma edad cronológica, o puede basarse en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a prueba. En una realización, el valor de referencia corresponde a los niveles de Apo J que contiene residuos de GlcNAc, a los niveles de Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico (Neu5Ac), a los niveles de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* o a los niveles de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* determinados en un sujeto sano, donde por sujeto sano se



entiende un sujeto que no muestra daño tisular isquémico en el momento en que se determinan los niveles de Apo J que contiene residuos de GlcNAc, los niveles de Apo J que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico (Neu5Ac), los niveles de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* o los niveles de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* y que, preferiblemente, no muestra antecedentes de daño isquémico.

En otra realización, el valor de referencia corresponde a un nivel promedio o medio del biomarcador correspondiente, determinado a partir de un conjunto de muestras obtenidas de un grupo de pacientes muy bien documentados desde el punto de vista clínico, y que no presentan enfermedad, especialmente que no padecen daño tisular isquémico, en particular que no padecen daño miocárdico isquémico o daño cerebral isquémico. En dichas muestras, los niveles de expresión pueden determinarse, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de expresión promedio en una población de referencia. En la determinación del valor de referencia, es necesario tener en cuenta algunas características del tipo de muestra, tales como la edad, el género, el estado físico u otras características del paciente. Por ejemplo, la muestra de referencia puede obtenerse de cantidades idénticas de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 hasta más de 1000 individuos, de tal forma que la población sea estadísticamente significativa.

Se entenderá que el valor de referencia utilizado para el diagnóstico de pacientes según el método de diagnóstico de la invención es un valor obtenido del mismo tipo de muestra y del mismo biomarcador que el marcador que se considera en el diagnóstico. Por consiguiente, si el método de diagnóstico se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub>, entonces el valor de referencia utilizado en el diagnóstico es también el nivel de expresión de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub>, según sea el caso, obtenido de un sujeto sano o de un conjunto de muestras como se ha explicado anteriormente. En otra realización, si el método de diagnóstico se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico, entonces el valor de referencia utilizado en el diagnóstico es también el nivel de expresión de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico obtenido como se ha explicado anteriormente. En otra realización, si el método de diagnóstico se lleva a cabo determinando los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium*, entonces el valor de referencia usado en el diagnóstico también es el nivel de expresión de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* obtenido como se ha explicado anteriormente. En otra realización, si el método de diagnóstico se lleva a cabo determinando los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris*, entonces el valor de referencia usado en el diagnóstico también es el nivel de expresión de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* obtenido como se ha explicado anteriormente.

En otra realización, si el biomarcador se determina con el fin de diagnosticar daño tisular miocárdico, el valor de referencia serán los niveles del mismo biomarcador de un sujeto sano que no muestra daño tisular miocárdico y que preferiblemente no tiene antecedentes de haber padecido daño tisular miocárdico. Si el valor de referencia es el nivel promedio del mismo biomarcador obtenido de un conjunto de muestras de sujetos, entonces los sujetos a partir de los cuales se prepara el conjunto de muestras son sujetos que no muestran daño tisular miocárdico y que preferiblemente no tienen antecedentes de haber padecido daño tisular miocárdico.

En otra realización, si el biomarcador se determina con el fin de diagnosticar daño tisular cerebral, el valor de referencia serán los niveles del mismo biomarcador de un sujeto sano que no muestra daño tisular cerebral y que preferiblemente no tiene antecedentes de haber padecido daño tisular cerebral. Si el valor de referencia es el nivel promedio del mismo biomarcador obtenido de un conjunto de muestras de sujetos, entonces los sujetos a partir de los cuales se obtiene el conjunto de muestras son sujetos que no muestran daño tisular cerebral y que preferiblemente no tienen antecedentes de haber padecido daño tisular cerebral.

El valor de referencia utilizado en el método de diagnóstico de la invención puede optimizarse con el fin de obtener la especificidad y sensibilidad deseadas.

En una realización, el valor de referencia utilizado en el diagnóstico de isquemia miocárdica es de 332 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc o de 393 µg/ml de Apo J-GlcNAc cuando se desea una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 71 % o de 393 µg/ml de Apo J-GlcNAc cuando se desea una sensibilidad del 81 % y una especificidad del 72 % (es decir, el método de diagnóstico según la presente invención permite el diagnóstico de la isquemia miocárdica con una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 71 % cuando un paciente muestra menos de 332 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc o con una sensibilidad del 81 % y una especificidad del 72 % cuando un paciente muestra menos de 393 µg/ml de Apo J-GlcNAc).

En otra realización, el valor de referencia utilizado en el diagnóstico de isquemia cerebral es de 424 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc cuando se desea una sensibilidad del 66 % y una especificidad del 51 % (es decir, el método de diagnóstico según la presente invención permite el diagnóstico de la isquemia cerebral con una sensibilidad del 66 % y una especificidad del 51 % cuando un paciente muestra menos de 424 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc).

En una realización, el valor de referencia usado en el diagnóstico de isquemia miocárdica es de 332 µg/ml de Apo J capaz de unirse a la lectina de *T. vulgaris* cuando se desea una sensibilidad de 97 % y una especificidad del 71 % o de 393 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* cuando se desea una sensibilidad del 81 % y una especificidad del 72 % (es decir, el método de diagnóstico según la presente invención permite el diagnóstico de isquemia miocárdica con una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 71 % cuando un paciente muestra menos de 332 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* o con una sensibilidad de 81 % y una especificidad del 72 % cuando un paciente muestra menos de 393 µg/ml de Apo J capaz de unirse a la lectina de *D. stramonium*).

En otra realización, el valor de referencia usado en el diagnóstico de isquemia cerebral es de 424 µg/ml de Apo J capaz de unirse a la lectina de *T. vulgaris* cuando se desea una sensibilidad de 66 % y una especificidad del 51 % (es decir, el método de diagnóstico según la presente invención permite el diagnóstico de isquemia cerebral con una sensibilidad de 66 % y una especificidad del 51 % cuando un paciente muestra menos de 424 µg/ml de Apo J capaz de unirse a la lectina de *T. vulgaris*).

En una realización preferida, la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene N-acetilglucosamina (GlcNAc), los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico, los niveles de Apo J que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* o los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* se lleva a cabo antes de que pueda detectarse en la muestra un aumento detectable en un marcador de necrosis. En una realización preferida, el marcador de necrosis es troponina-T o CK. En aún otra realización, la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene N-acetilglucosamina (GlcNAc), de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico, de los niveles de Apo J que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* o de los niveles de Apo J glicosilada que es capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* se lleva a cabo en una muestra obtenida tras 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 12 horas, 14 horas, 16 horas, 18 horas, 20 horas, 30 horas, 40 horas, 50 horas o más del inicio de los síntomas de daño isquémico. En una realización preferida, en el caso del daño isquémico miocárdico, normalmente los síntomas son dolor torácico, disnea, diaforesis, debilidad, mareo, náuseas, vómitos y palpitaciones. En una realización, el paciente es un paciente pre-IAM.

En otra realización preferida, en el caso del daño isquémico cerebral, los síntomas de daño isquémico son, sin limitación, olfato, gusto, audición o visión alterados, ptosis o debilidad de los músculos oculares, reflejos reducidos: reflejo faríngeo, deglución, reactividad de las pupilas a la luz, pérdida de sensación y debilidad de los músculos de la cara, problemas de equilibrio y nistagmo, afasia, apraxia (alteración de los movimientos voluntarios), defectos en el campo visual, disartria, déficits de memoria, heminatención, pensamientos desorganizados, confusión, gestos hipersexuales (con la implicación del lóbulo frontal), falta de percepción de uno mismo, por lo general relacionado con el ictus, discapacidad, alteración de la marcha, alteración de la coordinación de movimientos, vértigo o desequilibrio.

En otra realización, la determinación de los niveles de las formas glicosiladas de Apo J según el método de diagnóstico de la invención se lleva a cabo en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que se le haya administrado al paciente cualquier medicamento destinado a reducir la isquemia o a reducir el daño tisular isquémico. En una realización, en el caso de daño tisular miocárdico, la determinación de los niveles de las formas glicosiladas de Apo J se lleva a cabo en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que el paciente se haya tratado con estatinas, antiagregantes plaquetarios y/o anticoagulantes.

En una realización, en el caso del daño tisular cerebral, la determinación de los niveles de las formas glicosiladas de Apo J se lleva a cabo en una muestra del paciente que se ha obtenido antes de que el paciente se haya tratado con activador del plasminógeno tisular, antiagregantes plaquetarios y/o anticoagulantes.

#### Método para el pronóstico de pacientes que han padecido daño isquémico

Los autores de la presente invención también han descubierto que, inesperadamente, los niveles de Apo J glicosilada son útiles no solo para la detección de un acontecimiento isquémico en curso, sino también para el pronóstico de un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para predecir la evolución de la isquemia en un paciente (a continuación en el presente documento método de pronóstico de la invención) que ha padecido un acontecimiento isquémico o para determinar el pronóstico de un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente los niveles de Apo J glicosilada, en donde niveles reducidos de Apo J glicosilada con respecto a un valor de referencia son indicativos de que la isquemia está progresando o de un mal pronóstico del paciente, en donde la Apo J glicosilada es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico.

En el contexto de la presente invención, el término "predecir la evolución" se refiere a la capacidad de predecir el curso de la enfermedad tras padecer isquemia o daño tisular isquémico asociado a la misma cuando se aplica un método

como el divulgado en el presente documento. Esta detección, tal y como entiende un experto en la técnica, no pretende ser correcta al 100 % para todas las muestras. Sin embargo, requiere que un número estadísticamente significativo de las muestras analizadas se clasifiquen correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede establecerla un experto en la técnica mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la presente invención puede detectar correctamente la isquemia o el daño isquémico en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de un grupo o población particular sometido a prueba.

En el contexto de la presente invención, el término “determinar el pronóstico” se utiliza de forma intercambiable con “pronóstico” y se refiere a la capacidad de predecir el desenlace de los pacientes tras padecer isquemia miocárdica o cerebral o daño tisular isquémico asociado a la misma cuando se aplica un método como el divulgado en el presente documento. Esta detección, tal y como entiende un experto en la técnica, no pretende ser correcta al 100 % para todas las muestras. Sin embargo, requiere que un número estadísticamente significativo de las muestras analizadas se clasifiquen correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede establecerla un experto en la técnica mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la presente invención puede detectar correctamente la isquemia o el daño isquémico en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de un grupo o población particular sometido a prueba.

En una realización preferida, el pronóstico del paciente se determina como el riesgo de recaída a los 6 meses. En el caso de la determinación del riesgo de recaída a los 6 meses, se entenderá que la recaída hace referencia a un segundo acontecimiento isquémico que se produce en los 6 primeros meses tras el primer acontecimiento isquémico. En una realización, el segundo acontecimiento isquémico es del mismo tipo que el primer acontecimiento isquémico, es decir, si el primer acontecimiento isquémico es una isquemia miocárdica y el pronóstico se determina como el riesgo de que el paciente padezca un segundo acontecimiento isquémico miocárdico. En otra realización, el segundo acontecimiento isquémico es de un tipo diferente al primer acontecimiento isquémico, es decir, si el primer acontecimiento isquémico es una isquemia miocárdica, entonces el pronóstico se determina como el riesgo de que el paciente padezca un acontecimiento cerebral isquémico o viceversa, si el primer acontecimiento isquémico es un acontecimiento isquémico cerebral, entonces el pronóstico se determina como el riesgo de que el paciente padezca un acontecimiento isquémico miocárdico.

En otra realización, el pronóstico del paciente se determina como el riesgo de mortalidad intrahospitalaria.

En una realización preferida, el pronóstico del paciente se determina como el riesgo de mortalidad a los 6 meses.

Los términos “Apo J”, “paciente”, “acontecimiento isquémico” y “muestra” se han descrito en detalle en el contexto del método de diagnóstico de la invención y son igualmente aplicables al presente método.

En una realización, la muestra es un fluido biológico. En otra realización, el fluido biológico es plasma o suero.

En una realización, el acontecimiento isquémico es un acontecimiento isquémico miocárdico. En aún otra realización, el acontecimiento isquémico miocárdico es un infarto de miocardio con elevación de ST (STEMI). En otra realización, el acontecimiento isquémico es un acontecimiento isquémico cerebral.

El término “Apo J glicosilada”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier forma de Apo J que contiene por lo menos una cadena de oligosacáridos unidos a N o unidos a O unida a la cadena polipeptídica. El término “Apo J glicosilada” incluye tanto variantes que contienen oligosacáridos unidos a N como unidos a O. El término también incluye Apo J que contiene oligosacáridos de tipo complejo unidos a N, oligosacáridos con alto contenido en manosa u oligosacáridos de tipo híbrido.

En una realización, la Apo J glicosilada que se determina en el método de pronóstico de la invención es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc). En una realización aún más preferida, el nivel de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) corresponde al nivel de Apo J capaz de unirse de forma específica a la lectina de *Datura stramonium*. En una realización, la Apo J glicosilada que se determina en el método de pronóstico de la invención es Apo J glicosilada que es capaz de unirse de forma específica a la lectina de *Datura stramonium*.

En otra realización, la Apo J glicosilada determinada en el método de pronóstico de la invención es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico. En una realización aún más preferida, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico corresponden a

los niveles de Apo J capaz de unirse de forma específica a la lectina de *Triticum vulgaris*. En una realización, la Apo J glicosilada que se determina en el método de pronóstico de la invención es Apo J que es capaz de unirse de forma específica a la lectina de *Triticum vulgaris*.

5 Los términos “niveles reducidos” o “niveles bajos”, en relación a los niveles de Apo J glicosilada, se refieren a cualquier nivel de expresión de Apo J glicosilada en una muestra que es más bajo que el valor de referencia. Por tanto, los niveles de Apo J glicosilada se considera que están reducidos o que son más bajos que su valor de referencia cuando son al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 110 %, al menos un 120 %, al menos un 130 %, al menos un 140 %, al menos un 150 % o aún más bajos que su valor de referencia. En una realización preferida, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) son más bajos que los de una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc)<sub>2</sub> son más bajos que los encontrados en una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* son más bajos que los de una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* son más bajos que los de una muestra de referencia.

20 El término “valor de referencia”, cuando se refiere al método de pronóstico de la invención, se refiere a un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior o un límite inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor mediana; un valor medio; o un valor comparado con un valor de control o basal particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de una muestra individual, como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está sometiéndose a prueba, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tales como poblaciones de sujetos de un grupo de la misma edad cronológica, o puede basarse en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a prueba. En una realización, el valor de referencia corresponde a los niveles de Apo J glicosilada determinados en un sujeto que ha padecido un acontecimiento isquémico y en el que la isquemia no ha evolucionado o que ha tenido una buena evolución. En el caso de la evolución determinada como el riesgo de recaída a los 6 meses, el valor de referencia puede tomarse como los niveles de Apo J glicosilada en una muestra de un paciente tomada en el momento del acontecimiento isquémico pero en el que el paciente no había padecido ningún otro acontecimiento isquémico al menos en 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses o más tras el primer acontecimiento isquémico. En otra realización, cuando la evolución se determina como el riesgo de mortalidad intrahospitalaria, el valor de referencia puede tomarse como los niveles de Apo J glicosilada en un paciente en el momento del acontecimiento isquémico, pero en donde al paciente le han dado el alta hospitalaria. En el caso de que la evolución se determine como el riesgo de mortalidad a 6 meses, el valor de referencia puede tomarse como los niveles de Apo J glicosilada en una muestra de un paciente tomada en el momento del acontecimiento isquémico pero en el que el paciente aún está vivo al menos 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses o más tras el acontecimiento isquémico.

