



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 364 169**

② Número de solicitud: 201030168

⑤ Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **09.02.2010**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **26.08.2011**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**26.08.2011**

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 50 %)  
**c/ Serrano, 117**  
**28006 Madrid, ES**  
**Institut Català de Ciències Cardiovasculars (ICCC)** (Titular al 50 %)

⑧ Inventor/es: **Badimon Maestro, Lina;**  
**Cubedo Ráfols, Judit y**  
**Padró Capmany, Teresa**

⑨ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑮ Título: **Uso de las isoformas de Apo J como biomarcadores de lesión tisular.**

⑯ Resumen:

Uso de las isoformas de Apo J como biomarcadores de lesión tisular.

La invención se refiere al uso de las formas glicosiladas de la Apolipoproteína J como marcadores de daño tisular, más concretamente producido de infarto agudo de miocardio, así como a un método de diagnóstico de dicho daño y a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dicho diagnóstico. En la presente invención se demuestra que las diversas formas glicosiladas varían su expresión si existe daño tisular lo que permite utilizarlas como marcadores en caso de existir este daño.

ES 2 364 169 A1

## DESCRIPCIÓN

Uso de las isoformas de Apo J como biomarcadores de lesión tisular.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biomedicina. Específicamente, se refiere al uso de las formas glicosiladas de la Apolipoproteína J como marcadores de daño tisular, más concretamente producido de infarto agudo de miocardio, así como a un método de diagnóstico de dicho daño y a un kit que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo dicho diagnóstico.

10 **Estado de la técnica anterior**

El infarto agudo de miocardio es una de las mayores causas de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. Multitud de los hábitos de vida actuales representan factores de riesgo para esta enfermedad como por ejemplo la obesidad, el tabaquismo, los elevados niveles de colesterol, etc. Esta patología provoca daños en el tejido cardíaco los cuales se mantienen tras el evento inicial. Debido a la imposibilidad de realizar biopsias en dicho tejido, se hace necesaria la obtención de marcadores que sirvan para diagnosticar el alcance de dicho daño.

Se han propuesto como marcadores de este daño múltiples proteínas, muchas de las cuales se encuentran implicadas en la formación de placas de ateroma o metabolismo de lípidos como por ejemplo las lipoproteínas de alta densidad. Además de éstas, también se han propuesto proteínas que se asocian con dichas lipoproteínas como la apolipoproteína A-I o la apolipoproteína J (Apo J).

Esta Apo J (clusterina, TRPM2, CLI, NA1/NA2, ku70-binding protein 1, Aging-associated gene 4 protein, o SP-40,40) se asocia a las HDL mediante la unión a Apo A-I (Stuart *et al.* 1992, *Biochemistry*, 31: 8552-8559). Apo J fue inicialmente descrita como una glicoproteína heterodimérica, secretada por células de Sertoli de ratas, cultivadas *in vitro*. El producto de la traducción es un precursor de cadena simple el cual sufre una digestión dando lugar a dos subunidades, una de 34 kDa y otra de 47 kDa. Se ha demostrado que Apo J presenta diversas N-glicosilaciones que llevan asociados azúcares complejos los cuales contribuyen a entre un 20% y un 30% del peso total de Apo J.

Dicha proteína ha sido asociada con multitud de procesos celulares que tienen como resultado por ejemplo efectos citoprotectores (Schwochau *et al.* 1998, *Kidney Int*; 53: 1647-1653), antiinflamatorios (McLaughlin *et al.* 2000, *J Clin Invest*; 106: 1105-1113), o antiapoptóticos (Zhang *et al.* 2005, *Nat Cell Biol*; 7: 909-915). Apo J además, se une a multitud de moléculas con elevada afinidad incluyendo tanto lípidos como péptidos o proteínas.

Por otro lado, también se ha descrito que Apo J presenta diferentes actividades en función del momento del ciclo celular en el que actúe (Trouwakos *et al.* 2005, *Free Radic Biol Med*; 38: 436-449).

Apo J también ha sido relacionada con diversas patologías como pueden ser, por ejemplo, la diabetes o diferentes tipos de cáncer. Esta proteína también es abundante en enfermedades ateroscleróticas.

Por otro lado, Apo J ha sido relacionada con enfermedades cardíacas coronarias. Esta última relación no se encuentra muy bien definida ya que existen datos respecto tanto a un aumento como a una disminución de dicha proteína en caso de existir una patología cardíaca coronaria (Trouwakos *et al.* 2002, *Exp Gerontol*; 37: 1175-1187; Kujiraoka *et al.* 2006, *J Atheroscler Thromb*; 13: 314-322). Esta controversia o variedad de datos provoca que los niveles totales en suero y/o plasma de dicha proteína no sean un buen marcador de daño cardíaco ya que su respuesta no es constante cuando se da un evento vascular.

Esto hace que sea necesaria la búsqueda de nuevos marcadores de daño tisular más fiables que Apo J y que no presenten este inconveniente.

50 **Descripción de la invención**

La presente invención se refiere al uso de las formas glicosiladas de la Apolipoproteína J, preferiblemente de los conjuntos Apo J-15 y Apo J-29, como marcadores de daño tisular, más concretamente de daño cardíaco producido por infarto agudo de miocardio. También se refiere a un método de diagnóstico de dicho daño y al kit que comprende los elementos necesarios para la realización de dicho método.

En la presente invención se demuestra como en pacientes que han sufrido un síndrome coronario agudo la cantidad de Apo J total se encuentra alterada respecto a individuos que no han sufrido este evento. Dicha Apo J presenta diferentes isoformas con diversos estados de glicosilación. La cantidad de Apo J total puede variar enormemente en un mismo evento entre diversos individuos ya que algunas de sus isoformas aumentan mientras otras disminuyen, y no en todos los individuos las proporciones de las mismas son iguales. Por ello la detección de Apo J total no es un marcador adecuado para el diagnóstico de daño tisular. Este problema se puede solventar mediante la detección de una única isoforma glicosilada o de grupos de isoformas que respondan de igual forma en todos los individuos y en la misma enfermedad.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una isoforma glicosilada de Apo J como marcador de daño tisular.

## ES 2 364 169 A1

En la presente invención se entiende por “daño tisular” aquel daño que se genera en un tejido y que supone una alteración en el mismo de su situación fisiológica, ya sea en estructura o en función. Este daño tisular para el que es útil el uso de las formas glicosiladas de Apo J se da en tejidos que se seleccionan de la lista que comprende, tejido cardíaco, tejido vascular o tejido renal.

5 La proteína Apolipoproteína J o Apo J (también denominada clusterina, TRPM2, CLI, NA1/NA2, ku70-binding protein 1, Aging-associated gene 4 protein, o SP-40,40), se encuentra codificada en *Homo sapiens* por el gen CLU con número de identificación en el GenBank 1191. Esta proteína incluye tanto las formas sin glicosilar como las formas glicosiladas. Existen 2 formas conocidas de esta proteína generadas por diferentes ARNm a partir del mismo gen. La isoforma 1 es traducida a partir del ARNm con número de acceso al GenBank NM\_001831. La isoforma 2 es traducida a partir del ARNm con número de acceso al GenBank NM\_203339.

En la presente invención se entiende por “Apo J total” la cantidad de Apo J presente incluyendo sus diversas isoformas y diferentes estados de glicosilación.

15 Se entiende por “isoforma glicosilada de Apo J” o “forma glicosilada de Apo J” en la presente invención aquella proteína cuya secuencia de aminoácidos es igual a Apo J, y que presenta unido al menos un azúcar en cualquiera de sus aminoácidos mediante un enlace N-glicosídico u O-glicosídico.

20 Existen multitud de estados de glicosilación de Apo J ya sea en cuanto a cantidad de aminoácidos glicosilados, como a la composición en azúcares de dichas glicosilaciones. Estas variaciones le confieren a las diferentes formas glicosiladas de Apo J diversas características en cuanto a tamaño y punto isoeléctrico (pI). El peso molecular varía en función de la glicosilación desde los 37,1 a los 47,3 kDa, y el punto isoeléctrico de 4,6 a 5. Cada una de dichas formas presenta diferentes características y diversos patrones de expresión en función del estado fisiológico de cada individuo.

25 En el caso de daño tisular, existen grupos de formas que se comportan de igual forma, es decir aumentando o disminuyendo, en la misma patología en todos los individuos. Como se demuestra en la figura 2 de la presente invención, los *spots* de las formas glicosiladas que presentan una mayor variación y por lo tanto una mayor utilidad para el diagnóstico son las formas correspondientes a los *spots* 6 y 9 (Apo J-15) las cuales disminuyen, y a los *spots* 3, 7, 8 y 11 (Apo J-29), los cuales aumentan. Por tanto, los *spots* que conforman el grupo Apo J-15 son el *spot* número 6 que se corresponde con una forma glicosilada de Apo J con un peso molecular de aproximadamente 43,2 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 4,8 en una electroforesis bidimensional, y el *spot* número 9 que se corresponde con una forma glicosilada de Apo J con un peso molecular de aproximadamente 41,2 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de aproximadamente 4,9 en una electroforesis bidimensional. En los ejemplos de la presente invención se muestra que ambos *spots* sufren una reducción superior al 50% en caso de daño tisular.