45 En otra realización, el valor de referencia corresponde a un nivel promedio o medio del biomarcador correspondiente, determinado a partir de un conjunto de muestras obtenidas de un grupo de pacientes muy bien documentados desde el punto de vista clínico, y que, tras haber padecido un acontecimiento isquémico, han mostrado un buen pronóstico según lo definido en el párrafo anterior. En dichas muestras, los niveles de expresión pueden determinarse, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de expresión promedio en una población de referencia. En la determinación del valor de referencia, es necesario tener en cuenta algunas características del tipo de muestra, tales como la edad, el género, el estado físico y otras características del paciente. Por ejemplo, la muestra de referencia puede obtenerse de cantidades idénticas de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 hasta más de 1000 individuos, de tal forma que la población sea estadísticamente significativa.

Se entenderá que el valor de referencia utilizado para el pronóstico de pacientes según el método de pronóstico de la invención es un valor obtenido del mismo tipo de muestra y del mismo biomarcador que el marcador que se considera en el diagnóstico. Por lo tanto, si el método de pronóstico se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub>, entonces el valor de referencia utilizado en el pronóstico es también el nivel de expresión de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub>, según pueda ser el caso, obtenido de un sujeto sano o de un conjunto de muestras según lo definido anteriormente. En otra realización, si el método de pronóstico se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico, entonces el valor de referencia utilizado en el pronóstico es también el nivel de expresión de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico obtenido según lo definido anteriormente.

Si el método de pronóstico se lleva a cabo determinando los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse a la lectina de *D. stramonium*, entonces el valor de referencia usado en el pronóstico también es el nivel de expresión de Apo J glicosilada capaz de unirse a la lectina de *D. stramonium* obtenida de un sujeto sano de un conjunto de muestras como

se ha definido anteriormente. En otra realización, si el método de pronóstico se lleva a cabo determinando los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse a la lectina de *T. vulgaris*, entonces el valor de referencia usado en el pronóstico también es el nivel de expresión de Apo J glicosilada capaz de unirse a la lectina de *T. vulgaris* obtenida como se ha definido anteriormente.

En otra realización, si el biomarcador se determina con el fin de determinar el pronóstico de un paciente que ha padecido un daño tisular miocárdico, el valor de referencia serán los niveles del mismo biomarcador de un sujeto que, tras haber padecido un acontecimiento isquémico miocárdico, ha mostrado un buen pronóstico según cualquiera de los criterios definidos anteriormente (falta de recaída de un acontecimiento isquémico después de 6 meses, sin mortalidad intrahospitalaria o mortalidad después de 6 meses). Si el valor de referencia es el nivel promedio del mismo biomarcador obtenido de un conjunto de muestras de sujetos, entonces los sujetos a partir de los cuales se prepara el conjunto de muestras son sujetos que, tras haber padecido un acontecimiento isquémico miocárdico, han mostrado un buen pronóstico según cualquiera de los criterios definidos anteriormente (falta de recaída de un acontecimiento isquémico después de 6 meses, sin mortalidad intrahospitalaria o mortalidad después de 6 meses).

En otra realización, si el biomarcador se determina con el fin de determinar el pronóstico de un daño tisular cerebral, el valor de referencia serán los niveles del mismo biomarcador de un sujeto sano que, tras haber padecido un acontecimiento isquémico cerebral, ha mostrado un buen pronóstico según cualquiera de los criterios definidos anteriormente (falta de recaída de un acontecimiento isquémico después de 6 meses, sin mortalidad intrahospitalaria o mortalidad después de 6 meses). Si el valor de referencia es el nivel promedio del mismo biomarcador obtenido de un conjunto de muestras de sujetos, entonces los sujetos a partir de los cuales se prepara el conjunto de muestras son sujetos que, tras haber padecido un acontecimiento isquémico cerebral, han mostrado un buen pronóstico según cualquiera de los criterios definidos anteriormente (falta de recaída de un acontecimiento isquémico después de 6 meses, sin mortalidad intrahospitalaria o mortalidad después de 6 meses).

El valor de referencia utilizado en el método de pronóstico de la invención puede optimizarse con el fin de obtener la especificidad y sensibilidad deseadas.

En una realización específica, el valor de referencia utilizado en el pronóstico de mortalidad y acontecimientos recurrentes es de 287 µg/ml de Apo J-GlcNAc cuando se desea una sensibilidad del 58 % y una especificidad del 51 % (es decir, el método de pronóstico según la presente invención permite el pronóstico de mortalidad o acontecimientos recurrentes con una sensibilidad del 58 % y una especificidad del 61 % cuando un paciente muestra menos de 287 µg/ml de Apo J-GlcNAc).

En una realización específica, el valor de referencia utilizado en el pronóstico de mortalidad y acontecimientos recurrentes es de 398 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc cuando se desea una sensibilidad del 55 % y una especificidad del 65 % (es decir, el método de pronóstico según la presente invención permite el pronóstico de mortalidad o acontecimientos recurrentes con una sensibilidad del 55 % y una especificidad del 65 % cuando un paciente muestra menos de 398 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc).

En una realización específica, el valor de referencia utilizado en el pronóstico de mortalidad y acontecimientos recurrentes es de 398 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* cuando se desea una sensibilidad del 55 % y una especificidad del 65 % (es decir, el método de pronóstico según la presente invención permite el pronóstico de mortalidad o acontecimientos recurrentes con una sensibilidad del 55 % y una especificidad del 65 % cuando un paciente muestra menos de 398 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris*).

En una realización específica, el valor de referencia utilizado en el pronóstico de mortalidad y acontecimientos recurrentes es de 287 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* cuando se desea una sensibilidad del 58 % y una especificidad del 51 % para el pronóstico de mortalidad y acontecimientos recurrentes y de 273 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* cuando se desea una sensibilidad del 64 % y una especificidad del 50 % para el pronóstico de mortalidad (es decir, el método de pronóstico según la presente invención permite el pronóstico de mortalidad o acontecimientos recurrentes con una sensibilidad del 58 % y una especificidad del 51 % cuando un paciente muestra menos de 287 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* o el pronóstico de mortalidad con una sensibilidad del 64 % y una especificidad del 50 % cuando un paciente muestra menos de 273 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium*).

#### Método para la estratificación de riesgo de la invención

Los autores de la presente invención también han mostrado que los niveles de Apo J glicosilada y, en especial, los niveles de Apo J glicosilada que contiene GlcNAc y Neu5Ac son también un biomarcador útil para determinar el riesgo de que un paciente que padece arteriopatía coronaria (APC) estable padezca un acontecimiento isquémico recurrente. Este método permite la estratificación de los pacientes según el riesgo de que padezcan acontecimientos isquémicos y, por lo tanto, es útil para asignar terapias preventivas específicas a los pacientes dependiendo del riesgo.

Así, en otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar el riesgo (a continuación en el presente documento, método de estratificación de riesgo de la invención) de que un paciente que padece arteriopatía coronaria estable padezca un acontecimiento isquémico recurrente, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho paciente los niveles de Apo J glicosilada, en donde niveles reducidos de Apo J glicosilada con respecto a un valor de referencia son indicativos de que el paciente muestra un riesgo aumentado de padecer un acontecimiento isquémico recurrente, en donde la Apo J glicosilada es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico.

En el contexto de la presente invención, el término “determinar el riesgo” o “estratificación de riesgo” se refiere a la capacidad de determinar el riesgo o probabilidad de: a) padecer complicaciones clínicas adicionales en pacientes tras haber padecido isquemia miocárdica o cerebral o daño tisular isquémico asociado a la misma, y/o b) beneficiarse de un tratamiento específico para isquemia miocárdica o cerebral o daño tisular isquémico asociado a la misma cuando se aplica un método como el divulgado en el presente documento. Esta detección, tal y como entiende un experto en la técnica, no pretende ser correcta al 100 % para todas las muestras. Sin embargo, requiere que un número estadísticamente significativo de las muestras analizadas se clasifiquen correctamente. La cantidad que es estadísticamente significativa puede establecerla un experto en la técnica mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse a, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la isquemia o el daño isquémico en al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de un grupo o población particular sometido a prueba.

Los términos paciente, acontecimiento isquémico, muestra, Apo J y Apo J glicosilada se han descrito en detalle en el contexto de los métodos de diagnóstico y pronóstico de la invención y son igualmente aplicables al método de estratificación de riesgo de la invención.

En una realización, el acontecimiento isquémico recurrente es un síndrome coronario agudo, un ictus o un acontecimiento isquémico transitorio.

En una realización, la muestra es un fluido biológico. En otra realización, el fluido biológico es plasma o suero.

En una realización, el acontecimiento isquémico es un acontecimiento isquémico miocárdico. En aún otra realización, el acontecimiento isquémico miocárdico es un infarto de miocardio con elevación de ST (STEMI). En otra realización, el acontecimiento isquémico es un acontecimiento isquémico cerebral.

En una realización, la Apo J glicosilada que se determina en el método de pronóstico de la invención es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc). En otra realización, el nivel de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) corresponde al nivel de Apo J capaz de unirse de forma específica a la lectina de *Datura stramonium*.

En otra realización, la Apo J glicosilada que se determina en el método de pronóstico de la invención es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico corresponden a los niveles de Apo J capaz de unirse de forma específica a la lectina de *Triticum vulgare*.

El término “enfermedad coronaria estable” y “enfermedad coronaria cardíaca estable” tienen el mismo significado y se utilizan de forma intercambiable. Ambos términos incluyen la afección médica de arteriopatía coronaria estable (APCE). “Estable”, en el contexto de los términos “enfermedad cardiovascular estable”, “enfermedad coronaria estable” o “enfermedad coronaria cardíaca estable” se define como cualquier afección de enfermedad cardiovascular diagnosticada en ausencia de acontecimientos cardiovasculares agudos. Por lo tanto, por ejemplo, enfermedad coronaria estable define las diferentes fases de evolución de la enfermedad coronaria, excluyendo situaciones en las que la trombosis arterial coronaria domina la presentación clínica (síndrome coronario agudo). Los pacientes que padecen APCE se definen por una o más de las siguientes afecciones: angina de pecho estable con resultado positivo de la prueba de estrés de ECG o gammagrafía miocárdica positiva o estenosis de más del 50 % de la arteria coronaria, antecedentes de síndrome coronario agudo, antecedentes de revascularización coronaria, en tratamiento con antiagregantes plaquetarios, anticoagulantes y/o estatinas a una dosis estable durante al menos 3 meses.

En una realización preferida, los pacientes que padecen enfermedad coronaria estable han padecido un síndrome coronario agudo antes de la enfermedad coronaria estable. En realizaciones preferidas, el paciente que padece enfermedad coronaria estable ha padecido un síndrome coronario agudo como mínimo 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses, 60 meses o más, antes de la enfermedad coronaria estable.

Los términos “niveles reducidos” o “niveles bajos”, en relación a los niveles de Apo J glicosilada en el método de pronóstico de la invención, se refieren a cualquier nivel de expresión de Apo J glicosilada en una muestra que es más bajo que el valor de referencia. Por tanto, los niveles de Apo J glicosilada se considera que están reducidos o que son más bajos que su valor de referencia cuando son al menos un 5 %, al menos un 10 %, al menos un 15 %, al menos un 20 %, al menos un 25 %, al menos un 30 %, al menos un 35 %, al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 100 %, al menos un 110 %, al menos un 120 %, al menos un 130 %, al menos un 140 %, al menos un 150 % o aún más bajos que su valor de referencia. En una realización preferida, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) son más bajos que los encontrados en una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc)<sub>2</sub> son más bajos que los encontrados en una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico son más bajos que los encontrados en una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse a la lectina de *T. vulgaris* son más bajos que los encontrados en una muestra de referencia. En otra realización, los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse a la lectina de *D. stramonium* son más bajos que los encontrados en una muestra de referencia.

El término “valor de referencia”, cuando se refiere al método de estratificación de riesgo de la invención, se refiere a un criterio predeterminado utilizado como referencia para evaluar los valores o datos obtenidos de las muestras recogidas de un sujeto. El valor de referencia o nivel de referencia puede ser un valor absoluto; un valor relativo; un valor que tiene un límite superior o un límite inferior; un intervalo de valores; un valor promedio; un valor mediana; un valor medio; o un valor comparado con un valor de control o basal particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de una muestra individual, como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que está sometiéndose a prueba, pero en un momento anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras, tales como poblaciones de sujetos de un grupo de la misma edad cronológica, o puede basarse en un conjunto de muestras incluyendo o excluyendo la muestra que va a someterse a prueba. En una realización, el valor de referencia corresponde a los niveles de Apo J glicosilada determinados en un sujeto que padece enfermedad coronaria estable pero que no ha padecido ningún acontecimiento isquémico recurrente. En este caso, los pacientes adecuados a partir de los cuales puede determinarse el valor de referencia son pacientes que han padecido enfermedad coronaria estable y que no han padecido acontecimientos isquémicos recurrentes durante al menos 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses o más tras el inicio de la enfermedad coronaria estable.

En otra realización, el valor de referencia corresponde a un nivel promedio o medio del biomarcador correspondiente, determinado a partir de un conjunto de muestras obtenidas de un grupo de pacientes muy bien documentados desde el punto de vista clínico, y que padecen enfermedad coronaria estable pero que no han padecido acontecimientos isquémicos recurrentes durante al menos 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 36 meses, 48 meses o más tras el inicio de la enfermedad coronaria estable. En dichas muestras, los niveles de expresión pueden determinarse, por ejemplo, mediante la determinación del nivel de expresión promedio en una población de referencia. En la determinación del valor de referencia, es necesario tener en cuenta algunas características del tipo de muestra, tales como la edad, el sexo, el estado físico y similares del paciente. Por ejemplo, la muestra de referencia puede obtenerse de cantidades idénticas de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 hasta más de 1000 individuos, de tal forma que la población sea estadísticamente significativa.

Se entenderá que el valor de referencia utilizado para la estratificación de riesgo de pacientes según el método de estratificación de riesgo de la invención es un valor obtenido del mismo tipo de muestra y del mismo biomarcador que el marcador que se considera en el diagnóstico. Por consiguiente, si el método de estratificación de riesgo se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub>, entonces el valor de referencia utilizado en la estratificación de riesgo es también el nivel de expresión de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc o (GlcNAc)<sub>2</sub>, según pueda ser el caso, obtenido de un sujeto o de un conjunto de muestras según lo definido anteriormente. En otra realización, si el método de estratificación de riesgo se lleva a cabo mediante la determinación de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de GlcNAc y ácido siálico, entonces el valor de referencia utilizado en la estratificación de riesgo es también el nivel de expresión de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico obtenido según lo explicado anteriormente.

En otra realización, si el método de estratificación de riesgo se lleva a cabo determinando los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris*, entonces el valor de referencia usado en la estratificación de riesgo también es el nivel de expresión de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* obtenido como se ha explicado anteriormente. En otra realización, si el método de estratificación de riesgo se lleva a cabo determinando los niveles de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium*, entonces el valor de referencia usado en la estratificación de riesgo también es el nivel de expresión de Apo J glicosilada capaz de unirse específicamente a la lectina de *D. stramonium* obtenido como se ha explicado anteriormente.

El valor de referencia utilizado en el método de estratificación de riesgo de la invención puede optimizarse con el fin de obtener una especificidad y sensibilidad deseadas. En una realización específica, el valor de referencia utilizado en la estratificación de riesgo es de 485 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc cuando se desea una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 64 % (es decir, el método de estratificación de riesgo según la presente invención permite la predicción de acontecimientos recurrentes en pacientes que padecen APC con una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 64 % cuando un paciente muestra menos de 485 µg/ml de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc).

En otra realización, el valor de referencia utilizado en el método de estratificación de riesgo es de 485 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris* cuando se desea una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 64 % (es decir, el método de estratificación de riesgo según la presente invención permite la predicción de acontecimientos recurrentes en pacientes que padecen APC con una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 64 % cuando un paciente muestra menos de 485 µg/ml de Apo J capaz de unirse específicamente a la lectina de *T. vulgaris*).

#### Kits para la determinación de los biomarcadores según la invención

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende

a. un primer reactivo que es una lectina que se une específicamente a un residuo de glicano seleccionado de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina y ácido siálico, en donde el primer reactivo está inmovilizado y

b. un segundo reactivo que es capaz de unirse específicamente al polipéptido de Apo J, para realizar los métodos de la invención.

Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "lectina que se une específicamente a un residuo de glicano seleccionado de N-acetilglucosamina y ácido siálico" se refiere a cualquier proteína diferente de un anticuerpo con capacidad de unirse a azúcares procedentes de cualquier organismo, así como también a variantes de las mismas obtenidas de una forma recombinante y que mantengan la capacidad de unirse a los residuos de azúcares de las glicoproteínas. Los ejemplos de lectinas adecuadas para su uso en la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, lectinas aisladas de *Conavalia ensiformis*, *Anguilla anguilla*, *Triticum vulgaris*, *Datura stramonium*, *Galanthus nivalis*, *Maackia amurensis*, *Arachis hypogaea*, *Sambucus nigra*, *Erythrina cristagalli*, *Lens culinaris*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Allomyrina dichotoma*, *Dolichos biflorus*, *Lotus tetragonolobus*, *Ulex europaeus* y *Ricinus communis*.

Los ejemplos de lectinas adecuadas para su uso en la presente invención, incluyen, pero no se limitan a, las lectinas mostradas en la tabla 1, que indica el nombre común de la lectina, el organismo del que procede y el azúcar que se une de forma específica a dicha lectina.

Lectina	Origen	Especificidad
Lectina II	<i>Griffonia simplicifolia</i>	GlcNAc (R) α o 1β terminal
RCA-I	<i>Ricinus communis</i>	GalβGlcNAc-R terminal
Aglutinina de germen de trigo	<i>Triticum vulgaris</i>	Ácido siálico terminal y GlcNAc terminal
LFA	<i>Limax flavus</i>	Ácido siálico terminal
Aglutinina de estramonio	<i>Datura stramonium</i>	Oligómeros N-acetilglucosamina unidos en (β-1,4)
Lectina de tomate	<i>Lycopersicum esculentum</i>	(Galβ4GlcNAc)n-R
MAL/MAA	<i>Maackia amurensis</i>	Ácido 2-3Galβ3GalNAc-R siálico
L-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	N-glicanos tri/tetraantennarios
E-PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	N-glicanos biantennarios bisectados
Lectina de saúco	<i>Sambucus nigra</i>	Ácido 2-6Gal/Gal(/GalNAc) siálico
Lectina de patata	<i>Solanum tuberosum</i>	(Galβ4GlcNAc)n-R de cadena larga
Lectina de <i>Aleuria aurantia</i>	<i>Aleuria aurantia</i>	Fucα1-2Galβ1-4(Fucα1-3/4)Galβ1-4GlcNAc; R <sub>2</sub> -GlcNAcβ1-4(Fucα1-6)GlcNAc-R <sub>1</sub>
Lectina de <i>Allomyrina dichotoma</i>	<i>Allomyrina dichotoma</i>	Galβ1-4GlcNAc-R

En una realización preferida, la lectina es la lectina de *Triticum vulgaris*, la lectina de *Datura stramonium* o una combinación de las mismas.

En una realización preferida, el segundo reactivo es un anticuerpo anti-Apo J o un fragmento del mismo que contiene su región de unión a antígeno.

En el contexto de la presente invención, el término "anticuerpo de Apo J" se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de las mismas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une de forma específica a la Apo J glicosilada como se define en el presente documento. Los anticuerpos adecuados para su uso según la presente invención incluyen anticuerpos que reconocen uno o más epítopos ubicados



en la parte polipeptídica de la Apo J glicosilada, siempre y cuando la unión no se vea afectada por la presencia de hidratos de carbono unidos a N o unidos a O. Estos anticuerpos son capaces de unirse tanto a las formas glicosiladas de Apo J como a las formas no glicosiladas de la misma.

Los ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas incluyen  $F(ab)$  y  $F(ab')_2$  que pueden generarse mediante el tratamiento de un anticuerpo con una enzima como pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes o epítopos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo también puede ser recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores.

La lectina está inmovilizada. La inmovilización habitualmente se consigue mediante la unión a un soporte. Tal y como se usa en la presente invención, el término "soporte" se refiere a cualquier material sólido al que están unidos físicamente los componentes de la invención, estando, por lo tanto, inmovilizados. Los soportes sólidos adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, silicona, vidrio, cuarzo, poliamida, acrilato, polimetilmetacrilato, cerámica, nitrocelulosa, metales, carburo de silicio amorfo, poliestireno, así como cualquier otro material adecuado para microfabricación o microlitografía.

La lectina puede inmovilizarse en el soporte mediante uniones covalentes o mediante uniones no covalentes tales como puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o uniones iónicas. Se ha descrito una revisión general de micromatrices y soportes adecuados en Shalon *et al.* (Genome Research 6: 639-645 (1996)), LeGendre (BioTechniques 9: 788-805 (1990)), documentos US6197599 y US6140045. Alternativamente, es posible utilizar soportes activados mediante grupos epoxi, grupos vinilsulfónicos, grupos éster activados, grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos tiol, grupos isotiocianato y similares. En el caso de que el soporte se active mediante grupos epoxi, estos grupos incluyen 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano (GTMS), 2-(3,4-epoxiciclohexil)etiltrimetoxisilano, 3-glicidoxipropilmetildietoxisilano, 3-glicidoxipropiltriethoxisilano y similares.

En una realización, los componentes de los kits según la invención contienen un marcador. En principio, la invención contempla el uso de cualquier marcador, siempre que la conjugación covalente al componente b del kit sea posible y que permita la posterior detección de dicho componente. En una realización preferida, el marcador puede detectarse por un cambio en al menos una de sus propiedades químicas, eléctricas o magnéticas.

Por tanto, la invención contempla la posibilidad de modificar las proteínas con un radioisótopo del tipo de  $^3H$ ,  $^{11}C$ ,  $^{14}C$ ,  $^{18}F$ ,  $^{32}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{64}Cu$ ,  $^{68}Ga$ ,  $^{86}Y$ ,  $^{99}Tc$ ,  $^{111}In$ ,  $^{123}I$ ,  $^{124}I$ ,  $^{125}I$ ,  $^{131}I$ ,  $^{133}Xe$ ,  $^{177}Lu$ ,  $^{211}At$  o  $^{213}B$ . El marcaje con radioisótopos se lleva a cabo normalmente mediante el uso de ligandos quelantes que son capaces de complejar iones metálicos tales como DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA y TETA (Macrocyclics, Dallas, Tex.).

No obstante, en una realización preferida, el componente a se marca con un grupo fluorescente. Los compuestos fluorescentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bromuro de etidio, SYBR Green, isotiocianato de fluoresceína (FITC), tetrametil rodamina isotiol (TRIT), 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína, HEX (6-carboxi-2',4',4',5',7',7'-hexaclorofluoresceína), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Joe (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxi-rodamina, rodamina, tetrametilrodamina (Tamra), Rox (carboxi-X-rodamina), R6G (rodamina 6G), ftalocianinas, azometinas, cianinas (Cy2, Cy3 y Cy5), Texas Red, Princeton Red, BODIPY FL-Br2, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, DABCYL, eosina, eritrosina, bromuro de etidio, proteína fluorescente verde (GFP) y los análogos de los mismos, marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (punto cuántico), marcadores fluorescentes basados en lantánidos tales como  $Eu^{3+}$  y  $Sm^{3+}$  y similares.

En aún otra realización, el kit contiene un tercer componente (componente c) que es capaz de unirse de forma específica al componente b. En este caso, la detección de la Apo J capturada en el soporte por la lectina no se lleva a cabo detectando directamente el componente b, sino más bien detectando el componente c una vez se ha unido al componente a.

Cualquier molécula puede usarse como tercer componente del kit, siempre que sea capaz de unirse específicamente al componente b. En una realización, el componente b se modifica con un primer miembro de una pareja de unión y el componente c se modifica con un segundo miembro de una pareja de unión.

El término "pareja de unión" se refiere a un par de moléculas (denominadas primer y segundo miembro de la pareja de unión) que tienen la capacidad de unirse específicamente por medio de cualquier tipo de interacción intramolecular incluidas, pero sin limitación, interacciones bioquímicas, fisiológicas y/o químicas. La pareja de unión incluye cualquier tipo de interacción de tipo inmunitario, tales como antígeno/anticuerpo, antígeno/fragmento de anticuerpo, hapteno/anti-hapteno, así como interacciones de tipo no inmunitario, tales como avidina/biotina, avidina/moléculas biotiniladas, ácido fólico/proteína de unión a folato, hormona/receptor de hormona, lectina/hidrato de carbono, lectina/molécula modificada con hidratos de carbono, enzima/sustrato enzimático, enzima/inhibidor enzimático,

proteína A/anticuerpo, proteína G/anticuerpo, ácidos nucleicos complementarios (incluidas secuencias de ADN, ARN y ácidos peptidonucleicos (APN)), polinucleótido/proteína de unión a polinucleótido y similares.

Se entenderá que el término “primer” y “segundo” miembro de una pareja de unión es relativo y que cada uno de los miembros previos puede considerarse como el primer o el segundo miembro de la pareja de unión.

En una realización incluso más preferida en donde el componente b del kit según la invención es un anticuerpo, en cuyo caso el tercer componente es un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a dicho componente b. En este caso, el segundo anticuerpo contiene un marcador. Los marcadores adecuados para el tercer componente del kit son los mismos que los mencionados anteriormente para el componente b del kit. El marcador del tercer componente del kit puede ser un grupo fluorescente, un grupo luminiscente o una enzima. Si el compuesto detectable es una enzima, entonces esta enzima debe ser capaz de generar una señal detectable, por ejemplo, después de añadir un activador, un sustrato, un agente amplificador, y similares. Las enzimas que son adecuadas como etiquetas detectables para la presente invención y los sustratos correspondientes incluyen:

• Fosfatasa alcalina:

◦ Sustratos cromogénicos: sustratos basados en fosfato de p-nitrofenilo (p-NPP), fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indolilo/nitroazul tetrazolio (BCIP/NBT), Fast-Red/fosfato de naftol-AS-TS

◦ Sustratos fluorogénicos: fosfato de 4-metilumbeliferilo (4-MUP), 2-(5'-cloro-2'-fosforiloxifenil)-6-cloro-4-(3H)-quinazolinona (CPPCQ), difosfato de 3,6-fluoresceína (3,6-FDP), sales de diazonio de Fast Blue BB, Fast Red TR o Fast Red Violet LB.

• Peroxidasas:

◦ Sustratos cromogénicos basados en ácido 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), o-fenilendiamina (OPT), 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), o-dianisidina, ácido 5-aminosalicílico, ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB) y 3-metil-2-benzotiazolinohidrazona (MBTH), 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) y tetrahidrocloreto de 3,3'-diaminobencidina (DAB).

◦ Sustratos fluorogénicos: ácido 4-hidroxi-3-metoxifenilacético, fenoxacinas reducidas, benzotiacinas reducidas, incluido el reactivo Amplex® Red, el reactivo Amplex UltraRed y dihidroxantenos reducidos.

• Glicosidasas:

◦ Sustratos cromogénicos: o-nitrofenil-β-D-galactósido (O-NPG), p-nitrofenil-β-D-galactósido y 4-metilumbeliferil-β-D-galactósido (MUG) para la β-D-galactosidasa.

◦ Sustratos fluorogénicos: β-D-galactopiranosido de resorufina, digalactósido de fluoresceína (FDG), diglucurónido de fluoresceína, 4-metilumbeliferil-β-D-galactopiranosido, carboxiumbeliferil-β-D-galactopiranosido y β-D-galactopiranosidos de cumarina fluorados.

• Oxidorreductasas (luciferasa):

◦ Sustratos luminiscentes: luciferina.

En el caso de un marcador enzimático, el kit puede contener como componente adicional uno o más sustratos de la enzima.

En una realización incluso más preferida, el compuesto detectable que se une al segundo miembro de la pareja de unión es un compuesto fluorescente. Tal y como se usa en la presente invención, el término “compuesto fluorescente” se refiere a todos los compuestos que absorben luz a una determinada longitud de onda o intervalo de longitud de onda y emiten luz a una longitud de onda o intervalo de longitud de onda diferente. Los compuestos fluorescentes adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, bromuro de etidio, SYBR Green, isotiocianato de fluoresceína (FITC), tetrametil rodamina isotiol (TRIT), 5-carboxifluoresceína, 6-carboxifluoresceína, fluoresceína, HEX (6-carboxi-2',4',5',7'-hexaclorofluoresceína), Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Joe (6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceína), 5-carboxi-2',4',5',7'-tetraclorofluoresceína, 5-carboxi-rodamina, rodamina, tetrametilrodamina (Tamra), Rox (carboxi-X-rodamina), R6G (rodamina 6G), ftalocianinas, azometinas, cianinas (Cy2, Cy3 y Cy5), Texas Red, Princeton Red, BODIPY FL-Br2, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, DABCYL, eosina, eritrosina, bromuro de etidio, proteína fluorescente verde (GFP) y los análogos de los mismos, marcadores fluorescentes inorgánicos basados en nanocristales semiconductores (punto cuántico), marcadores fluorescentes basados en lantánidos tales como  $\text{Eu}^{3+}$  y  $\text{Sm}^{3+}$  y similares.

Opcionalmente, en una realización adicional, el kit comprende además un blanco como control de señal de fondo y/o una curva patrón que contiene diferentes concentraciones de Apo J glicosilada.

Método para la determinación de Apo J glicosilada en una muestra

En otro aspecto, los métodos de la invención pueden comprender la determinación de Apo J glicosilada en una muestra que comprende las etapas de:

(i) poner en contacto la muestra con una lectina que se une específicamente a un residuo glicano presente en la Apo J glicosilada en las condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre la Apo J glicosilada en la muestra y la lectina y

(ii) detectar la cantidad de complejo que contiene la lectina y la Apo J glicosilada con respecto a N-acetilglucosamina (GlcNAc).

Los términos "Apo J glicosilada", "muestra" y "lectina que se une específicamente al residuo de glicano presente en la Apo J glicosilada" se han descrito previamente en detalle en el contexto de los métodos de diagnóstico y pronóstico de la invención, así como en el contexto de un kit según la invención, y son igualmente aplicables al método para la determinación de Apo J glicosilada según la invención.

En la etapa (i), el método para la determinación de Apo J glicosilada comprende poner en contacto la muestra con una lectina que se une específicamente a un residuo glicano presente en la Apo J glicosilada en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre la Apo J glicosilada en la muestra y la lectina.

Las condiciones adecuadas para la formación de dicho complejo las puede determinar un experto e incluyen temperatura, tiempo de incubación y pH apropiados. En una realización particular, la temperatura varía de 4 a 40 °C, en particular de 10 a 35 °C, más particularmente de 15 a 30 °C, preferiblemente de 20 a 25 °C (temperatura ambiente). En una realización particular, el pH varía de pH 2 a pH 10, preferiblemente de pH 4 a pH 10. En una realización particular, la etapa (i) se deja transcurrir durante al menos 1 minuto, preferiblemente durante al menos 5 minutos, más preferiblemente durante al menos 30 minutos, aún más preferiblemente durante al menos 60 minutos.

En ciertas realizaciones, la muestra se diluye antes de ponerla en contacto con la lectina. Las diluciones adecuadas de la muestra varían de 1:10 a 1:100000, preferiblemente de 1:100 a 1:1000, más preferiblemente la dilución de la muestra de plasma es 1:200 o 1:1500.

En una realización, la lectina utilizada en la etapa (i) es una lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina o una lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina y ácido siálico. En una realización más preferida, la lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina es la lectina de *Datura stramonium* o en donde la lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina y ácido siálico o a ácido siálico es la lectina de *Triticum vulgaris*.