30 Por su parte Apo J-29 engloba cuatro formas glicosiladas de Apo J diferentes. Estas formas se corresponden con los *spots* 3, 7, 8 y 11 de los ejemplos de la presente invención. El *spot* 3 es una forma glicosilada de Apo J con un peso molecular de aproximadamente 44,8 kDa y un pI de aproximadamente 4,6; el *spot* 7 es una forma glicosilada de Apo J con un peso molecular de aproximadamente 41 kDa y un pI de aproximadamente 4,8; el *spot* 8 es una forma glicosilada de Apo J con un peso molecular de aproximadamente 44 kDa y un pI de aproximadamente 4,8; el *spot* 3 es una forma glicosilada de Apo J con un peso molecular de aproximadamente 42,2 kDa y un pI de aproximadamente 5. Todos los puntos isoeléctricos y pesos moleculares de las formas del conjunto Apo J-15 y del conjunto Apo J-29 se refieren a una movilidad electroforética obtenida mediante la técnica de la electroforesis bidimensional y sometida, por tanto a la variabilidad que esta metodología comporta.

35 El uso de las formas incluidas en los conjuntos Apo J-15 y Apo J-29 bien de forma independiente o bien en combinación, supone una mejora en los marcadores para el estudio del daño tisular. Al ser las formas de estos conjuntos las que mejor responden, estas son las formas glicosiladas preferidas para identificar el daño tisular. Por tanto, una realización preferida de este aspecto de la invención, se refiere al uso de al menos una forma glicosilada de Apo J como marcador de daño tisular donde la forma glicosilada se selecciona del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29. En una realización más preferida las formas glicosiladas son todas las del conjunto Apo J-15 y/o todas las del conjunto Apo J-29.

40 En la presente invención se demuestra que Apo J total presenta variaciones en tejido cardíaco dañado frente a un tejido cardíaco sano. Esto viene determinado por las variaciones en las diversas formas glicosiladas de la proteína. Uno de los eventos más importantes que generan daño en el tejido cardíaco es el infarto agudo de miocardio, que es una de las enfermedades de mayor incidencia en el mundo. En la presente invención, se demuestra que este infarto de miocardio provoca variaciones en la cantidad de las formas de Apo J en diversos estados de glicosilación respecto a individuos que no sufren este infarto. Por tanto, en una realización aun más preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una forma glicosilada de Apo J, preferiblemente seleccionada del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29, más preferiblemente todas las del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29, como marcador de daño cardíaco, preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio.

45 Apo J también se puede encontrar alterada en tejido renal. Por tanto, otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso de al menos una forma glicosilada de Apo J, preferiblemente seleccionada del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29, más preferiblemente todas las del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29, como marcador de daño renal.

## ES 2 364 169 A1

Otra realización preferida se refiere al uso de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pl 4,9 aproximadamente en una electroforesis bidimensional, como marcadores de daño tisular preferiblemente de daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto de miocardio.

Otra realización preferida se refiere al uso de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pl 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pl 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional como marcadores de daño tisular preferiblemente de daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto de miocardio.

Otra realización preferida se refiere al uso de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pl 4,9 aproximadamente, de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pl 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pl 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional como marcadores de daño tisular, preferiblemente de daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto de miocardio.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico o monitorización del tratamiento de un daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio que comprende los siguientes pasos:

a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y

b) detectar la cantidad de al menos una forma glicosilada de Apo J en la muestra obtenida en el paso (a).

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico o monitorización del tratamiento de un daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio que comprende además de los pasos (a) y (b) descritos anteriormente, un paso adicional:

c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia obtenida de una muestra control.

En una realización más preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas que se detectan en el paso (b) se seleccionan del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29. En una realización aun más preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas que se detectan en el paso (b) son todas las del conjunto Apo J-15 y/o todas las del conjunto Apo J-29.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas que se detectan en el paso (b) son las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pl 4,9 aproximadamente en una electroforesis bidimensional.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas que se detectan en el paso (b) son las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pl 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pl 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional.

En otra realización más preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas que se detectan en el paso (b) son las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pl 4,9 aproximadamente, de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pl 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pl 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de al menos una de las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15 detectada en el paso (b) menor que la cantidad de referencia del paso (c), es indicativa de daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio. En una realización preferida de este aspecto de la invención las isoformas del paso (b) son todas las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pl

## ES 2 364 169 A1

4,9 aproximadamente en una electroforesis bidimensional, detectada en el paso (b) menor que la cantidad de referencia del paso (c), es indicativa de daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de al menos una de las formas glicosiladas del conjunto Apo J-29 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia del paso (c) es indicativa de daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio. En una realización preferida de este aspecto de la invención las isoformas del paso (b) son todas las formas glicosiladas del conjunto Apo J-29.

15 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pl 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pl 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional, detectadas en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia del paso (c) es indicativa de daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de al menos de al menos las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15 detectada en el paso (b) menor que la cantidad de referencia del paso (c), y/o una cantidad de al menos de todas las formas glicosiladas del conjunto Apo J-29 detectada en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia del paso (c) son indicativas de daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio. En una realización preferida de este aspecto de la invención, las formas glicosiladas detectadas en el paso (b) son todas las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15 y/o todas las formas glicosiladas del conjunto Apo J-29.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de diagnóstico que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, que además comprende un paso (d) donde una cantidad de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente y/o de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pl 4,9 aproximadamente en una electroforesis bidimensional, detectadas en el paso (b) menor que la cantidad de referencia del paso (c), y una cantidad de las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pl 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pl 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pl 5 en una electroforesis bidimensional, detectadas en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia del paso (c) son indicativas de daño tisular, preferiblemente daño cardíaco, más preferiblemente producido por infarto agudo de miocardio.

40 Los pasos (b) y/o (c) de los métodos descritos anteriormente pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c). Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante estos métodos.

45 El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de discriminar entre muestras procedentes de pacientes que presentan un daño tisular y muestras procedentes de individuos sanos que no han sufrido este daño, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad de las formas glicosiladas de Apo J y en la comparación de dicha cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test 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, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente el daño en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

60 La expresión “detectar o detección de la cantidad” de una proteína, entendiendo por proteína cada una de las diferentes formas glicosiladas de Apo J en la muestra obtenida, tal y como se utiliza en la presente descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración de la proteína, basada en una señal que se obtiene directamente de la proteína, y que está correlacionada directamente con el número de moléculas de la proteína, presente en la muestra. Dicha señal -a la que también podemos referirnos como señal de intensidad- puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física de la proteína. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente

## ES 2 364 169 A1

secundario (por ejemplo, un componente distinto de la proteína) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

5 El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa de la proteína, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con las mismas o que pueda derivarse de éstas. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de la proteína mediante medida directa, como por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear. Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en  
10 otra parte del presente documento.

El término “comparación” o “comparar”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad de las formas glicosiladas de Apo J de la muestra biológica a analizar, también llamada muestra biológica problema, con una cantidad de las formas glicosiladas de Apo J de una muestra de referencia deseable descrita en otra parte de la presente descripción. La muestra de referencia puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema.  
15

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad de la cantidad absoluta o relativa de las formas glicosiladas de la proteína Apo J que permite discriminar un daño tisular de una situación no patológica. Las cantidades de referencia adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. La muestra de referencia puede ser, por ejemplo, un extracto de proteínas obtenido a partir de una muestra biológica aislada de un individuo sano, o una mezcla de extractos de proteínas obtenidos a partir de muestras biológicas aisladas de uno o varios diversos individuos sanos. La cantidad de referencia se obtiene a partir de una muestra de referencia proveniente de un individuo sano, es decir, que no presente daño tisular. La cantidad de referencia se puede obtener también a partir de una muestra de referencia proveniente del mismo individuo que sufre el daño, pero previamente a sufrir el daño.  
20  
25

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente la muestra biológica aislada comprende: tejido cardíaco, sangre, suero, plasma u orina.  
30

Los términos “sujeto” o “individuo”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos.  
35

Los términos “sujeto sano” o “individuo sano” en la presente invención se refieren a aquel individuo que no tenga alterados los parámetros bioquímicos estándares para medir daño cardíaco [troponina, creatina kinasa (CK), creatina kinasa MB (CK-MB) y péptido natriurético tipo B (BNP)] ni signos de patología al realizar pruebas diagnósticas para medir daño cardíaco (ECG y resonancia magnética cardiovascular).  
40

En una realización preferida, la detección de la variación en la cantidad de las formas glicosiladas de Apo J se realiza mediante una electroforesis bidimensional (2-DE).

45 La electroforesis bidimensional es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. La separación de las proteínas se da en función a dos características: en primer lugar, se separan las proteínas según su punto isoeléctrico (pI) mediante isoelectroenfoque (IEF) y, en segundo lugar, la separación se realiza según su masa molecular, mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE). Existen numerosas variaciones de esta técnica en función de la técnica de detección de los productos finales tras la separación. Las diferentes muestras se pueden cargar en geles diferentes tras lo que se lleva a cabo la 2-DE manteniendo las mismas condiciones en todos los geles. Posteriormente estos geles se tiñen con una tinción específica de proteínas, como por ejemplo, aunque sin limitarse azul de Coomassie o tinción de plata, y se comparan los *spot* correspondientes a la proteína de interés entre los diferentes geles. Otra forma de detección y comparación de la cantidad de proteínas es mediante la técnica DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*) la cual se basa en el mareaje de las proteínas de las muestras de estudio con uno de los tres fluorocromos (Cy2, Cy3 o Cy5) antes de la separación. A continuación se mezclan las muestras y se separan en un único gel bidimensional, minimizando la variabilidad experimental. Debido al mareaje específico de cada muestra pueden observarse de manera individualizada y realizar un análisis comparativo de la expresión diferencial de proteínas, permitiendo la cuantificación precisa.  
50  
55  
60

En otra realización preferida la detección de la variación en la cantidad de las formas glicosiladas de Apo J se realiza mediante la incubación con un anticuerpo específico en un inmunoensayo.