En aún otra realización, la lectina que se une específicamente al residuo de glicano está inmovilizada. Los soportes adecuados son los mismos que los descritos en el kit de la invención.

Una vez la etapa (i) ha transcurrido durante tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo entre la lectina y la Apo J glicosilada presente en la muestra, se lleva a cabo la etapa (ii). En la etapa (ii), el método para la determinación de Apo J glicosilada comprende detectar la cantidad de complejo que contiene la lectina y la Apo J glicosilada.

En una realización, los complejos obtenidos en la etapa (i) se lavan antes de empezar la etapa (ii) con el fin de eliminar cualquier Apo J que pudiera haberse unido al soporte mediante una unión no específica. El lavado tras la etapa (i) se lleva a cabo utilizando una solución de lavado. En una realización particular, la solución de lavado contiene una o más sales. Preferiblemente, la sal contenida en la solución de lavado es NaCl, comprendida en un tampón Tris (TBS) o en un tampón fosfato (PBS). Adicional o alternativamente, la solución de lavado contiene al menos un detergente. Preferiblemente, el detergente se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20 (Tween 20) y Tritón X-100.

La detección de la cantidad de complejo que contiene la lectina y la Apo J glicosilada habitualmente se lleva a cabo utilizando un reactivo que se une específicamente al polipéptido de Apo J. En una realización preferida, el reactivo que se une específicamente al polipéptido de Apo J es un anticuerpo o un fragmento del mismo que contiene su región de unión a antígeno.

Los anticuerpos adecuados para su uso en la etapa (ii) del método para detectar Apo J glicosilada se han definido en el contexto del kit según la invención y son igualmente aplicables en el presente documento. En una realización, el anticuerpo se acopla a un marcador detectable. Los marcadores adecuados para el anticuerpo anti-Apo J se han definido anteriormente en el contexto del kit según la invención. En una realización preferida, el marcador puede detectarse mediante un cambio en al menos una de sus propiedades químicas, eléctricas o magnéticas.

En otra realización, la detección de la cantidad de complejo que contiene la lectina y la Apo J glicosilada se lleva a cabo utilizando un reactivo que es capaz de unirse específicamente al reactivo que se une de forma específica al polipéptido de Apo J. En otra realización, el tercer reactivo que es capaz de unirse específicamente al reactivo que se une de forma específica al polipéptido de Apo J es un anticuerpo o un fragmento del mismo que contiene su región de unión a antígeno, en cuyo caso, el complejo se detecta mediante la detección del anticuerpo que se ha unido al reactivo que se une específicamente a la Apo J. Esto se realiza utilizando un anticuerpo que contiene un marcador detectable. Los marcadores adecuados para su uso en el anticuerpo se han definido anteriormente en el contexto del kit según la invención. El marcador puede ser un marcador fluorescente o un marcador enzimático.

\*\*\*

La presente invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos que no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Valor diagnóstico de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc y Apo J-GlcNAc en isquemia cardíaca

El perfil proteómico de Apo J en pacientes con isquemia cardíaca se ha caracterizado previamente usando electroforesis bidimensional (2-DE) seguida de identificación por espectrometría de masas (Cubedo, J., *et al.*, 2011, Journal of proteome research 10: 211-220). En ese estudio, se mostró que formas específicas de Apo J estaban aumentadas (Apo J-29) o disminuidas (Apo J-15) en las seis primeras horas tras el inicio del acontecimiento (figura 1). Aplicando estos criterios, se propuso que formas específicas de Apo J (Apo J-15 y Apo J-29) eran marcadores de daño tisular como el inducido por un infarto agudo de miocardio (IAM). En el mismo estudio, también se analizó si los cambios detectados en Apo J-15 y Apo J-29 podrían deberse a cambios en el perfil de glicosilación de la Apo J. Específicamente, se aislaron glicoproteínas del suero con una mezcla de concavalina A y lectinas de *Triticum vulgaris* (que se une a proteínas con residuos de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa, (GlcNAc)<sub>2</sub> y Neu5Ac). Las proteínas aisladas se analizaron mediante análisis de 2-DE seguido de la identificación por espectrometría de masas. En este análisis (figura 2), se encontró que solo las manchas 1, 2, 4, 5, 8 y 11 contenían residuos de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa, (GlcNAc)<sub>2</sub> y Neu5Ac, mientras que las manchas 3, 6, 7, 9, 10, 12 y 13 no tenían esos residuos. La intensidad de las manchas de Apo J glicosilada con residuos de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa, (GlcNAc)<sub>2</sub> y Neu5Ac fue menor en los pacientes con isquemia pre-IAM que en los controles. Esta disminución fue más evidente en las formas 4 y 8. Había una disminución del 25 % en la intensidad total de Apo J glicosilada con  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa, (GlcNAc)<sub>2</sub> y Neu5Ac en la fase temprana de isquemia. Por el contrario, las formas de Apo J sin esos residuos (3, 6, 7, 10, 12 y 13) estaban aumentadas en la fase temprana de la isquemia.

Sin embargo, debido a la especificidad múltiple de las lectinas utilizadas en los ensayos descritos anteriormente, estos ensayos fueron incapaces de discriminar cuál de las diferentes formas glicosiladas de la Apo J (formas que contienen residuos de  $\alpha$ -manosa, formas que contienen residuos de  $\alpha$ -glucosa, formas que contienen residuos de (GlcNAc)<sub>2</sub> y/o formas que contienen residuos de Neu5Ac) eran realmente los biomarcadores asociados al daño isquémico. Además, mediante el uso de la lectina de *Artocarpus integrifolia*, que se une a proteínas con residuos de  $\alpha$ -galactosa y GalNAc, que solo se encuentran en O-glicanos, se descubrió (figura 3), que solo las manchas 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 11 y 12 contenían residuos de  $\alpha$ -galactosa y GalNAc, mientras que las manchas 2, 5, 10 y 13 no tenían esos residuos. Por lo tanto, la disminución en las manchas 1, 2, 4, 5, 8 y 11 previamente notificada no solo era indicativa de una disminución en las formas que contienen residuos de  $\alpha$ -manosa,  $\alpha$ -glucosa, (GlcNAc)<sub>2</sub> y Neu5Ac ya que algunos de esas manchas también contienen residuos O-glicosilados y más específicamente residuos de  $\alpha$ -galactosa y GalNAc.

Con el fin de discriminar la presencia de diferentes tipos de residuos en la Apo J, se ha utilizado una metodología diferente. Esta metodología (a continuación en el presente documento conocida como ensayo de glicosilación enzimática de inmovilización o EGA) permite la detección específica y la cuantificación de diferentes formas de Apo J glicosilada. Este método de EGA se basa en: 1) una primera etapa, en la que las proteínas se inmovilizan mediante su unión a un residuo de glicosilación específico (tabla 1), 2) una segunda etapa, en la que la Apo J se detecta con un anticuerpo monoclonal o policlonal contra la secuencia proteica de Apo J, y 3) una etapa final, en la que la cantidad de la forma de Apo J glicosilada específica inmovilizada se detecta y cuantifica adicionalmente mediante un sistema o molécula indicadora. Este sistema indicador podría consistir en: a) un sistema colorimétrico como un anticuerpo secundario junto con un sistema indicador como biotina-estreptavidina-HRP; o b) un cambio fisicoquímico en el sistema (es decir, un cambio químico, eléctrico o magnético).

Tabla 1. Estructuras de glicanos e hidratos de carbono presentes en la Apo J y enfoque metodológico basado en lectinas específicas utilizado para detectarlos.

Enfoque metodológico	Tipo de lectina	Estructura del glicano/hidrato de carbono
Aislamiento de glicoproteínas basado en lectinas + Análisis por 2-DE e identificación de Apo J por MS	Concavalina A + <i>Triticum vulgare</i>	$\alpha$ -manosa + $\alpha$ -glucosa + (GlcNAc) <sub>2</sub> + Neu5Ac
	<i>Artocarpus integrifolia</i> <i>Triticum vulgare</i>	$\alpha$ -galactosa + GalNAc (GlcNAc) <sub>2</sub> + Neu5Ac
Ensayo de glicosilación enzimática de inmunoafinidad basado en lectinas -EGA- Validación del tipo de glicano en la Apo J	<i>Sambucus nigra</i>	$\alpha$ Neu5Ac(2→6)gal + GalNAc
	<i>Ulex europaeus</i>	$\alpha$ -L-fucosa
	<i>Glycine max</i>	GalNAc
	<i>Datura stramonium</i>	(GlcNAc) <sub>2</sub>

Utilizando esta metodología con diferentes lectinas, se ha descubierto que la Apo J glicosilada puede tener los siguiente residuos de glicano: a) (GlcNAc)<sub>2</sub> + Neu5Ac; b)  $\alpha$ Neu5Ac(2→6)gal + GalNAc; c)  $\alpha$ -L-fucosa; d) GalNAc sola; y e) (GlcNAc)<sub>2</sub> sola (figura 4).

5 El EGA se aplicó después para medir específicamente Apo J con residuos de (GlcNAc)<sub>2</sub> + Neu5Ac (Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc) en muestras de plasma de 38 pacientes con isquemia pre-IAM y en 144 controles sanos. Se descubrió que los pacientes con isquemia pre-IAM mostraban una disminución del 45 % en los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en la fase temprana de la isquemia en comparación con los controles (isquemia pre-IAM: 264±18 frente a C: 473±6 µg/ml; P<0,0001; figura 5A). Se tomaron muestras de pacientes con isquemia pre-IAM en el momento del ingreso (t=0) en las 6 primeras horas desde el inicio del dolor torácico y antes de la elevación de los marcadores de necrosis (troponina-T y CK). En ese momento, los pacientes no habían recibido ningún tratamiento debido al inicio del acontecimiento. El análisis estadístico C reveló que la medición de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc con EGA mostraba un elevado valor discriminante de la presencia de isquemia miocárdica con un área bajo la curva (AUC) de 0,934 (P<0,0001) y un valor de corte de 332 µg/ml con una sensibilidad del 97 % y una especificidad del 71 % (figura 5B y tabla 2). Por lo tanto, la medición de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc podría utilizarse como biomarcador en el diagnóstico de la isquemia.

20 Se analizaron además los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en 212 pacientes con STEMI con la metodología EGA. Se tomaron muestras en el momento del ingreso de los pacientes con STEMI (que incluían tanto acontecimientos *de novo* como acontecimientos secundarios) con diferentes tiempos de evolución del dolor isquémico (1 h-60 h) incluyendo pacientes con detección positiva de troponina-T en el ingreso (grupo de pacientes con necrosis). Los pacientes con STEMI mostraron una reducción del 15 % en los niveles plasmáticos de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso en comparación con el grupo de control (STEMI: 402±8 frente a C: 473±6 µg/ml; P<0,0001; figura 6A). El análisis estadístico C reveló que la medición de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc con EGA mostraba una capacidad discriminante para la presencia de isquemia miocárdica con un área bajo la curva (AUC) de 0,713 (P<0,0001) y un valor de corte de 409 µg/ml con una sensibilidad del 80 % y una especificidad del 53 % (figura 6B).

30 Cuando el EGA se aplicó después para medir específicamente Apo J con residuos de (GlcNAc)<sub>2</sub> (Apo J-GlcNAc) con la lectina de *Datura stramonium* en 340 pacientes con STEMI y en 139 controles sanos, se encontró una disminución del 35 % en los niveles en plasma de Apo J-GlcNAc en pacientes con STEMI en el momento del ingreso (STEMI: 328±7 frente a C: 506±12 µg/ml; P<0,0001; figura 6C). El análisis estadístico C reveló que la medición de los niveles de Apo J-GlcNAc mostraba una mayor capacidad discriminante para la presencia de isquemia miocárdica con un área bajo la curva (AUC) de 0,830 (P<0,0001) y un valor de corte de 393 µg/ml con una sensibilidad del 81 % y una especificidad del 72 % (figura 6D).

	Forma Apo J glicosilada	Valor de corte	Sensibilidad	Especificidad
Diagnóstico: isquemia miocárdica pre-IAM	Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc	<332 µg/ml	97%	71%
Diagnóstico: isquemia miocárdica STEMI	Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc	<409 µg/ml	80%	53%
	Apo J-GlcNAc	<393 µg/ml	81%	72%
Diagnóstico: isquemia cerebral	Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc	<424 µg/ml	66%	51%
Pronóstico: mortalidad y acontecimientos recurrentes	Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc	<398 µg/ml	55%	65%
	Apo J-GlcNAc	<287 µg/ml	58%	51%
	Apo J-GlcNAc	<273 µg/ml	64%	50%
Pronóstico: mortalidad	Apo J-GlcNAc	<273 µg/ml	64%	50%
Estratificación de riesgo: acontecimientos recurrentes en APC estable	Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc	<485 µg/ml	94%	64%

Tabla 2. Valores de corte y sensibilidad y especificidad asociadas aplicables al método para el diagnóstico de daño miocárdico, al método para el diagnóstico de isquemia cerebral, al método para el pronóstico de mortalidad y de acontecimientos recurrentes y para el método para la estratificación de riesgo en pacientes que padecen APC estable junto con los correspondientes valores de sensibilidad y especificidad.

## Ejemplo 2

Valor pronóstico de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc y de Apo J-GlcNAc

En una segunda fase se evaluó si la cuantificación específica de formas de Apo J glicosiladas podría tener un valor pronóstico. Los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc estaban correlacionados de forma significativa e inversa con el tiempo de isquemia (definido como el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas y el ingreso;  $R=-0,259$   $P=0,0003$ ; figura 7A). Además, la medición de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en 82 pacientes con STEMI 3 días después del ingreso reveló una disminución progresiva en comparación con el momento del ingreso ( $t=72$  h:  $331\pm 10$  frente a  $t=0$ :  $402\pm 8$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $P<0,0001$ ; figura 7B). Cuando se analizaron solo los niveles de Apo J-GlcNAc también hubo una correlación significativa e inversa con el tiempo de isquemia ( $R=-0,113$   $P=0,048$ ; figura 7C). Estos resultados subrayan que Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc y Apo J-GlcNAc son biomarcadores novedosos de la evolución de la isquemia.

Además, los pacientes con STEMI con un grado de flujo de TIMI final de 0 o 1, que está asociado a un peor pronóstico debido a un mayor riesgo de mortalidad intrahospitalaria y a 6 meses, mostraron niveles plasmáticos de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc significativamente más bajos en comparación con aquellos pacientes con STEMI con un flujo de TIMI final  $\geq 2$  (figura 8A). Adicionalmente, aquellos pacientes que padecieron un choque cardiogénico, que está asociado a un peor pronóstico tras padecer un STEMI, mostraron niveles plasmáticos de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc un 12 % más bajos en el momento del ingreso en comparación con los que no tuvieron un choque cardiogénico (figura 8B).

Además, hubo una correlación inversa y significativa entre los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc y la puntuación de riesgo GRACE, que está relacionada con la mortalidad ( $R=-0,257$   $P=0,0002$ ; figura 9A). Adicionalmente, atendiendo al cambio en los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac en el seguimiento de los 82 pacientes con STEMI, se observó que aquellos pacientes cuyos niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc eran incluso más bajos 3 días después del acontecimiento que en el momento del ingreso, mostraron valores más altos de puntuación de riesgo GRACE ( $P=0,002$ ; figura 9B). De forma similar, los niveles de Apo J-GlcNAc también estaban correlacionados de forma inversa y significativa con la puntuación de riesgo GRACE ( $R=-0,184$   $P=0,0006$ ; figura 9C). Todos estos resultados apuntan a un papel inesperado de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc y Apo J-GlcNAc como marcadores de estratificación de riesgo en el contexto de acontecimientos isquémicos.

Además, el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier reveló que aquellos pacientes con niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc por debajo del valor mediana del grupo con STEMI en el momento del ingreso, mostraron una diferencia significativa en la aparición de acontecimientos isquémicos recurrentes y en la tasa de mortalidad tras 6 meses de seguimiento ( $P=0,008$ ; figura 10A). Este efecto no se observó cuando se llevó a cabo el mismo análisis con la troponina-T ( $P=0,363$ ; figura 10B). Los niveles de Apo J-GlcNAc también tienen un valor pronóstico ya que el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier reveló que aquellos pacientes con STEMI con niveles de Apo J-GlcNAc en el cuartil más bajo en el ingreso ( $<236,8$   $\mu\text{g/ml}$ ) mostraron una disminución significativa en la tasa de supervivencia a los 6 meses de seguimiento ( $P=0,015$ ; figura 10C). También se observó una diferencia significativa cuando tanto la aparición de acontecimientos isquémicos recurrentes como la mortalidad después de 6 meses de seguimiento se tomaron como criterios de valoración en el análisis de Kaplan-Meier entre pacientes con STEMI con niveles de Apo J-GlcNAc en el cuartil más bajo en el momento del ingreso ( $<236,8$   $\mu\text{g/ml}$ ) y aquellos que mostraban valores más altos de Apo J-GlcNAc en el momento del ingreso ( $P=0,031$ ; figura 10D). Por tanto, los presentes resultados apuntan a un papel de los niveles plasmáticos de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc y Apo J-GlcNAc como marcadores pronósticos después de la presentación de isquemia.

## Ejemplo 3

Valor predictivo de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc para la presentación de acontecimientos isquémicos recurrentes (o bien cardíacos o bien cerebrales) en el contexto de arteriopatía coronaria (APC) estable.

El presente estudio ha mostrado otra propiedad inesperada de la medición de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc, un valor predictivo para la presentación de acontecimientos isquémicos recurrentes (o bien cardíacos o bien cerebrales) en el contexto de arteriopatía coronaria (APC) estable. Se han analizado los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc en un grupo de pacientes con APC crónica ( $N=34$ ) que habían padecido un síndrome coronario agudo (SCA) una media de  $0,6\pm 0,04$  años antes de la recogida de muestras y a los que se les hizo un seguimiento durante los  $2,3\pm 0,3$  años posteriores (figura 11A). Se obtuvieron muestras de plasma de dos grupos de pacientes: los que padecieron un acontecimiento isquémico agudo (cualquier síndrome coronario agudo (SCA), ictus o acontecimiento isquémico transitorio (TIA)) durante el seguimiento ( $N=16$ ) y los que no tuvieron ningún acontecimiento isquémico agudo ( $N=18$ ) durante el periodo de seguimiento. No había diferencias significativas en edad, incidencia de diabetes e hipertensión y parámetros de colesterol entre los dos grupos. Ninguno de los pacientes incluidos era fumador y todos ellos estaban en tratamiento con antiagregantes plaquetarios en el momento de la recogida de muestras. Los pacientes que padecieron un acontecimiento recurrente mostraron niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc un 28 % más bajos antes de padecer el acontecimiento que aquellos que no tuvieron

ningún acontecimiento en el seguimiento (figura 11B). En efecto, la curva de eficacia diagnóstica (ROC) mostró un valor predictivo de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc para la presentación de acontecimientos isquémicos recurrentes en pacientes con APC estable (figura 11C). Específicamente, en el presente estudio, niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc por debajo de 485  $\mu\text{g/ml}$  pudieron predecir la presentación de un acontecimiento isquémico recurrente con una sensibilidad del 94 % y una especificidad del 64 % en pacientes con APC estable (tabla 2). Por lo tanto, Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc muestra un valor adicional como marcador del proceso isquémico “silencioso” que precede a la presentación de un acontecimiento isquémico agudo recurrente en pacientes con APC estable.

#### Ejemplo 4

##### Papel de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc como biomarcador de isquemia cerebral

Adicionalmente, la medición de los niveles de Apo J-GlcNAc+Neu5Ac+ Apo J-GlcNAc en 174 pacientes con ictus reveló una disminución del 8 % en comparación con 164 controles sanos (ictus:  $418 \pm 7$  frente a C:  $453 \pm 7$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $P=0,0008$ ; figura 12), evidenciando que Apo J-GlcNAc+Neu5Ac + Apo J-GlcNAc es también un biomarcador de isquemia cerebral.



## REIVINDICACIONES

1. Método para el diagnóstico de isquemia o daño tisular isquémico en un sujeto que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico, en el que niveles reducidos de Apo J que contiene residuos de N-acetilglucosamina con respecto a un valor de referencia, o niveles reducidos de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico con respecto a un valor de referencia son indicativos de que el paciente padece isquemia o daño tisular isquémico.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la isquemia es isquemia miocárdica o cerebral.
3. Método según la reivindicación 2, en el que la isquemia miocárdica es isquemia miocárdica aguda o angina microvascular o en el que la isquemia cerebral es ictus.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se sospecha que el paciente ha padecido un acontecimiento isquémico.
5. Método según la reivindicación 4, en el que la determinación se lleva a cabo durante las primeras 6 horas tras el inicio del acontecimiento isquémico sospechado, antes de la elevación de los niveles de al menos un marcador de necrosis o antes de que el paciente haya recibido cualquier tratamiento para el acontecimiento isquémico sospechado.
6. Método para predecir la evolución de la isquemia en un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico o para determinar el pronóstico de un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente los niveles de Apo J glicosilada, en el que niveles reducidos de Apo J glicosilada con respecto a un valor de referencia son indicativos de que la isquemia está progresando o de un mal pronóstico del paciente, en el que la Apo J glicosilada es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico.
7. Método según la reivindicación 6, en el que el acontecimiento isquémico es un acontecimiento isquémico miocárdico, preferiblemente un infarto de miocardio con elevación de ST o en el que el pronóstico del paciente se determina como el riesgo de recaída a los 6 meses, el riesgo de mortalidad intrahospitalaria o el riesgo de mortalidad a los 6 meses.
8. Método para determinar el riesgo de que un paciente que padece enfermedad coronaria estable padezca un acontecimiento isquémico recurrente, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente los niveles de Apo J glicosilada, en el que niveles reducidos de Apo J glicosilada con respecto a un valor de referencia son indicativos de que el paciente muestra un riesgo aumentado de padecer un acontecimiento isquémico recurrente, en el que la Apo J glicosilada es Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico.
9. Método según la reivindicación 8, en el que el paciente que padece enfermedad coronaria estable ha padecido síndrome coronario agudo antes de la enfermedad coronaria estable o en el que el acontecimiento isquémico recurrente es un síndrome coronario agudo, un ictus o un acontecimiento isquémico transitorio.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la muestra es un fluido biológico, preferiblemente plasma o suero.
11. Uso de un kit que comprende
  - a. un primer reactivo que es una lectina que se une específicamente a un residuo de glicano seleccionado de N-acetilglucosamina o N-acetilglucosamina y ácido siálico, en el que el primer reactivo está inmovilizado, y
  - b. un segundo reactivo que es capaz de unirse de forma específica al polipéptido de Apo J,
 para el diagnóstico de isquemia o daño tisular isquémico en un paciente, para la determinación de la evolución de la isquemia en un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico, para el pronóstico de un paciente que ha padecido un acontecimiento isquémico o para la determinación del riesgo de que un paciente que padece enfermedad coronaria estable padezca un acontecimiento isquémico recurrente.
12. Uso según la reivindicación 11, en el que la lectina es la lectina de *Triticum vulgaris* o la lectina de *Datura stramonium* o una combinación de las mismas.

13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 o 12, en el que el segundo reactivo es un anticuerpo o un fragmento del mismo que contiene su región de unión a antígeno.
14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en el que el segundo reactivo contiene un marcador.
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la determinación del nivel de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico se determinan mediante el uso de un kit tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.
16. Método según la reivindicación 10, en el que el fluido biológico es plasma o suero.
17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la determinación del nivel de la Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) o de los niveles de Apo J glicosilada que contiene residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido siálico se determinan usando un método que comprende las etapas de:
  - (i) poner en contacto la muestra con una lectina que se une específicamente a un residuo de glicano presente en la Apo J glicosilada en condiciones adecuadas para la formación de un complejo entre la Apo J glicosilada en la muestra y la lectina, en el que la lectina usada en la etapa (i) es una lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina o una lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina y ácido siálico y en el que la lectina que se une específicamente a un residuo de glicano está inmovilizada y
  - (ii) detectar la cantidad de complejo que contiene la lectina y la Apo J glicosilada.
18. Método según la reivindicación 17, en el que la lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina es la lectina de *Datura stramonium* o en el que la lectina que se une específicamente a N-acetilglucosamina y ácido siálico es la lectina de *Triticum vulgare*.
19. Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 o 18, en el que el complejo en la etapa (ii) se detecta usando un reactivo que se une específicamente al polipéptido de Apo J o usando un reactivo que es capaz de unirse específicamente a un reactivo que se une específicamente al polipéptido de Apo J.
20. Método según la reivindicación 19, en el que el reactivo que se une específicamente al polipéptido de Apo J o el reactivo que es capaz de unirse específicamente al reactivo que se une específicamente al polipéptido de Apo J es un anticuerpo o un fragmento del mismo que contiene su región de unión a antígeno, opcionalmente acoplado a un marcador detectable.