65 El término “inmunoensayo”, tal y como se utiliza en la presente descripción se refiere a cualquier técnica analítica que se basa en la reacción de la conjugación de un anticuerpo con la muestra obtenida. Ejemplos de inmunoensayos conocidos en el estado de la técnica son, por ejemplo, pero sin limitarse: *immunoblot*, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), inmunohistoquímica o *chips* de proteína.

## ES 2 364 169 A1

En una realización más preferida, el inmunoensayo es un inmunoblot o Western *blot*. Para llevar a cabo un inmunoblot, se obtiene un extracto de proteínas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto y se separan las proteínas en un medio de soporte capaz de retenerlas mediante electroforesis. Una vez separadas las proteínas se transfieren a un soporte diferente donde pueden ser detectadas mediante el uso de anticuerpos específicos que reconocen las formas glicosiladas de la proteína Apo J. La electroforesis es una técnica analítica de separación de fundamento cinético basada en el movimiento o migración de las macromoléculas disueltas en un determinado medio (solución tampón de electroforesis), a través de una matriz o soporte reticulado como resultado de la acción de un campo eléctrico. El comportamiento de la molécula viene dado por su movilidad electroforética y ésta por la carga, tamaño y forma de la misma. Cuanto mayor es la relación carga/tamaño más rápido migra un ión en el seno del campo eléctrico. Existen numerosas variaciones de esta técnica en función del equipo utilizado, soporte y condiciones físico-químicas en las cuales se va a llevar a cabo la separación. Preferiblemente, para llevar a cabo la detección de la cantidad de las formas glicosiladas de la proteína Apo J mediante *inmunoblot*, las proteínas obtenidas a partir de una muestra biológica aislada de un sujeto se separan mediante la electroforesis bidimensional descrita anteriormente.

Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, y antes de la detección, las proteínas se transfieren a un soporte o a una membrana, por ejemplo, pero sin limitarse, PDVF, nitrocelulosa o acetato de celulosa. Esta membrana se hibrida con un anticuerpo específico (también llamado anticuerpo primario) que reconoce las formas glicosiladas de la proteína Apo J. A continuación, la membrana se hibrida con un anticuerpo (también llamado anticuerpo secundario) capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce las formas glicosiladas de la proteína Apo J el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario. Una vez detectada la proteína, se puede determinar su tamaño molecular relativo, comparando su migración con la migración de una proteína control que se detecte de forma simultánea, preferiblemente en el mismo soporte, que tiene un tamaño conocido.

Por tanto, en una realización aun más preferida, la detección de la variación en la cantidad de las formas glicosiladas de Apo J se realiza mediante una electroforesis bidimensional seguida de un inmunoblot.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas o ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). El ELISA se basa en la premisa de que un inmunoreactivo (antígeno de la muestra biológica o anticuerpo) puede ser inmovilizado en un soporte sólido, poniendo luego ese sistema en contacto con una fase fluida que contiene el reactivo complementario que puede unirse a un compuesto marcador.

Existen diferentes tipos de ELISA. En el ELISA directo o ensayo ELISA simple de dos capas, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo que reconoce las formas glicosiladas de la proteína Apo, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA indirecto, el soporte sólido se recubre con la muestra biológica y se incuba con un anticuerpo primario, que reconoce las formas glicosiladas de la proteína Apo J y, a continuación, un anticuerpo secundario, que reconoce al anticuerpo primario, conjugado o unido a un compuesto marcador. En el ELISA *sándwich* o ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos, se recubre el pocillo con un primer anticuerpo que reconoce las formas glicosiladas de la proteína Apo J de manera que las formas glicosiladas de Apo J serán retenidas en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo, y después se le aplica un segundo anticuerpo que reconoce a las formas glicosiladas de la proteína Apo J, conjugado o unido a un compuesto marcador.

En otra realización preferida, el inmunoensayo es una inmunohistoquímica (IHQ). Las técnicas de inmunohistoquímica permiten la identificación, sobre muestras tisulares o citológicas de determinantes antigénicos característicos. El análisis mediante inmunohistoquímica se realiza sobre cortes de tejido, ya sea congelado o incluido en parafina, procedente de una muestra biológica aislada de un sujeto. Estos cortes se hibridan con un anticuerpo específico o anticuerpo primario que reconoce a las formas glicosiladas de la proteína Apo J. A continuación, la membrana se hibrida con un anticuerpo secundario capaz de reconocer de manera específica el anticuerpo primario y que se encuentra conjugado o unido con un compuesto marcador. En una realización alternativa, es el anticuerpo que reconoce a las formas glicosiladas de las proteínas Apo J el que está conjugado o unido a un compuesto marcador, y no es necesario el uso de un anticuerpo secundario.

El término “anticuerpo” tal como se emplea en esta memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de fijación de antígeno que se une específicamente (inmunorreacciona) con la formas glicosiladas de la proteína Apo J. Ejemplos de porciones de moléculas de inmunoglobulinas inmunológicamente activas, incluyen fragmentos F(ab) y F(ab')<sub>2</sub> que pueden ser generados tratando el anticuerpo con una enzima tal como la pepsina. Los anticuerpos pueden ser policlonales (incluyen típicamente anticuerpos distintos dirigidos contra determinantes o epítopos distintos) o monoclonales (dirigidos contra un único determinante en el antígeno). El anticuerpo monoclonal puede ser alterado bioquímicamente, por manipulación genética, o puede ser sintético, careciendo, posiblemente, el anticuerpo en su totalidad o en partes, de porciones que no son necesarias para el reconocimiento de las formas glicosiladas de Apo J y estando sustituidas por otras que comunican al anticuerpo propiedades ventajosas adicionales. El anticuerpo puede ser también recombinante, quimérico, humanizado, sintético o una combinación de cualquiera de los anteriores. Un “anticuerpo o polipéptido recombinante” (rAC) es un anticuerpo que ha sido producido en una célula hospedadora que ha sido transformada o transfectada con el ácido nucleico codificante del polipéptido, o produce el polipéptido como resultado de la recombinación homóloga. Anticuerpos que reconocen a las formas glicosiladas de Apo J conocidos en el estado de la técnica, como los que se describen, pero sin limitarse, en los ejemplos de la presente descripción.

Los anticuerpos empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales capaces de reconocer únicamente cada una de las formas glicosiladas de la proteína Apo J. Estos anticuerpos pueden ser empleados para llevar a cabo los métodos de la presente invención, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante inmunoblot, ELISA o inmunohistoquímica.

El término “compuesto marcador”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de dar lugar a una señal cromogénica, fluorogénica, radiactiva y/o quimioluminiscente que permita la detección y cuantificación de la cantidad la proteína Apo J o de sus formas truncadas. El compuesto marcador se selecciona de la lista que comprende radioisótopos, enzimas, fluoróforos o cualquier molécula susceptible de ser conjugada con otra molécula o detectada y/o cuantificada de forma directa. Este compuesto marcador puede unirse al anticuerpo directamente, o a través de otro compuesto. Algunos ejemplos de compuestos marcadores que se unen directamente son, pero sin limitarse, enzimas como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa, isótopos radiactivos como  $^{33}\text{P}$  o  $^{35}\text{S}$ , fluorocromos como fluoresceína o partículas metálicas, para su detección directa mediante colorimetría, auto-radiografía, fluorimetría, o metalografía respectivamente.

Otro aspecto de la presente invención es un kit o dispositivo que comprende los elementos necesarios para llevar a cabo los métodos de la presente invención. El kit de la presente invención comprende los elementos necesarios para:

- a) detectar la cantidad de al menos una forma glicosilada de Apo J en la muestra obtenida en (a) y
- b) comparar la cantidad detectada en el paso (a) con una cantidad de referencia.

Dicho kit puede contener todos aquellos reactivos necesarios para detectar la cantidad de las formas glicosiladas de la proteína Apo J por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento como por ejemplo, pero sin limitarse, anticuerpos específicos de las formas glicosiladas de la proteína Apo J, anticuerpos secundarios o controles positivos y/o negativos. El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, tampones, soluciones de extracción de proteínas, agentes para prevenir la contaminación, inhibidores de la degradación de las proteínas, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

En una realización preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas a detectar en el paso (a) se seleccionan del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29. En una realización más preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas a detectar en el paso (a) son todas las del conjunto Apo J-15 y/o todas las del conjunto Apo J-29.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas a detectar en el paso (a) son las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pI 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pI 4,9 aproximadamente en una electroforesis bidimensional.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas a detectar en el paso (a) son las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pI 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pI 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pI 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y punto isoeléctrico 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional.

En otra realización preferida de este aspecto de la invención las formas glicosiladas a detectar en el paso (a) son las formas glicosiladas de Apo J de peso molecular 43,2 kDa aproximadamente y pI 4,8 aproximadamente, de peso molecular 41,2 kDa aproximadamente y pI 4,9 aproximadamente, de peso molecular 44,8 kDa aproximadamente y pI 4,6 aproximadamente, de peso molecular 41 kDa aproximadamente y pI 4,8 aproximadamente, de peso molecular 44 kDa aproximadamente y pI 4,8 aproximadamente, y/o de peso molecular 42,2 kDa aproximadamente y pI 5 aproximadamente en una electroforesis bidimensional.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

Figura 1

*Gel de electroforesis bidimensional*

Imagen representativa de la electroforesis de dos dimensiones. (A) muestra de suero humano tras la extracción de las seis proteínas mayoritarias (albúmina, transferrina, haptoglobina, antitripsina, inmunoglobulina G e inmunoglobulina A) (B) HDL aisladas por ultracentrifugación. Los puntos marcados con un círculo corresponden a proteínas identificadas por MALDI-Tof en ambas muestras.

## ES 2 364 169 A1

### Figura 2

*Imágenes aumentadas de las zonas de Apo J en controles y pacientes de infarto agudo de miocardio*

5 Patrón representativo de Apo J en geles de electroforesis de dos dimensiones de muestras de suero de pacientes IAM (infarto agudo de miocardio) y controles. Apo J se detectó como una serie de 12-13 puntos con un rango de punto isoeléctrico entre 4,5 y 5 y una masa molecular entre 37,1 y 47,3 kDa. Los *spots* identificados como Apo J se numeraron desde el pH más ácido al más básico. El punto número 2 sólo se detectó en los pacientes IAM. Los puntos 1, 3, 7, 8, 10, 11 y 13 mostraron un incremento en los niveles de detección en los pacientes IAM mientras que los puntos 6 y 9 mostraron una intensidad reducida en IAM al compararlos con el grupo control. Los *spots* 6 y 9 corresponden a Apo J-15, y los *spots* 3, 7, 8 y 11 corresponden a Apo J-29.

### Figura 3

#### 15 *Niveles de Apo J*

Niveles séricos de Apo J ( $\mu\text{g/ml}$ ) en pacientes IAM e individuos sanos. Los niveles de Apo J se cuantificaron mediante un ELISA comercial. (A) Diagrama de barras (media  $\pm$  ES) del grupo control y los pacientes IAM en el momento del ingreso (control: n=51; IAM: n=39; \*  $p < 0,004$ ; Test de Mann Whitney). (B) Gráfica del seguimiento de los niveles séricos de Apo J en los pacientes IAM desde el momento del ingreso (tiempo 0) hasta las 96 horas. Los valores de cada momento están expresados como media  $\pm$  ES (§  $p < 0,0001$  vs. control; \*  $p < 0,02$  vs. time 0; ANOVA y Fisher PSLD como test *Post hoc*).

### Figura 4

#### 25 *Western blot de Apo J*

*Western blot* representativo de Apo J en controles y pacientes IAM en suero total después de eliminar las seis proteínas más abundantes (A) y en la fracción de proteínas glicosiladas del suero (B). Se detectaron dos bandas mayoritarias que correspondían al heterodímero de Apo J (65-70 kDa) y a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (40-45 kDa). La banda de mayor intensidad en la fracción total de suero, tanto en pacientes IAM como en controles, era la de menor peso molecular, mientras que la mayor parte de Apo J glicosilada estaba representada por la banda de 65-70 kDa. Las diferencias en la intensidad de las bandas en la fracción glicosilada eran más evidentes en el grupo control.

### 35 Figura 5

*Imagen de un gel de un western-blot en dos dimensiones*

Imagen representativa de Apo J en un gel 2-DE en la fracción glicosilada del suero de individuos sanos (A) y pacientes IAM (B). Se detectaron 6 puntos (1, 2, 4, 5, 8 y 11) que correspondían en punto isoeléctrico y masa molecular con los detectados en el suero total. Igual que en la figura 2, los *spots* se numeraron desde el pH más ácido al más básico. La intensidad de los *spots* de Apo J era inferior en los pacientes IAM que en los controles. La disminución resulta más evidente en los puntos 4 y 8.

### 45 Figura 6

*Cuantificación de Apo J*

Apo J en la fracción de micropartículas y exosomas derivadas del suero (MP-EX) y la fracción del suero libre de MP-EX (fracción soluble) de los pacientes IAM y los individuos control. (A) El análisis mediante western blot reveló la presencia de dos bandas que se corresponden con el heterodímero glicosilado de Apo J (65-70 kDa) y las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  no glicosiladas (40-45 kDa). (B) Diagrama de barras (media  $\pm$  ES) de los volúmenes relativos de las bandas (calculado como el porcentaje de la intensidad total de las bandas). El porcentaje de la intensidad de las bandas en la fracción soluble variaba significativamente entre los grupos IAM y control ( $p = 0,02$ ). Los resultados se basan en la media  $\pm$  ES de tres ensayos independientes hechos en una mezcla de extractos de varios pacientes IAM y una mezcla de extractos de varios controles.

### Figura 7

#### 60 *Inmunohistoquímica*

Imágenes representativas de la localización de Apo J en tejidos miocárdicos isquémicos y sanos. Apo J se localiza alrededor de los capilares en los miocardios isquémicos. Se detectan señales marrones intensas alrededor de los capilares en secciones miocárdicas de un corazón isquémico, mientras que no se detectan señales en los capilares de un tejido miocárdico no isquémico.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

## Ejemplo 1

*Perfil proteómico de proteínas asociadas a las HDL en muestras de suero*

Las muestras de suero (tras la extracción de las seis proteínas más abundantes) de 27 pacientes con IAM y de donantes sanos se analizaron individualmente por duplicado mediante electroforesis de dos dimensiones (2-DE) y las proteínas se identificaron mediante espectrometría de masas tipo MALDI-ToF. En las muestras de suero humano tanto del grupo control como de los pacientes se identificaron proteínas asociadas a las HDL, incluyendo Apo J, PON1 y Apo A-I (Figuras 1A y 1B; Tabla 1).

TABLA 1

*Proteínas identificadas en muestras de suero y de HDL mediante 2DE y MALDI-ToF*

Proteína	Nº Swissprot	MW (kDa)	pI	Suero	HDL
Albúmina	P02768	69	5.8 – 6.3	Eliminada	11 spots
Alpha 1 antitripsina	P01009	60 – 67	4.9 – 5.2	Eliminada	4 spots
Apo A-I	P02647	25	5 – 5.8	5 spots	5 spots
		75	5 – 5.6	ND	5 spots
Apo A-IV	P06727	55	5 – 5.4	1 spot	4 spots
		24	5.6	ND	1 spot
Apo E	P02649	36 – 37	5.8	3 spots	2 spots
Apo J	P10909	37.1 – 47.3	4.5 – 5	12 – 13 spots	7 spots
Apo M	O95445	23	5.7	1 spot	1 spot
C3 complemento	P01024	52	4.8	1 spot	1 spot
PON 1	P27169	58	4.8 – 5.1	1 spot	3 spots

Apo A-I = Apolipoproteína A-I; Apo A-IV = Apolipoproteína A-IV; Apo E= Apolipoproteína E; Apo J= Apolipoproteína J; Apo M= Apolipoproteína M; ND = No detectable; PON1 = Paraoxonasa 1.

Las proteínas se detectaron mayoritariamente como una serie de *spots* (Figura 1B). En ambas fracciones, tanto las HDL como el suero, Apo A-I se detectó como la proteína mayoritaria que consistía en una serie de diferentes *spots* con una masa aparente de aproximadamente 25 kDa y un punto isoeléctrico (pI) entre 5,0 y 5,8.

## Ejemplo 2

*Patrón proteómico diferencial de Apo J entre pacientes IAM e individuos control*

Apo J se identificó en el suero mediante 2-DE y espectrometría de masas MALDI-ToF como una serie de 12-13 *spots* diferentes con una masa molecular aparente de entre 37,1 y 47,3 kDa y en un rango de pI entre 4,5 y 5,0 (Figura 2). El volumen relativo de la mayoría de los *spots* variaba de forma significativa entre los pacientes IAM (muestras obtenidas en el momento del ingreso) y los controles (Tabla 2).

## ES 2 364 169 A1

TABLA 2

*Perfil proteómico de Apolipoproteína J en el suero de pacientes IAM e individuos controles obtenido mediante análisis por 2-DE de muestras de suero después de eliminar las seis proteínas mayoritarias*

5

	Nº Spot	pI	MW (kDa)	Control	IAM	valor p *
10	1	4.6	47.3	446.3 [339.4-969.8]	820.7 [455.2-1098.9]	0.007
	2	4.5	44.4	—	485.9 [428-545.7]	NS
	3	4.6	44.8	684.7 [525.2-1489.8]	1217.5 [591.7-1797.8]	0.01
15	4	4.7	45.1	1990 [1923.3-2203.4]	1982.9 [1566.2-3011.5]	NS
	5	4.7	43.5	115.5 [115.5-115.5]	459.6 [459.6-459.6]	NS
20	6	4.8	43.2	3113.1 [2138.3-4087.8]	1583.3 [768.7-2450.1]	0.009
	7	4.8	41	447.3 [423.2-471.5]	971.5 [717.4-1586.9]	0.001
	8	4.8	44	1929.4 [1576.7-4067.4]	3350.5 [2195.2-4014.0]	<0.001
25	9	4.9	41.2	2602.7 [1377.8-2915.3]	1282.2 [934.5-2025.7]	<0.001
	10	4.9	39	262.3 [258.1-266.6]	739.2 [434.3-1018]	0.001
30	11	5	42.2	1287.3 [1108.4-2364.9]	2650.7 [2287.7-3130.5]	<0.001
	12	5	41	1494.3 [1328.9-1659.8]	1446.6 [1172.4-1595.2]	NS
35	13	5	37.1	117.4 [94-140.7]	361 [279-499.7]	<0.001

\* Pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM) vs. Controles: Mann Whitney.

NS = No significativo.

40

Se detectó un cambio hacia las formas con mayor movilidad electroforética en el grupo IAM (ver tabla 2). Al comparar los pacientes IAM con los controles se vio que el volumen relativo de los *spots* números 6 y 9 (PM 43,2-41,2 kDa) disminuía más del doble ( $p \leq 0,001$ ), mientras que los *spots* 7, 10 y 13 (PM 41,0-37,1 kDa) presentaban un incremento de más del doble ( $p \leq 0,001$ ).