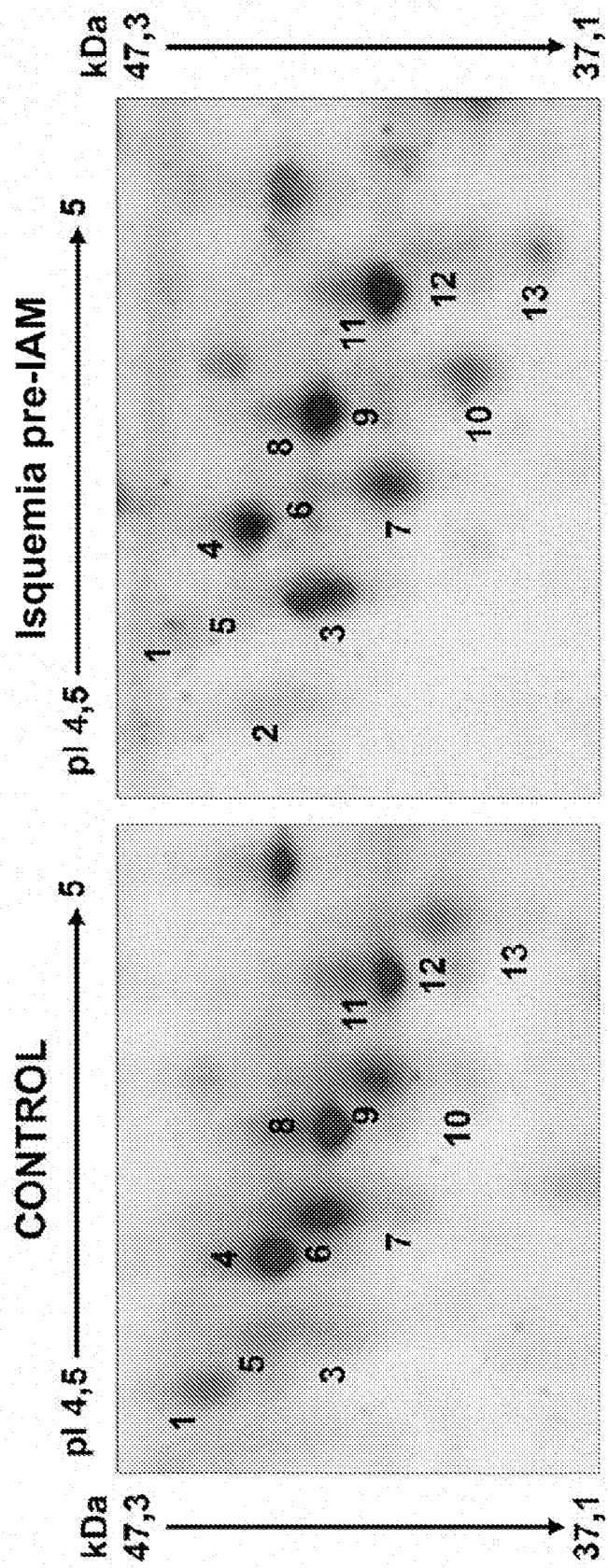


Fig. I

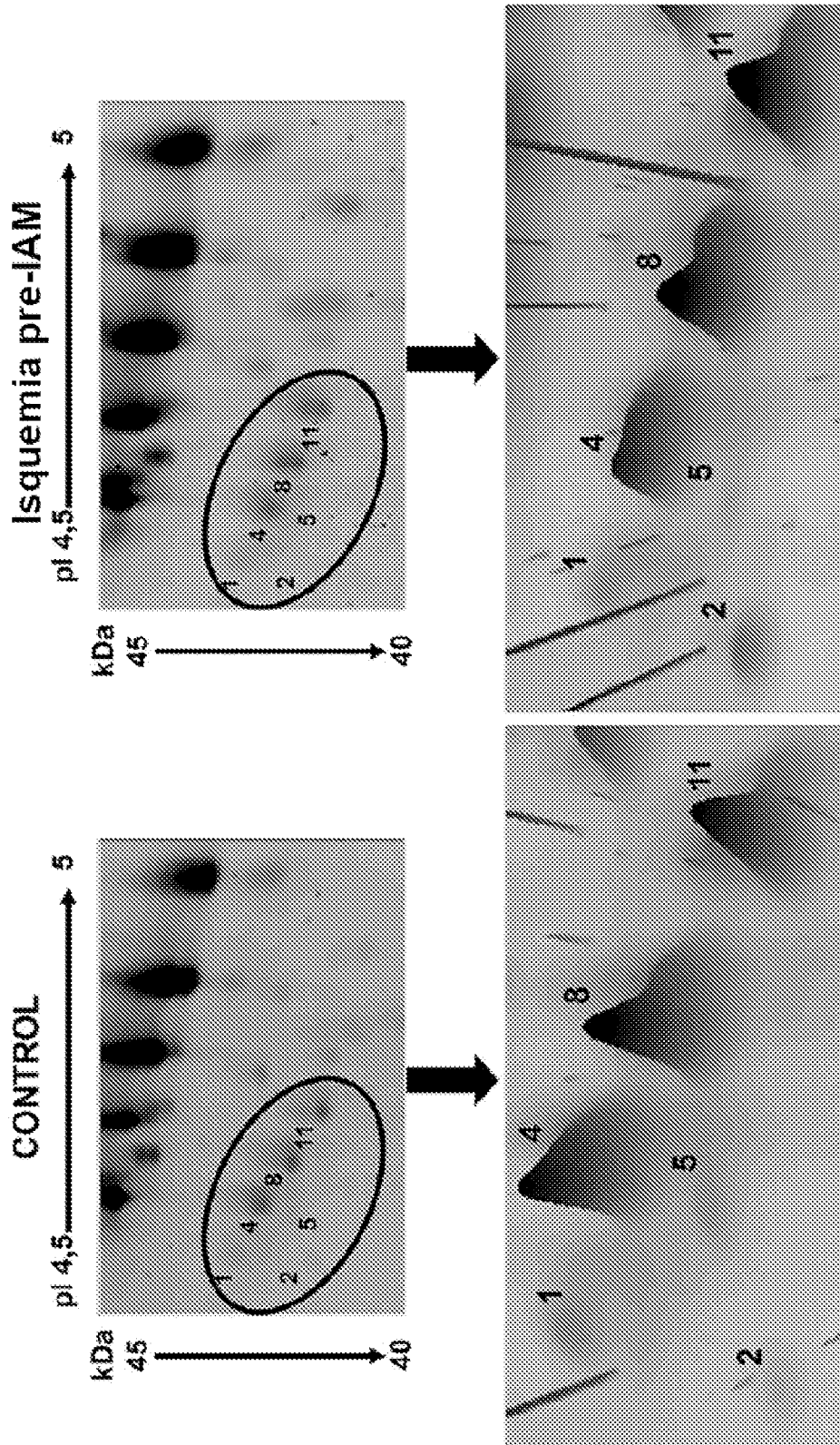


Fig. 2

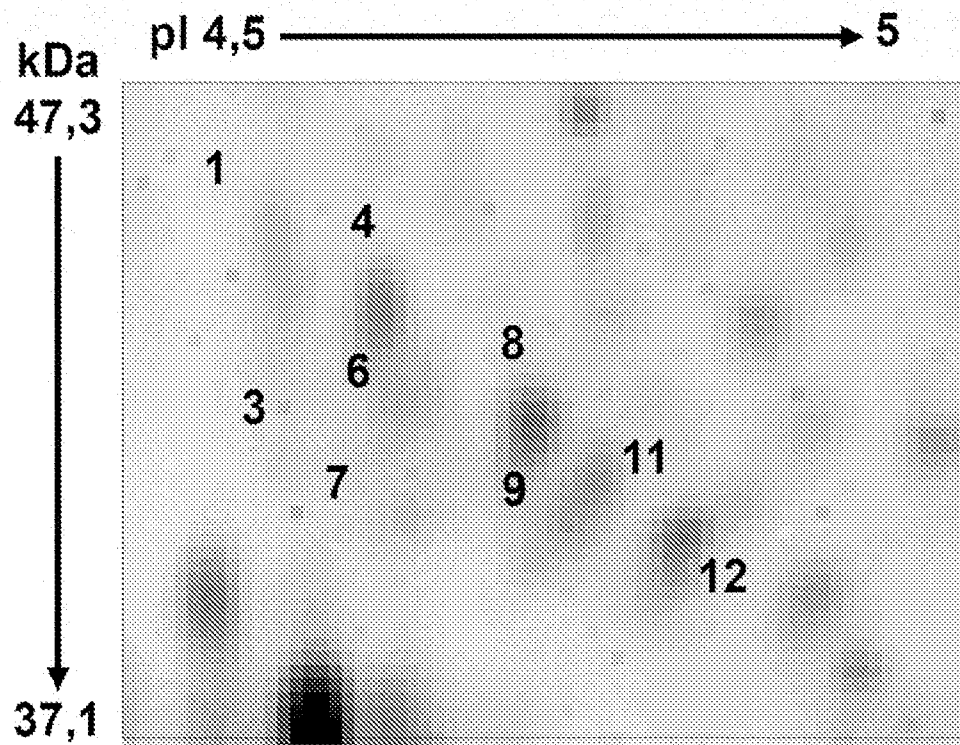


Fig. 3

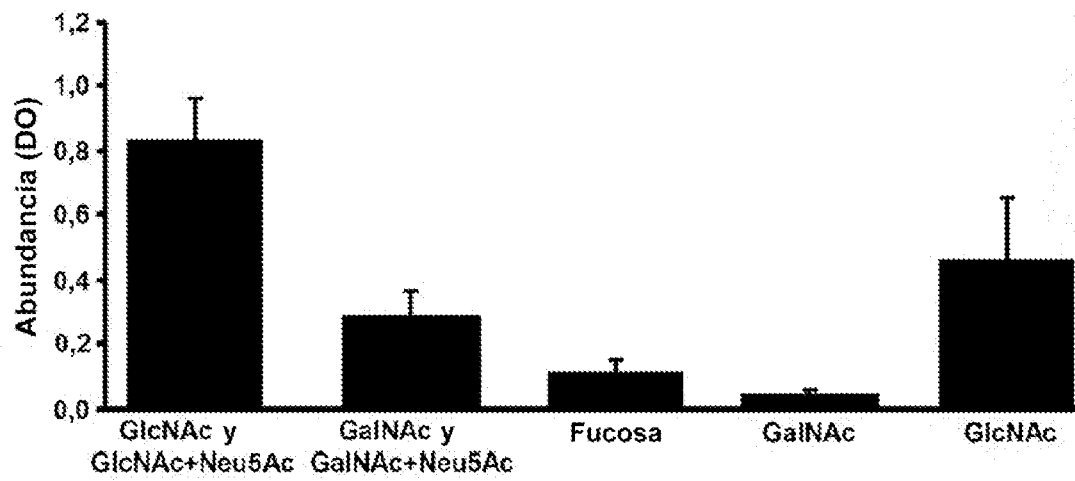


Fig. 4

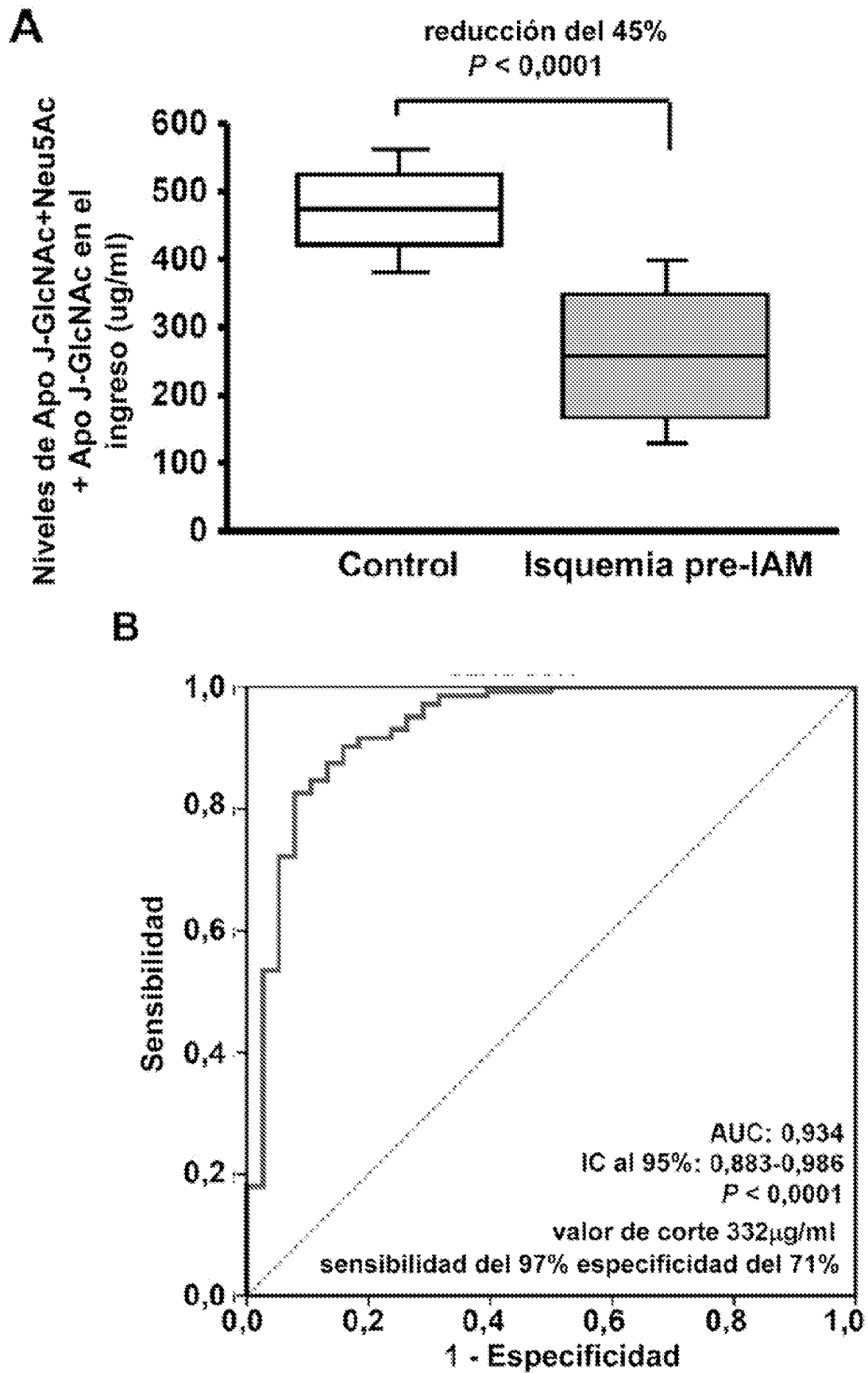


Fig. 5

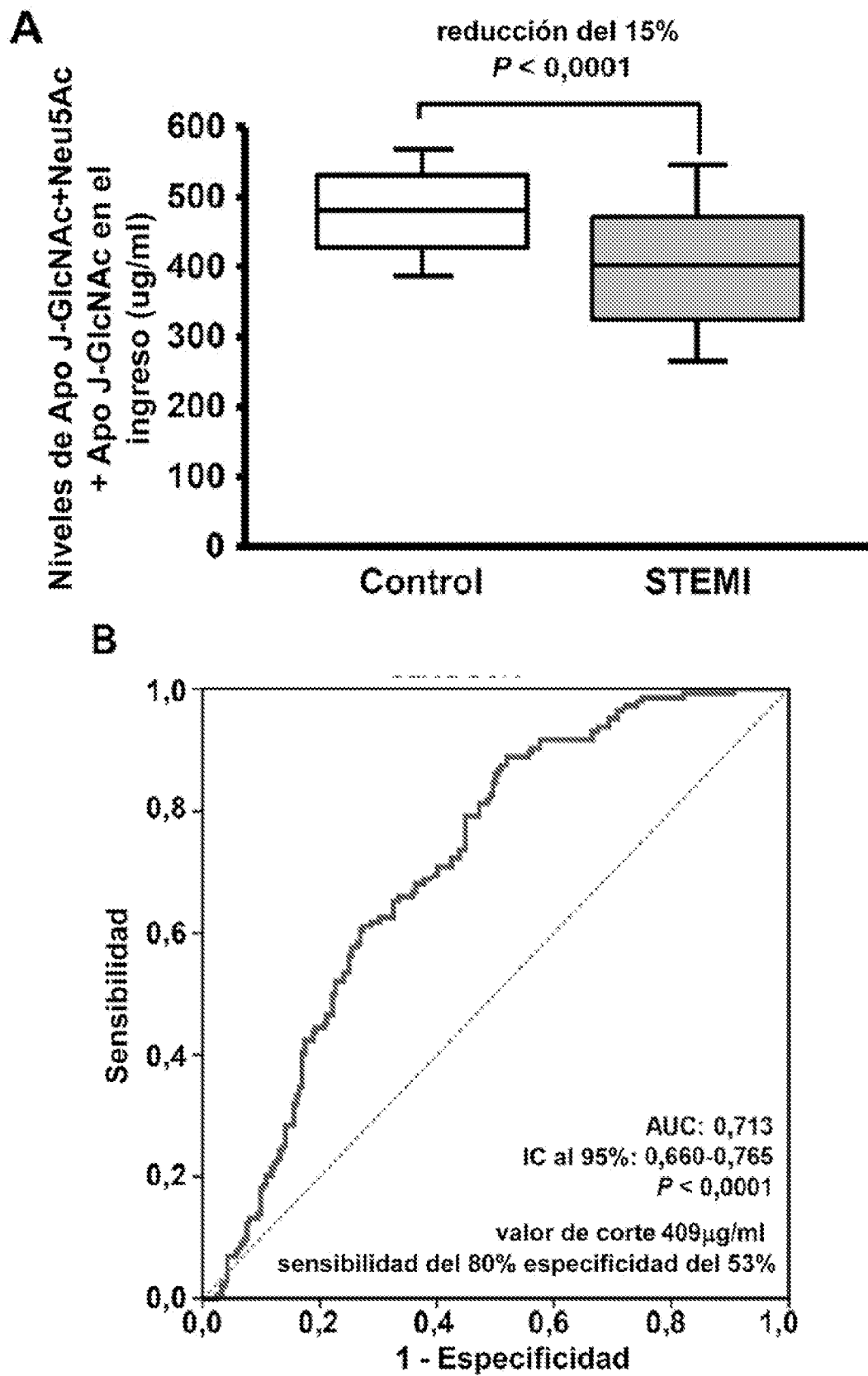
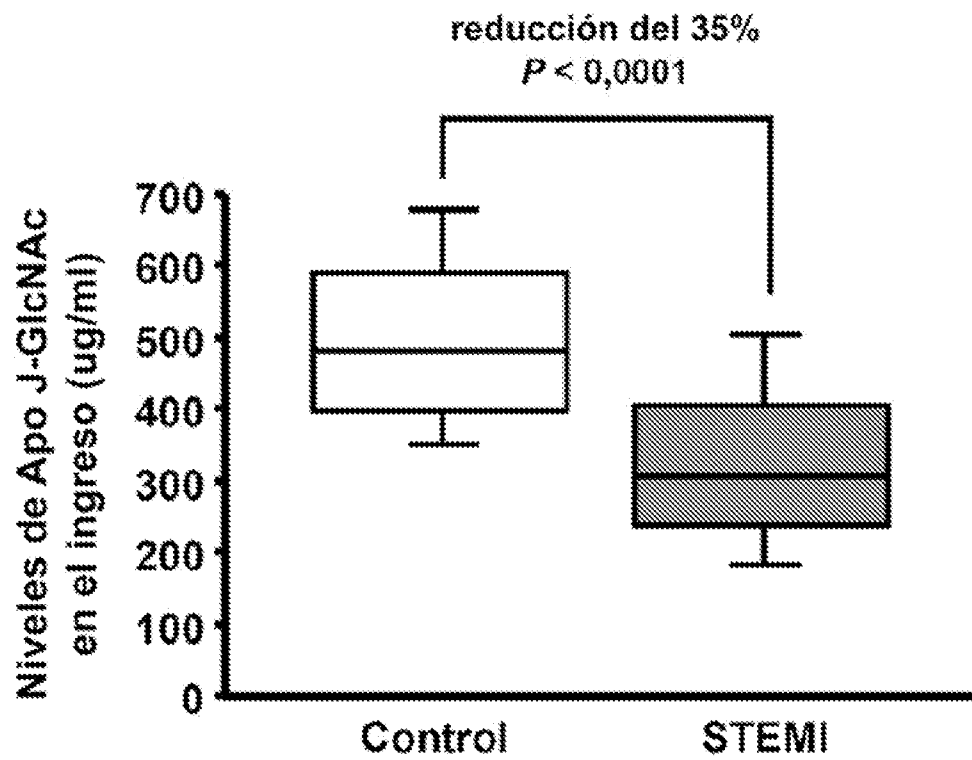


Fig. 6

**C**



**D**

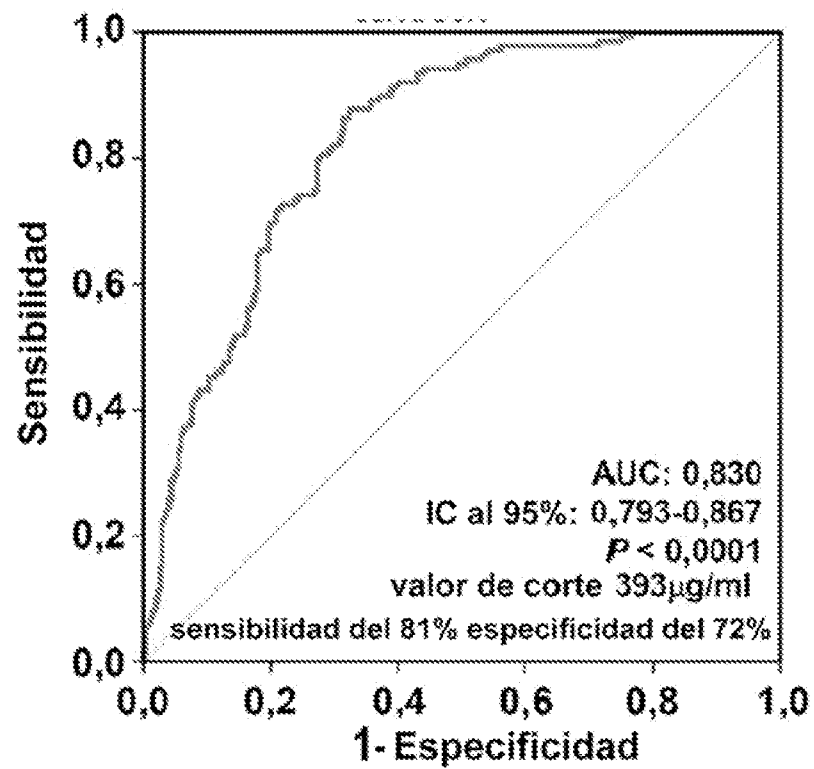


Fig. 6 (cont.)