45

### Ejemplo 3

#### 50 Niveles séricos de Apo J en pacientes IAM e individuos sanos

Los niveles séricos de Apo J se midieron mediante ELISA en 39 pacientes IAM en el momento del ingreso (dentro de las 6 primeras horas desde el inicio del evento). Al compararlos con el grupo control, los niveles de Apo J eran significativamente más bajos en los pacientes (Media  $\pm$  ES; IAM:  $37,3 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$  vs. Controles:  $45,9 \pm 1,2 \mu\text{g/ml}$ ;  $p=0,004$ ). Las diferencias en Apo J también se observaron al ajustar por los efectos de otras variables como los niveles de colesterol total, LDL y HDL ( $p=0,009$ ). En 35 pacientes se hizo un seguimiento de los niveles séricos de Apo J a diferentes tiempos hasta las 96 horas desde el momento del ingreso. En el 60% de estos pacientes los niveles más bajos de Apo J se detectaron en el momento del ingreso ( $34,6 \pm 3,04 \mu\text{g/ml}$ ). A las 8 y 24 horas después del ingreso los niveles de Apo J aumentaron significativamente (8 h:  $42,9 \pm 2,5 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,01$ ; 24 h:  $41,9 \pm 1,7 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,02$ ) hasta que alcanzaron los niveles de los controles a las 72-96 horas tras el ingreso (72 h:  $43,3 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,02$ ; 96 h:  $49,4 \pm 4,3 \mu\text{g/ml}$ ,  $p=0,001$ ).

60

En el grupo de estudio (individuos sanos y pacientes IAM) los niveles séricos de Apo J no variaban significativamente en relación a la edad ni al sexo y no se correlacionaban con los niveles de colesterol total, LDL y HDL (Tabla 3).

65

## ES 2 364 169 A1

TABLA 3

*Correlaciones de la Apolipoproteína J con la edad y parámetros lipídicos del suero en las poblaciones IAM y control*

	Población total		Población control		Población IAM	
	valor r	valor p	valor r	valor p	valor r	valor p
Edad	- 0.003	NS	0.046	NS	0.318	NS
Total-c	0.164	NS	0.274	0.05	0.161	NS
LDL-c	0.178	NS	0.160	NS	0.157	NS
HDL-c	0.082	NS	0.226	NS	0.028	NS
Necrosis *	-	-	-	-	-0.134	NS
TnTmax †	-	-	-	-	-0.029	NS
PCR t = 0 ‡	-	-	-	-	0.444	0.01
PCR max. §	-	-	-	-	-0.086	NS

Necrosis (%): Porcentaje de masa necrótica del miocardio (calculado como el porcentaje de la masa total del corazón medida por resonancia magnética cardiovascular). † TnTmax: Valor máximo de los niveles de troponina T desde el momento del ingreso. ‡ PCR t = 0: Niveles de proteína C reactiva en el momento del ingreso. § PCR max.: Valor máximo de los niveles de proteína C reactiva desde el momento del ingreso.

A pesar de ello, se vio una correlación baja pero positiva entre los niveles de colesterol total y los niveles de Apo J en la población control ( $r=0,274$ ,  $p=0,05$ ).

En el grupo IAM, no se vio correlación entre los niveles séricos de Apo J en el momento del ingreso y el pico de troponina T (definido como el valor máximo de troponina T desde el momento del ingreso), ni tampoco con el porcentaje de masa necrótica del miocardio (calculado como un porcentaje de la masa cardíaca total medida por resonancia magnética cardiovascular).

Los niveles de Apo J mostraron una correlación positiva con los niveles de Proteína c reactiva (PCR) en el momento del ingreso ( $r=0,444$ ,  $p=0,01$ ) pero no se obtuvo correlación si los niveles de Apo J se analizaban en relación al pico de PCR (definido como el valor máximo de PCR desde el momento del ingreso;  $r=-0,086$ ,  $p=NS$ ). El pico de PCR se correlacionaba positivamente con los niveles de troponina T y con el porcentaje de masa necrótica del miocardio ( $r=0,383$ ,  $p=0,04$ ;  $r=0,454$ ,  $p=0,01$ , respectivamente). Los niveles de PCR en el momento del ingreso eran significativamente más altos en los pacientes con diabetes ( $14,4 \pm 4,4$  mg/L,  $p=0,006$ ) e hipertensión ( $10,8 \pm 2,6$  mg/L;  $p=0,01$ ) que los niveles medios de toda la población IAM ( $7,5 \pm 1,6$  mg/L).

### Ejemplo 4

#### *Inmunodetección de Apo J total y glicosilada*

Tal y como se muestra en la figura 4A, el análisis mediante *western blot* de Apo J sérica reveló una banda de aproximadamente 40-45 kDa, que representa el 65% del total de Apo J detectada, y una segunda banda con una masa aparente de 65-70 kDa, que coincide con la masa molecular del heterodímero glicosilado de Apo J. En el análisis mediante *western blot* de la fracción glicosilada de Apo J sérica también se observaron dos bandas con una movilidad electroforética similar a la observada en Apo J sérica total aunque con predominio de la banda de mayor peso molecular que representa el 83% de Apo J detectada (Figuras 4A y 4B).

## Ejemplo 5

*Patrón proteómico de la fracción glicosilada de Apo J sérica*

5 El patrón proteómico de la fracción glicosilada de Apo J sérica se estudió tras la purificación de las proteínas glicosiladas a través de su unión a lectinas. El subproteoma de las glicoproteínas del suero del grupo de los pacientes IAM y del grupo control (pools de 10 individuos) se analizó mediante 2-DE (Figura 5). Los pacientes con diabetes fueron excluidos de este análisis. Mediante MALDI-ToF se identificaron como Apo J, tanto en el grupo control como en los pacientes, 6 *spots* con una masa molecular entre 40 y 45 kDa y un rango de pI entre 4,5 y 5,0. Estos *spots* son los numerados como 1, 2, 4, 5, 8 y 11 en el análisis mediante 2-DE de la fracción total del suero (comparar Figura 5 con Figura 2A). Los pacientes IAM mostraron una disminución ( $p = 0,05$  Mann Whitney) en la intensidad de Apo J glicosilada al compararlos con la población control (IAM vs. control, media  $\pm$  ES:  $9072 \pm 166$  vs.  $12351 \pm 1717$ , los valores indican la intensidad total de las formas de Apo J normalizadas por la intensidad del volumen de todos los *spots* en el gel). Al comparar los *spots* de forma individual, encontramos una disminución significativa de los *spots* 4 y 8 (los *spots* mayoritarios) en los pacientes IAM comparados con los controles (media de la intensidad  $\pm$  ES:  $3379 \pm 142$  vs.  $2794 \pm 188$  y  $4246 \pm 793$  vs.  $2694 \pm 101$ , respectivamente; Mann-Whitney,  $p < 0,05$  para los dos *spots*).

## Ejemplo 6

*Análisis de Apo J en micropartículas-exosomas*

20 La fracción de micropartículas-exosomas del suero (MP-EX) y la fracción del suero libre de MPs-EX (fracción soluble) de individuos sanos ( $n=10$ ) y pacientes IAM ( $n=10$ ) se analizaron por ELISA y western blot. Los niveles de Apo J se cuantificaron mediante ELISA en la fracción soluble y en una fracción diez veces concentrada de MP-EX. En la fracción soluble se detectó una concentración de Apo J de  $56,5 \pm 1,4 \mu\text{g/ml}$  mientras que los niveles de Apo J en la fracción MP-EX estaban por debajo del límite de detección del método ( $0,005 \mu\text{g/ml}$ ). El análisis mediante western blot de la fracción soluble y la fracción MP-EX (10 veces concentrada) en el grupo control y los pacientes IAM (Figura 6A) mostró las dos mismas bandas que aparecían en el análisis de Apo J total y glicosilada (comparar Figura 6A con Figuras 4A y B). En la fracción soluble se detectó una diferencia significativa en la distribución de las bandas entre los pacientes IAM y los controles ( $p=0,02$ ), en los pacientes IAM Apo J estaba igualmente representada por ambas bandas, mientras que en los controles la banda de mayor peso molecular representaba el 63% de Apo J total detectada. En la fracción MP-EX la banda más representativa era la de menor peso molecular (92%) y no se detectaron diferencias significativas entre los pacientes IAM y los controles (Figura 6B).

## Ejemplo 7

*Inmunohistoquímica*

40 Apo J se detectó en el miocardio de los pacientes IAM pero no en el tejido sano (Figura 7). La señal de Apo J se detectó mayoritariamente en los microvasos, pero también se vieron trazas en el resto del tejido miocárdico.

*Materiales y Métodos**Población de estudio*

50 Los pacientes con un diagnóstico de infarto agudo de miocardio de nueva presentación fueron ingresaron en urgencias del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los criterios de inclusión en el estudio fueron la presencia de dolor precordial (dolor en el lado izquierdo del pecho a la altura del corazón) de más de treinta minutos e ingreso en el centro clínico dentro de las seis primeras horas desde el inicio del evento. Se excluyeron los pacientes con un infarto de miocardio previo. Finalmente, 39 pacientes se incluyeron en el estudio (29 hombres y 10 mujeres) con una edad media de 63 años  $\pm$  14. Los pacientes presentaron una elevación del segmento ST del electrocardiograma ( $> 0,2$  mV) en al menos dos derivaciones contiguas niveles de creatina kinasa (CK) y creatina kinasa MB normales en el momento del ingreso, seguidos posteriormente de una duplicación de los mismos. En el momento del ingreso no se detectaron niveles de troponina-T (indicando ausencia de un infarto previo). Treinta y tres pacientes presentaban al menos un factor de riesgo cardiovascular (hipertensión, dislipemia, diabetes o tabaquismo). Los pacientes analizados presentaban diferentes características clínicas así como diversos factores de riesgo y tratamiento (tabla 4).

65

## ES 2 364 169 A1

TABLA 4

*Detalles clínicos y parámetros lipídicos de los individuos del estudio*

	<b>Pacientes IAM</b> (n = 39)	<b>Donadores sanos</b> (n = 51)
Edad (media ± desvest)	63 ± 14	45 ± 10.8
Mujeres / Hombres	10 / 29	17 / 34
Colesterol total (mg/dL)	201.7 ± 47.3	200.3 ± 42.1
Colesterol HDL (mg/dL)	44.2 ± 11.8	43 ± 13.5
Colesterol LDL (mg/dL)	127.8 ± 40.1	139.5 ± 38.7
Factores de riesgo, n (%)		
Fumadores	51	-
Hipertensión	42	-
Dislipemia	49	-
Diabetes Mellitus	27	-
Medicación, n (%)		
ASA	9.8	-
IECA	17.1	-
Estatinas	17.1	-
ARA2	4.9	-
β-bloqueantes	7.3	-
ACA	9.8	-
NIT	2.4	-
ADO	17.1	-
Niveles PCR (mg/L) *	7.6 ± 9.9	-
TnTmax (μg/L) †	7.3 ± 5.9	-
Necrosis % ‡	13.5 ± 9.8	-

\* Niveles PCR: Niveles de proteína C reactiva en el momento del ingreso. † TnTmax: Valor máximo de los niveles de troponina T desde el momento del ingreso. ‡ Necrosis (%):

Porcentaje de masa necrótica del miocardio (calculado como el porcentaje de la masa total del corazón medida por resonancia magnética cardiovascular).

ASA = Ácido acetilsalicílico; IECA = Inhibidores enzima conversión angiotensina; ARA2 = Antagonistas receptores angiotensina II; ACA = Antagonistas Calcio; NIT = Nitroglicerina; ADO = antidiabéticos orales.

El grupo control constaba de cincuenta y un individuos (34 hombres y 17 mujeres) con una edad media de 45 años ± 11, que se presentaron a una revisión médica rutinaria.

El comité ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau aprobó el proyecto y los estudios se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito para formar parte del estudio.

*Estudio del infarto mediante resonancia magnética*

Los estudios de resonancia magnética cardíaca de contraste se realizaron en la fase crónica tras IAM en todos aquellos pacientes que presentaron IAM con elevación del segmento ST mediante un escáner Philips Intera 1.5 Teslas (Philips Medical Systems, Best, Países Bajos). Tras obtener los planos de reconocimiento, se adquirieron en modo cine y estado estacionario de alta precisión los ejes largos mediante la realización de múltiples cortes longitudinales (eje corto) a razón de un espesor de corte de 10 mm. Estos cortes se realizaron desde el anillo atrio-ventricular hasta el ápex del ventrículo izquierdo. Se adquirieron un total de dieciséis fases de ciclo cardíaco para cada corte. Posteriormente se administró Gadobutrol (Gadovista, Schering, Berlín, Alemania) de manera intravenosa a razón de 0,1 mmol/kg. Diez minutos después de la administración del contraste se adquirieron las secuencias de inversión-recuperación con eco de gradiente en los mismos planos que las secuencias de modo cine a fin de evaluar el realce tardío. El tiempo de inversión se ajustó individualmente para suprimir el miocardio sano (200 a 300 ms). Se realizó una valoración de la motilidad segmentaria del ventrículo izquierdo según las Sociedades Norteamericanas de Imagen, las cuales dividen el ventrículo izquierdo en dos zonas (anteroseptal e inferolateral), 4 paredes (anterior, septal, inferior y lateral) y 17 segmentos. Finalmente se analizaron a doble ciego las secuencias de realce tardío de contraste por tres intérpretes expertos y se evaluó cada segmento.

*Recogida de sangre y preparación de muestra*

*Obtención de muestras de sangre:* Las muestras de sangre venosa de los pacientes IAM fueron recogidas antes del inicio de la medicación. Se obtuvo el suero, se alicuotó y se guardó a -80°C.

*Preparación de HDL:* Las HDL humanas se obtuvieron a partir de suero normocolesterolémico mediante ultracentrifugación diferencial. Se determinaron las concentraciones de lipoproteínas y de colesterol de las HDL. La fracción proteica se obtuvo mediante la precipitación de 2 mg de HDL con acetona pura a -20°C durante dos horas.

*Preparación del suero:* Para los estudios proteómicos, las muestras de suero se sonicaron (seis ciclos de 15 segundos cada uno) en hielo y se filtraron (0,22 µm) mediante centrifugación para evitar la presencia de impurezas. Las seis proteínas más abundantes del suero se eliminaron utilizando una columna de afinidad específica con capacidad de unirse a la albúmina, inmunoglobulina G, inmunoglobulina A, transferrina,  $\alpha$ 1-antitripsina y haptoglobina (*Multiple Affinity Removal Spin Cartridge*, Agilent Technologies). La fracción de suero sin las seis proteínas mayoritarias (denominada fracción de suero total) se concentró y se centrifugó con filtros de 5 kDa para la eliminación de sales y el cambio a un tampón urea (8M Urea, 2% CHAPS (3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato)). La fracción de proteínas glicosiladas del suero se purificó mediante el uso de un kit comercial (Qproteome Total Glycoprotein Kit, QIAGEN). La concentración de proteína presente en los extractos se cuantificó con el 2D-Quant Kit (GE Healthcare). Todas las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso.

*Aislamiento de Micropartículas y Exosomas (MP-EX):* El suero se centrifugó a 100.000 g durante 45 minutos a 20°C (OPTIMAX Ultracentrifuge, Beckman Coulter) para la obtención de la fracción MP-EX. Después de dos lavados, los pellets de MP-EX se resuspendieron en un tampón de urea/tiourea (7 mol/L urea, 2 mol/L tiourea, 2% w/v CHAPS). Las MP-EX del suero se concentraron y se centrifugaron con filtros de 5 kDa para la eliminación de sales y el cambio a un tampón urea (8M Urea, 2% CHAPS). Las fracciones de MP-EX derivadas del suero y el suero libre de MP-EX se alicuotaron y se guardaron a -80°C.

*Análisis proteómico*

*Electroforesis bidimensional (2-DE):* 120 µg (en los geles analíticos), o 300 µg (en los preparativos) de proteína del extracto soluble en Urea/CHAPS fueron cargados en tiras de isoelectroenfoque de 18 cm y un rango de pH lineal de 4 a 7 (GE Healthcare). Las proteínas en los geles se visualizaron mediante tinción fluorescente (geles analíticos) o con azul Coomassie (geles preparativos). Para cada experimento independiente, la 2-DE de los extractos proteicos de controles y pacientes se procesaron en paralelo para garantizar que fuesen comparables. Cada tanda de 2-DE se repitió al menos dos veces. El análisis de las diferencias entre los patrones proteicos de las muestras controles y las de infarto se llevó a cabo con el programa PD-Quest (BioRad) utilizando un solo master que incluía todos los geles de cada experimento independiente. A cada *spot* proteico, tras la extracción de la señal de fondo y la normalización entre geles, se le asignó un valor relativo que correspondía al valor de cada *spot* individual comparado al volumen de todos los *spots* presentes en el gel.

*Análisis mediante espectrometría de masas:* Los *spots* proteicos de interés se recortaron de los geles, se lavaron, deshidrataron, secaron y se digirieron enzimáticamente con tripsina porcina (Promega). Los péptidos resultantes de la digestión con tripsina se mezclaron en una proporción 1:1 con 5 mg/ml de  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi-cinámico y fueron cargados en una tira de acero inoxidable para espectrometría de masas. La identificación de las proteínas se llevó a cabo mediante su huella peptídica utilizando un Ettan MALDI-ToF Pro (*matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometer*, GE-Healthcare) trabajando en el modo reflector. Los espectros generados por el MALDI se calibraron internamente utilizando los picos de los productos de autólisis de la tripsina, Ang III (angiotensina III) y ACTH (hormona adrenocorticotrópica). Las masas peptídicas se buscaron a través de la base de datos de mamífero no redundante del *National Center for Biotechnology Information* utilizando ProFound™ y se confirmaron utilizando una

## ES 2 364 169 A1

búsqueda en Mascot de Matrixscience seleccionando la base de datos SwissProt. Para este estudio, la identificación de proteínas se basó en la medición de al menos 10 péptidos con un mínimo de un 50% de coincidencia y una cobertura de más de un 35%. La expectación mínima para una identificación válida fue de 0,0001 y  $p < 0,05$ .

5

### *Cuantificación de los niveles séricos de Apo J*

La concentración sérica de Apo J se determinó mediante un ELISA comercial tipo *sándwich* basado en dos anticuerpos monoclonales (Clusterin ELISA, Biovendor) siguiendo las indicaciones de los proveedores. El límite de detección del ensayo era de 0,5 ng/ml.

10

### *Inmunoprecipitación de proteína*

Apo J se inmunoprecipitó añadiendo 2  $\mu\text{g}$  de un anticuerpo monoclonal específico (Apolipoprotein J, clone CLI-9, Abcam) a muestras previamente pre-lavadas usando 50% Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, 1 hora a 4°C). Los complejos antígeno-anticuerpo se precipitaron con 50% Protein G Sepharose 4 Fast Flow. Los complejos inmunoprecipitados se separaron de la proteína G calentando la muestra durante 5 minutos en condiciones reductoras (Tris-HCl 2,5 M pH 6,8, 100% Glicerol, 20% SDS, azul de bromofenol).

20

### *Análisis por Western Blot*

Las muestras se resolvieron mediante electroforesis y fueron electro-transferidas a membranas de PVDF (Polyvinylidene Difluoride) en condiciones semi-secas (Semi-dry transfer system, BioRad). La detección se llevó a cabo con anticuerpos monoclonales contra Apo J (clone CLI-9, dilución 1:2000, Abcam). El anticuerpo anti-ratón estaba marcado con el fluorocromo Cy3 (1:20000 dilution, GE Healthcare). La fluorescencia de las bandas se determinó con un Typhoon 9400 (GE Healthcare) y la cuantificación se llevó a cabo utilizando el programa ImageQuant TL (GE Healthcare).