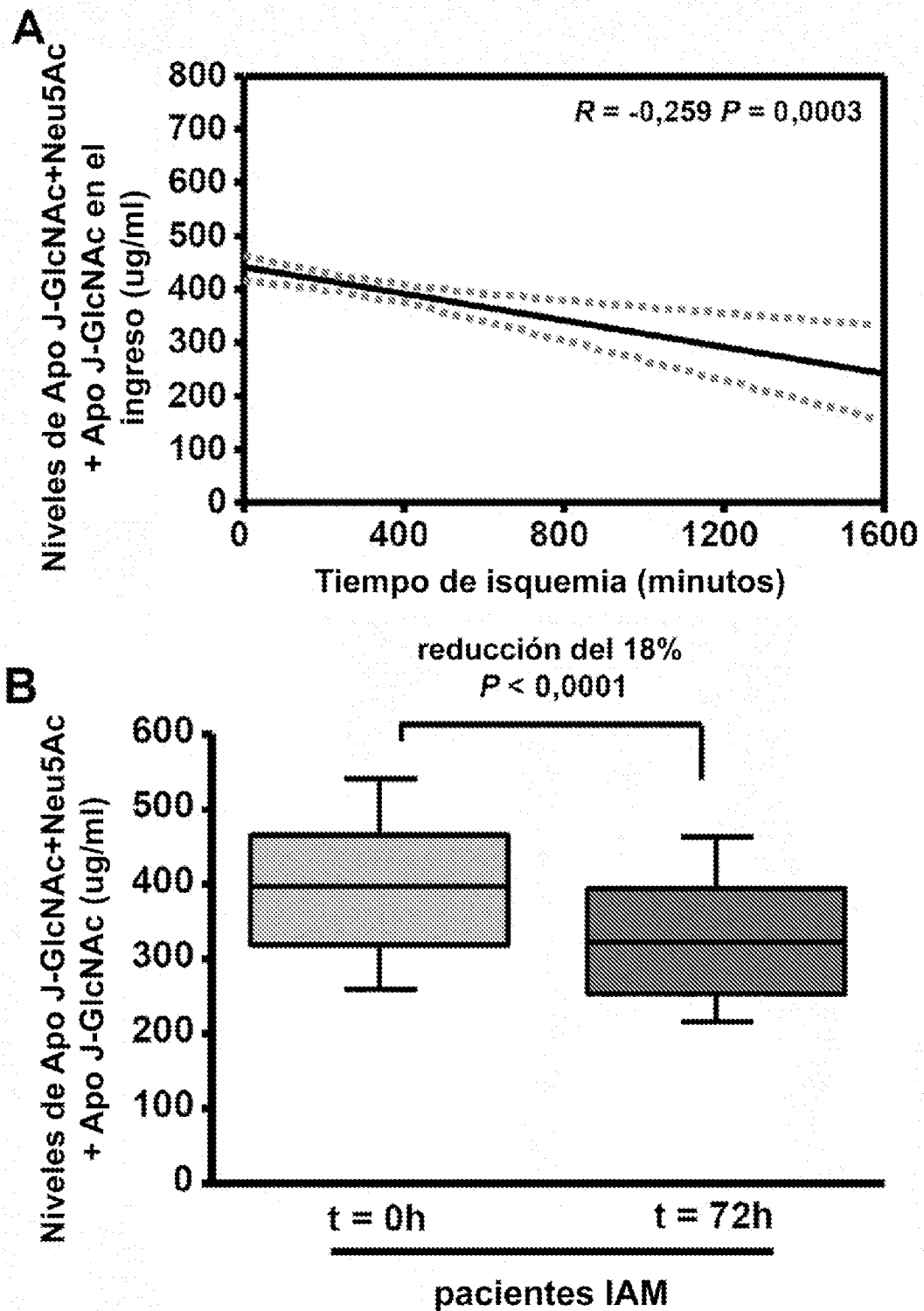


Fig. 7

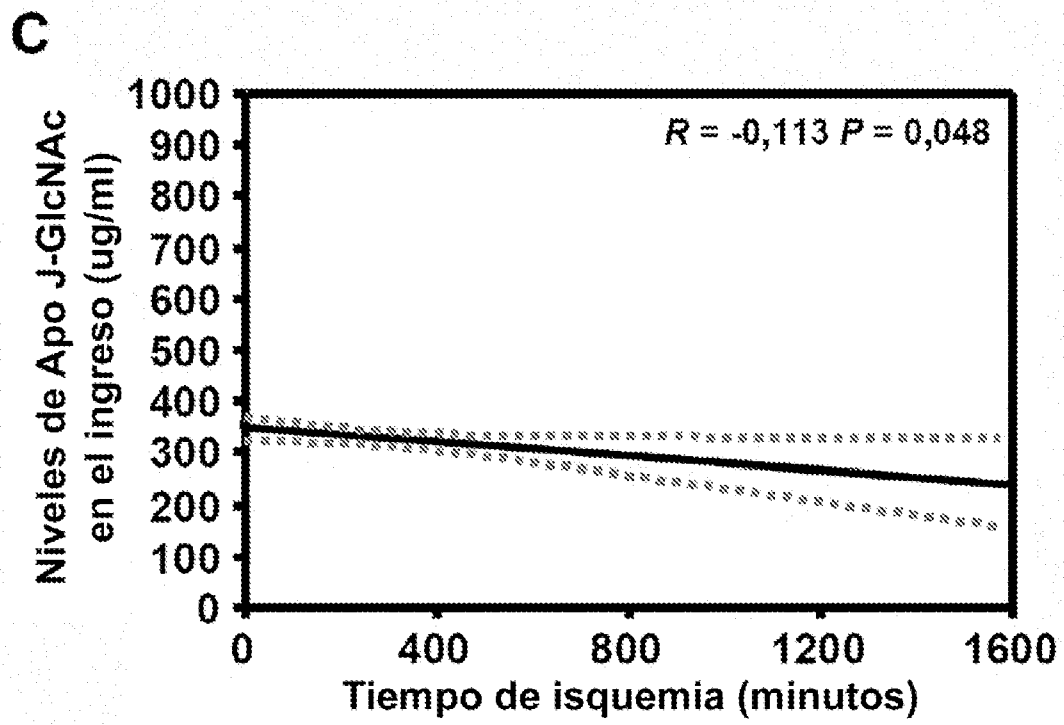


Fig. 7 (cont.)

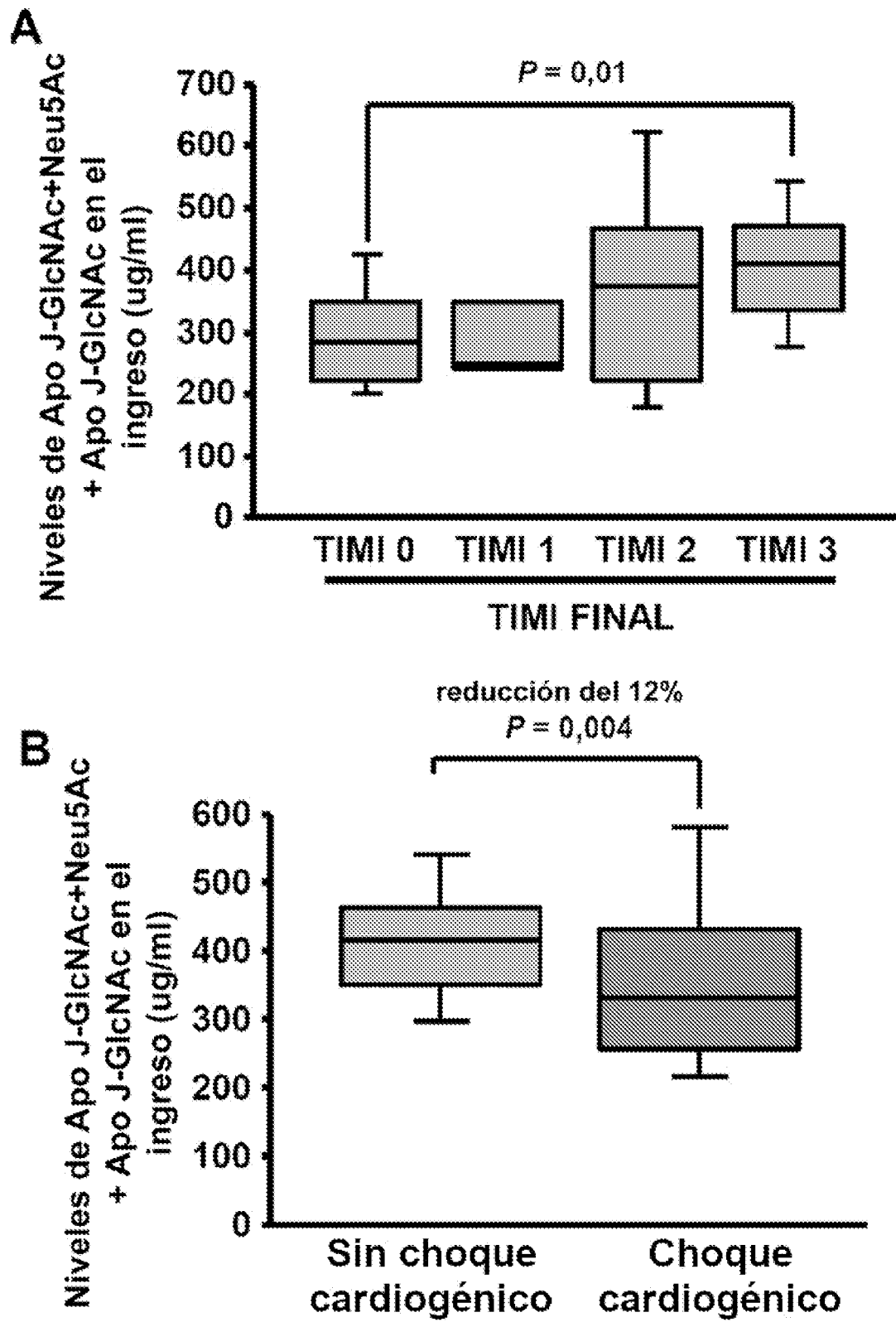


Fig. 8

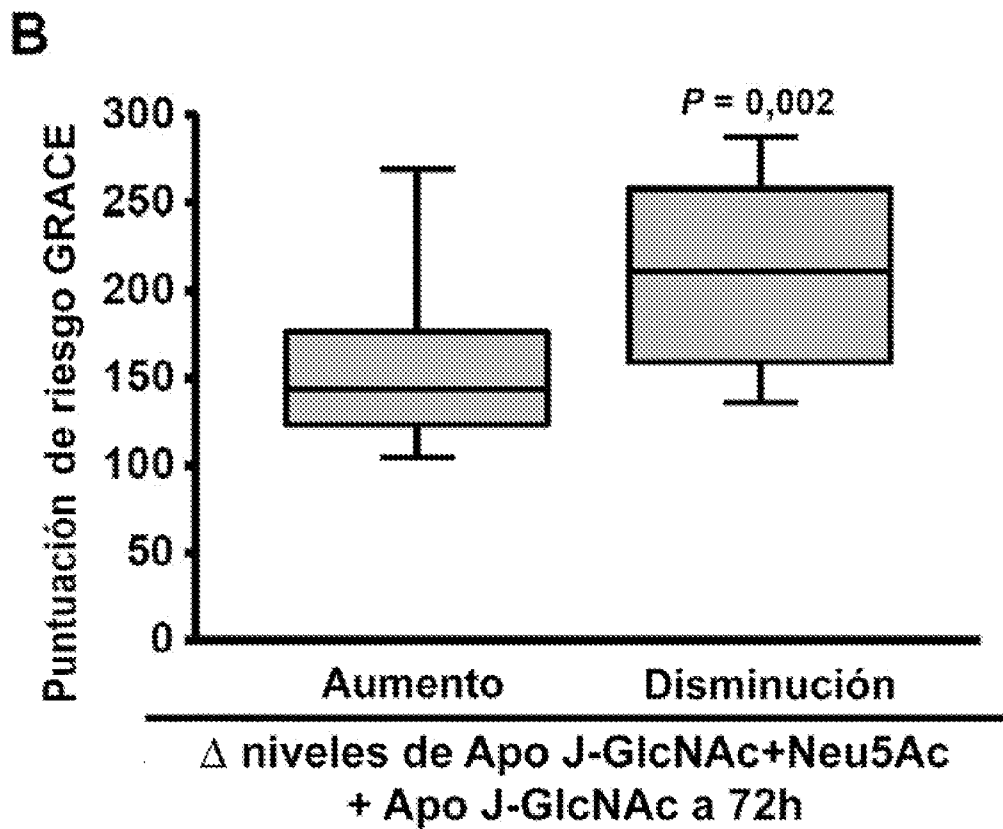
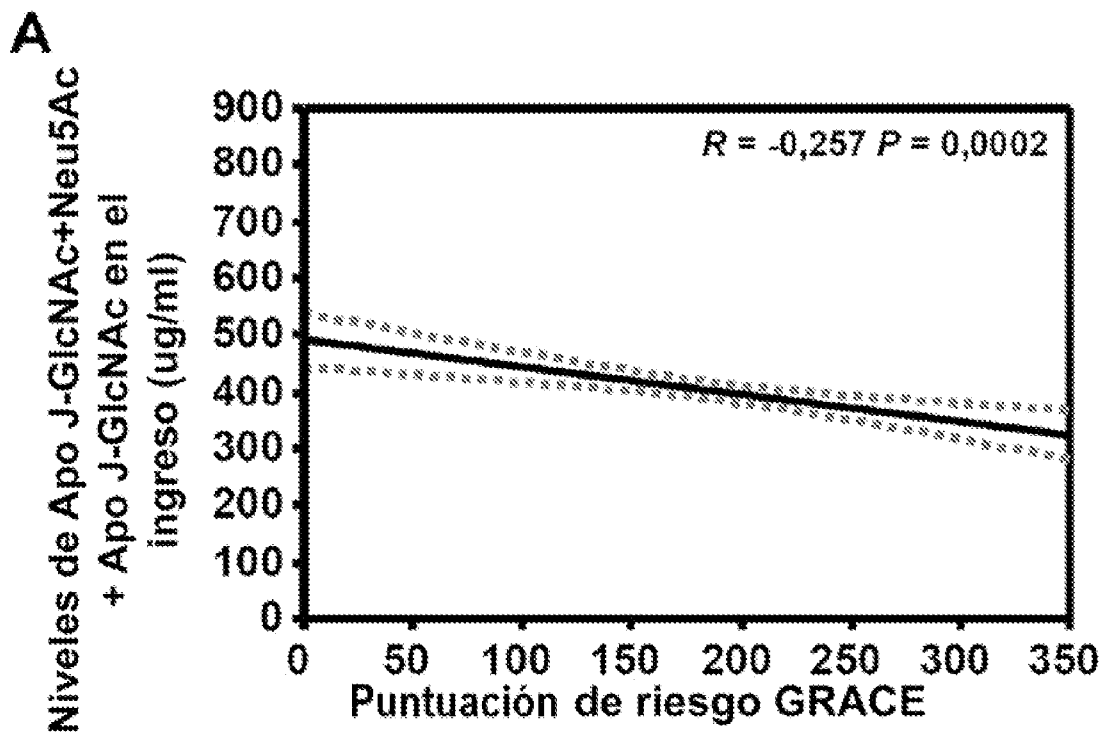