30

### *Inmunohistoquímica*

Los miocardios humanos se obtuvieron a partir de corazones extraídos durante transplantes realizados en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España). Las muestras de tejido se sumergieron en solución de fijación (4% paraformaldehído) y después de embeberse en parafina se cortaron en secciones seriadas de 5 mm de grosor y se colocaron en soportes recubiertos con poli-L-lisina. Se utilizó un anticuerpo primario policlonal de conejo contra la Apolipoproteína J a una dilución 1:50 (Abcam ab69644). Antes de la incubación con el anticuerpo primario (2 horas), las secciones se lavaron, eliminando la actividad de la peroxidasa endógena con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y se utilizó suero de cabra para bloquear uniones inespecíficas. Los anticuerpos primarios se detectaron usando la técnica de la avidina-biotina inmunoperoxidasa. Las secciones se incubaron posteriormente con un anticuerpo secundario biotinilado (1:200, Vector®). El cromógeno usado fue la 3,3'-diaminobenzidina. La hematoxilina se utilizó para la tinción de los núcleos.

40

### *Análisis bioquímico*

Los niveles de proteína C reactiva (PCR) se midieron con un kit comercial (Roche) con un intervalo de detección entre 0,1 y 20 mg/L. Cuando los niveles de PCR estaban por encima del límite de detección las muestras se diluían. Los lípidos se midieron por métodos enzimáticos convencionales dentro de las primeras 8 horas desde el inicio del evento. Las mediciones hechas en este periodo de tiempo se consideran el nivel basal. Los niveles totales de colesterol se analizaron mediante el método CHOD-PAP (Boehringer-Mannheim, Germany) y los triglicéridos por TOD-PAP (Boehringer-Mannheim, Germany). Los niveles de colesterol HDL se midieron después de la precipitación manual de las lipoproteínas con el método PEG 6000 (Boehringer-Mannheim, Germany). Cuando los niveles de triglicéridos superaban los 3,36 mmol/L, los niveles de colesterol LDL se determinaron mediante centrifugación y cuando estaban por debajo de 3,36 mmol/L, los niveles de colesterol LDL se estimaban usando la fórmula de Friedewald. Los niveles de troponina T se midieron con un kit comercial de Roche Diagnostics IV generación y se analizaron con el Roche Diagnostics Elecsys 2010.

55

### *Análisis estadístico*

Los datos están expresados como media y error estándar (ES) a menos que se indique lo contrario. N indica el número de individuos analizados. Los análisis estadísticos realizados para la búsqueda de las diferencias entre los grupos control e infarto se realizaron mediante ANOVA de un solo factor o incluyendo covariantes y el test t de Student o el no paramétrico Mann-Whitney, según esté indicado. Las correlaciones entre variables se determinaron mediante modelos de regresión simple o múltiple. Se consideró significativo  $p \leq 0,05$ .

65

# ES 2 364 169 A1

## REIVINDICACIONES

1. Uso de al menos una forma glicosilada de Apo J como marcador de un daño tisular.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1 donde las formas glicosiladas de Apo J se seleccionan del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29.
- 10 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 donde las formas glicosiladas son todas las del conjunto Apo J-15 y/o todas las del conjunto Apo J-29.
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el daño tisular es un daño cardíaco.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el daño es producido por infarto agudo de miocardio.
- 15 6. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el daño tisular es un daño renal.
7. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, pronóstico o monitorización del tratamiento de un daño tisular que comprende los siguientes pasos:
  - 20 a) obtener una muestra biológica aislada de un individuo, y
  - b) detectar la cantidad de al menos una forma glicosilada de Apo J en la muestra obtenida en el paso (a).
- 25 8. Método según la reivindicación 7 que además comprende un paso:
  - c) comparar la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia obtenida de una muestra control.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 donde la forma glicosilada de Apo J que se detecta en el paso (a) se selecciona del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29.
- 35 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde en el paso (a) se detectan todas las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15 y/o todas las del conjunto Apo J-29.
- 40 11. Método de diagnóstico según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10 que además comprende un paso adicional (d) donde una cantidad de al menos una de las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15 detectadas en el paso (b) menor que la cantidad de referencia del paso (c) y/o donde una cantidad de al menos una de las formas glicosiladas del conjunto Apo J-29 detectadas en el paso (b) mayor que la cantidad de referencia del paso (c) son indicativas de un daño tisular.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 donde el daño tisular es un daño cardíaco.
- 45 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12 donde el daño es producido por infarto agudo de miocardio.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11 donde el daño tisular es un daño renal.
- 50 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14 donde la detección de la cantidad de la forma glicosilada de Apo J del paso (b) se lleva a cabo mediante electroforesis bidimensional.
16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15 donde la detección de la cantidad de la forma glicosilada de Apo J del paso (b) se lleva a cabo mediante un inmunoensayo.
- 55 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16 donde la muestra biológica aislada del paso (a) se selecciona de la lista que comprende tejido cardíaco, suero, sangre, plasma o tejido renal.
- 60 18. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17 que comprende los elementos necesarios para:
  - a) detectar la cantidad de al menos una forma glicosilada de Apo J en una muestra biológica aislada obtenida de un individuo, y
  - 65 b) comparar la cantidad detectada con una cantidad de referencia obtenida de una muestra control.

## ES 2 364 169 A1

19. Kit según la reivindicación anterior donde las formas glicosiladas a detectar se seleccionan del conjunto Apo J-15 y/o del conjunto Apo J-29.

5 20. Kit según la reivindicación anterior donde las formas glicosiladas a detectar son todas las del conjunto Apo J-15 y/o todas las del conjunto Apo J-29.