Fig. 9

**C**

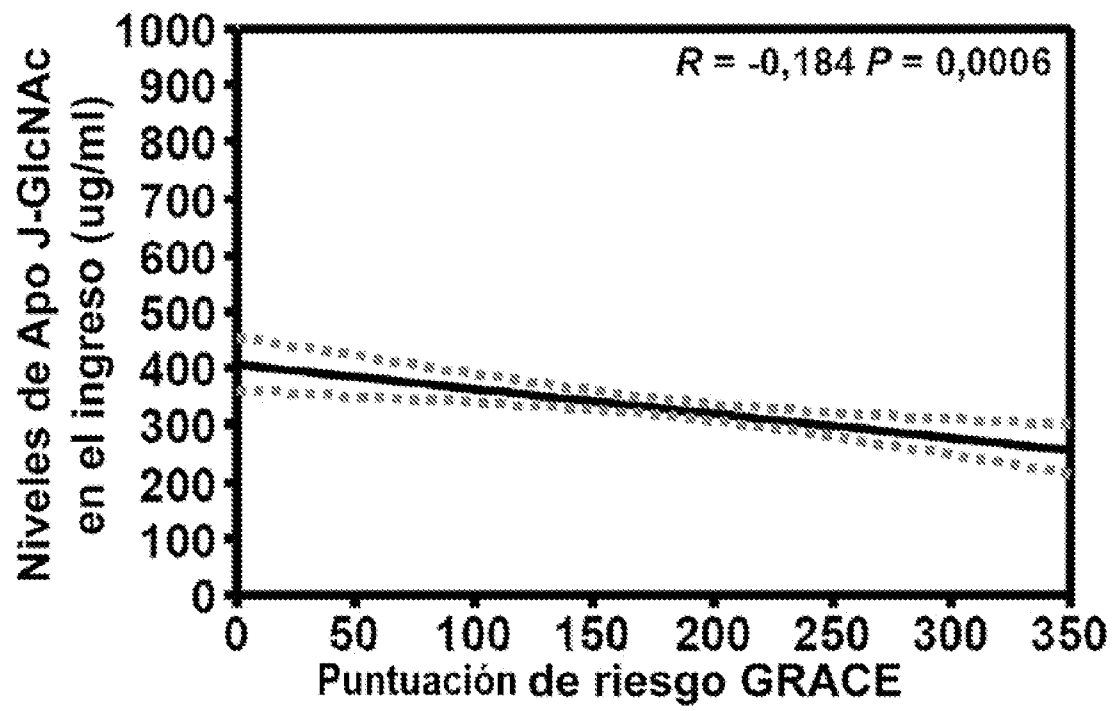
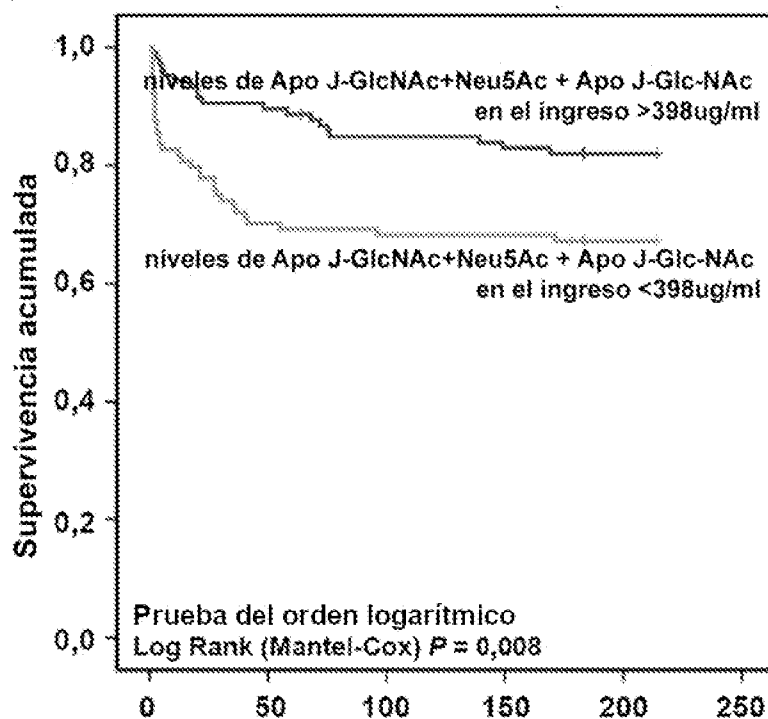
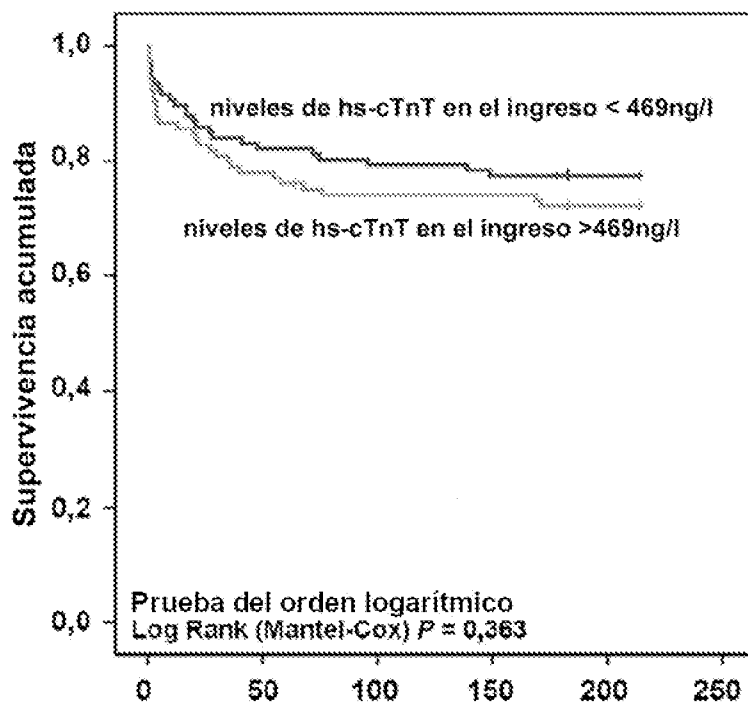


Fig. 9 (cont.)

**A** Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier

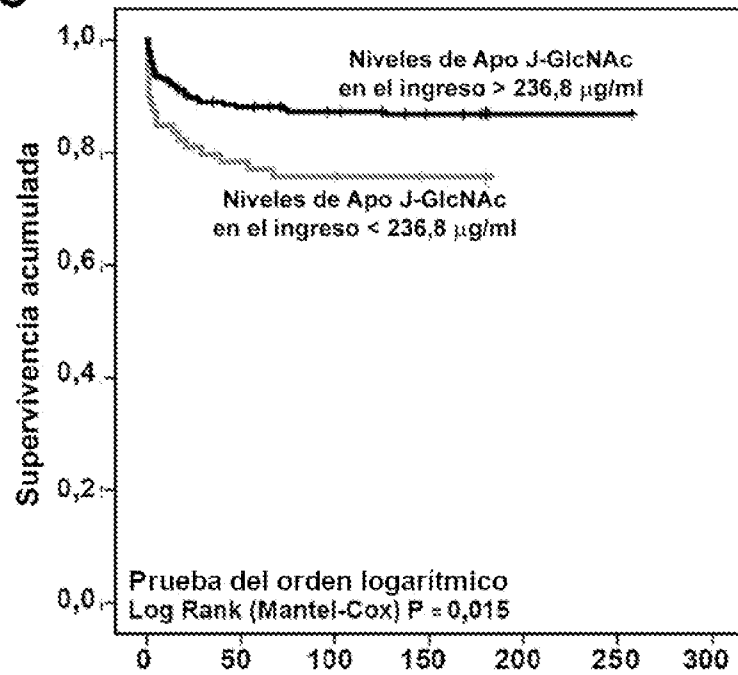
Crit. val. MACE total/*Exitus*(días) a los 6 meses de seguimiento

**B** Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier

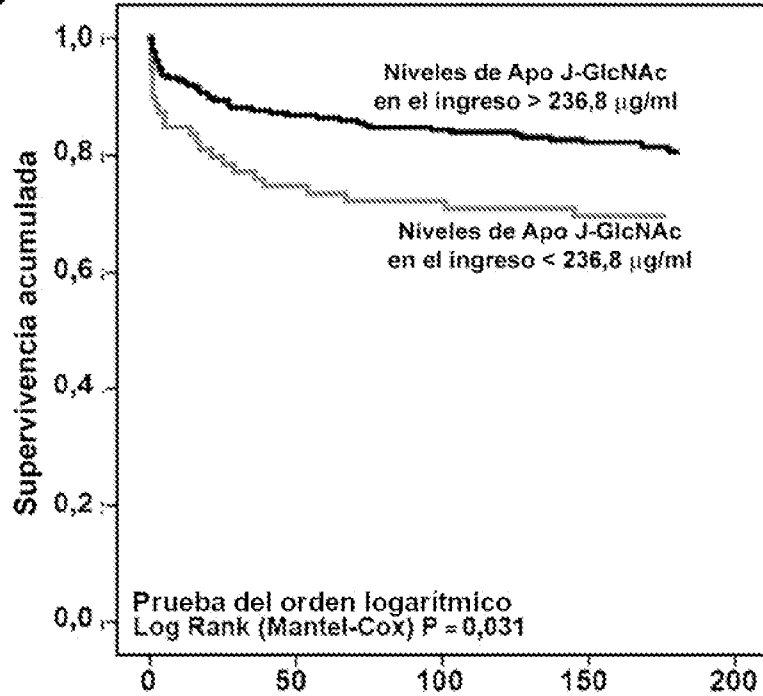
Crit. val. MACE total/*Exitus*(días) a los 6 meses de seguimiento

**Fig. 10**

**C** Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier



**D** Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier



Crit. Val. MACE total/*Exitus* (días) a los 6 meses de seguimiento

Fig. 10 (cont.)

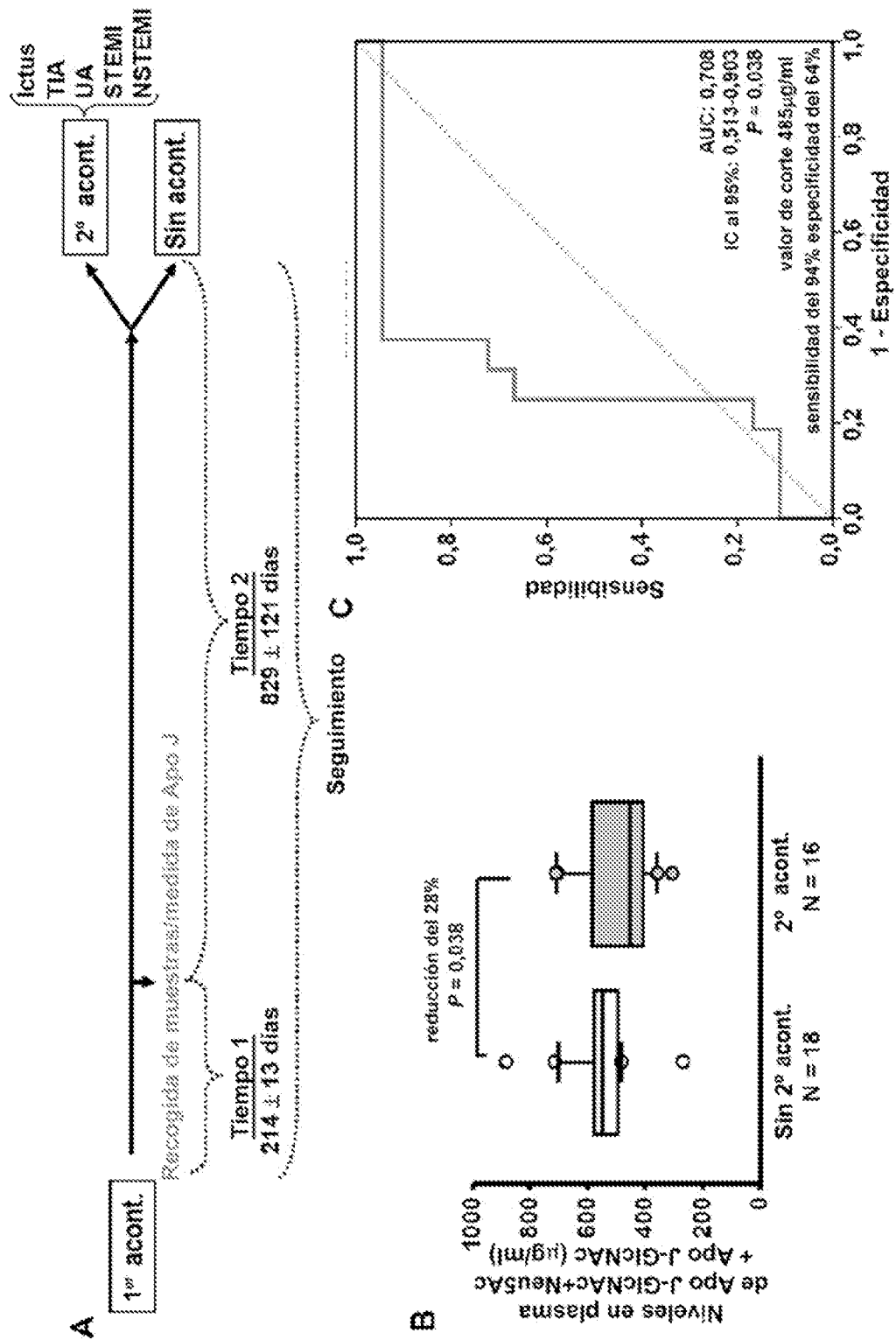


Fig. 11



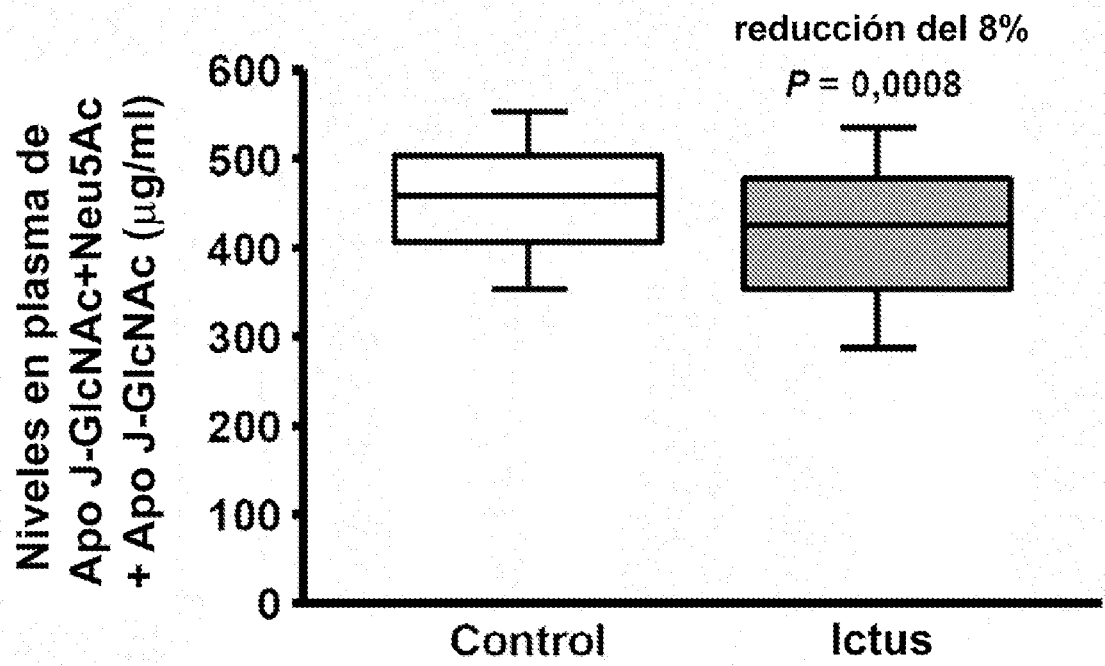


Fig. 12