10

15

20

25

30

35

40

45

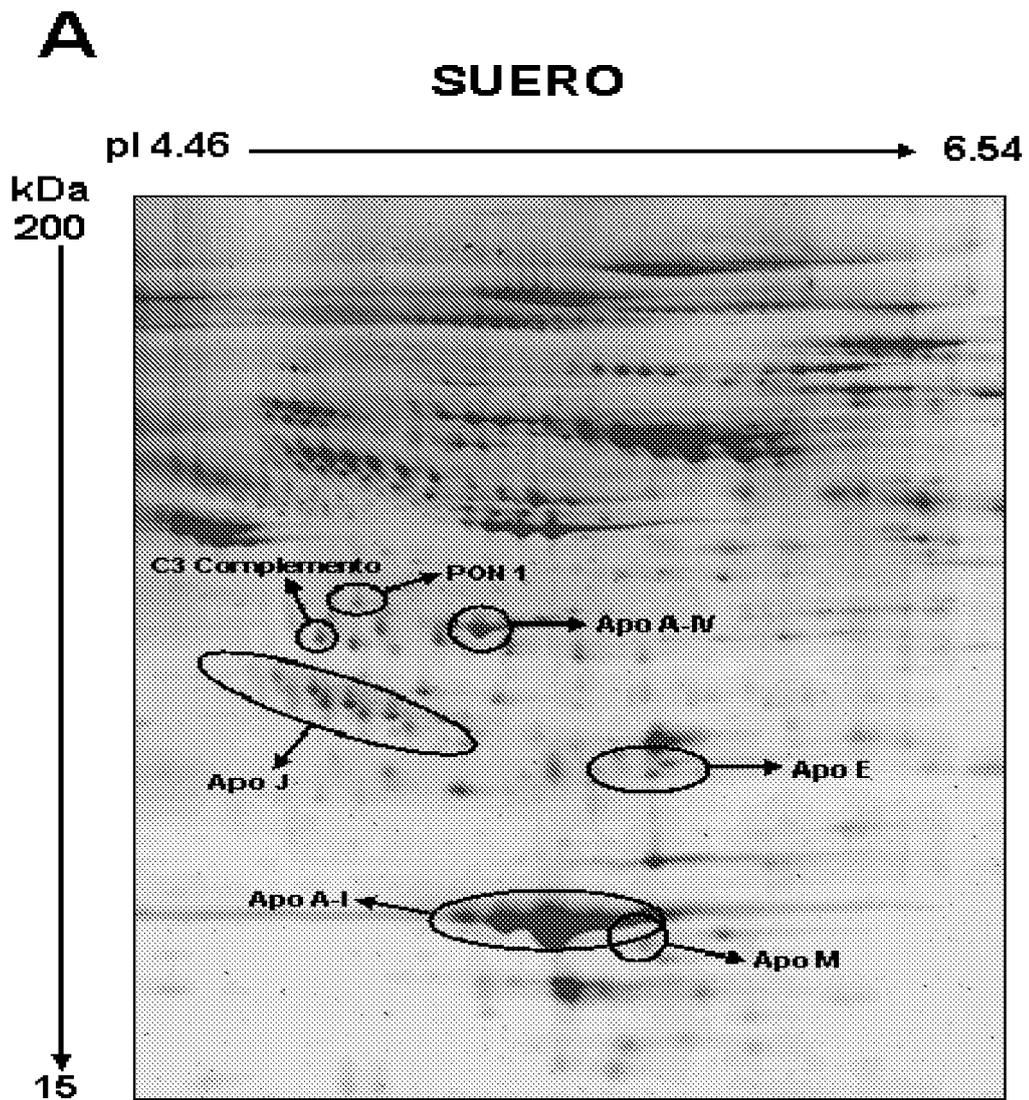
50

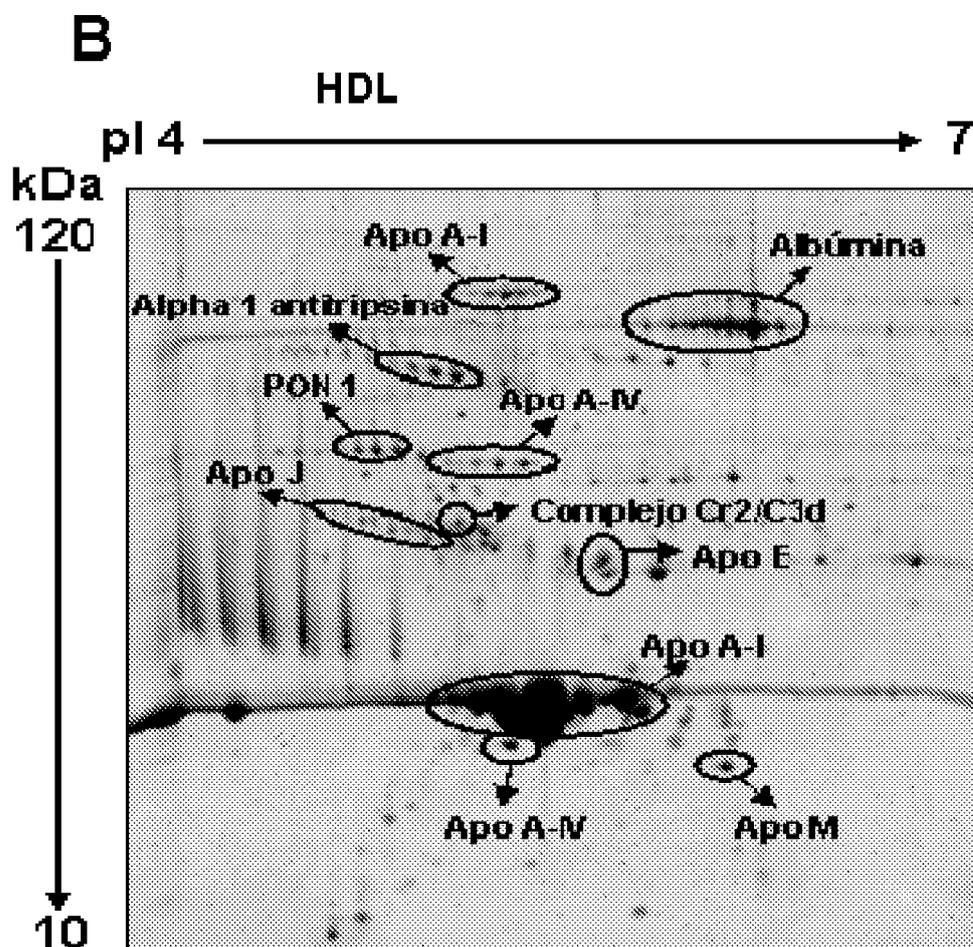
55

60

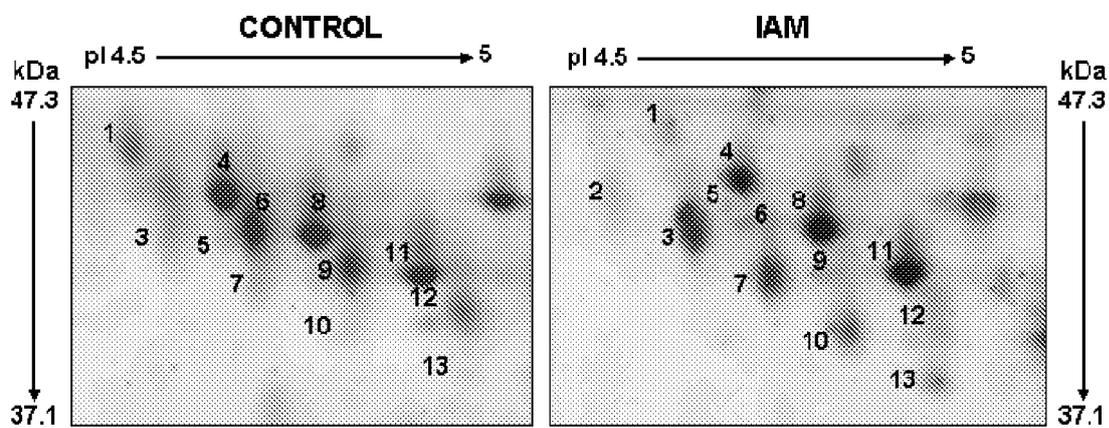
65

FIG. 1

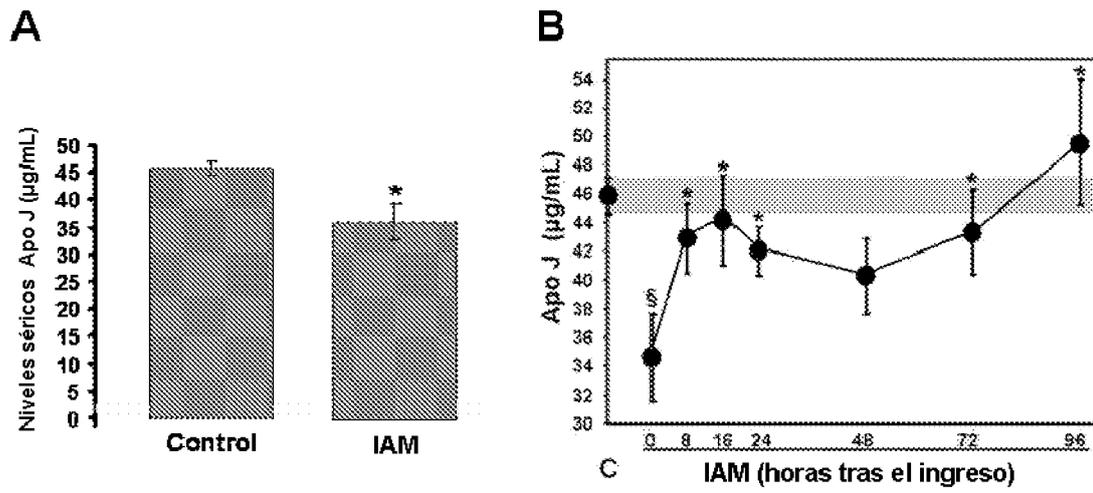




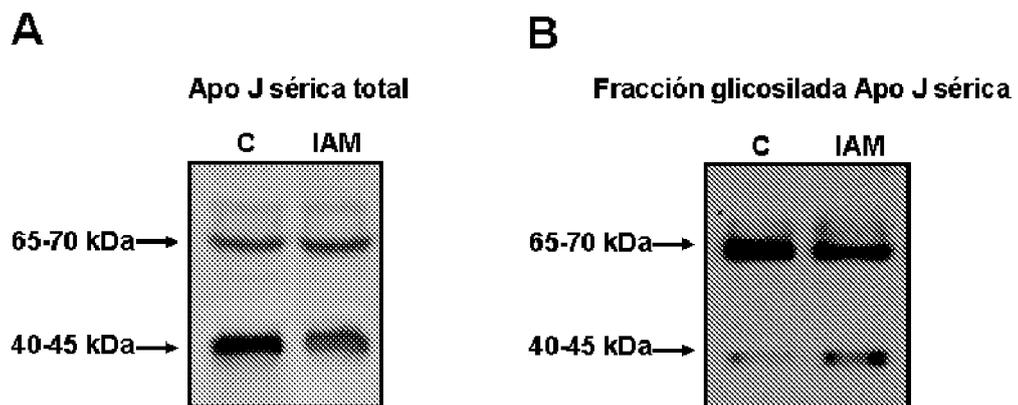
**FIG. 2**



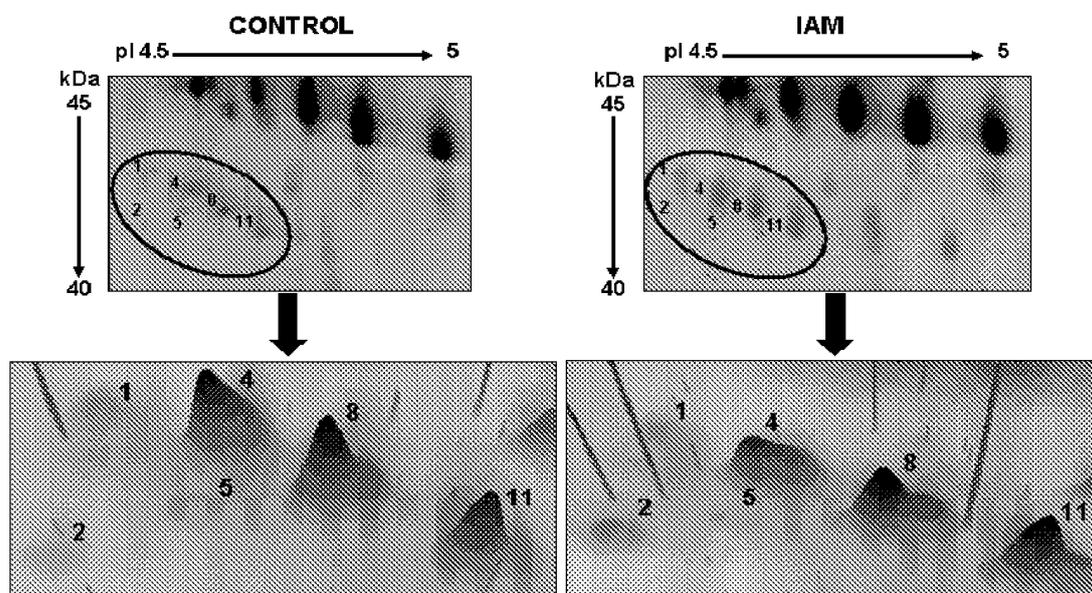
**FIG. 3**



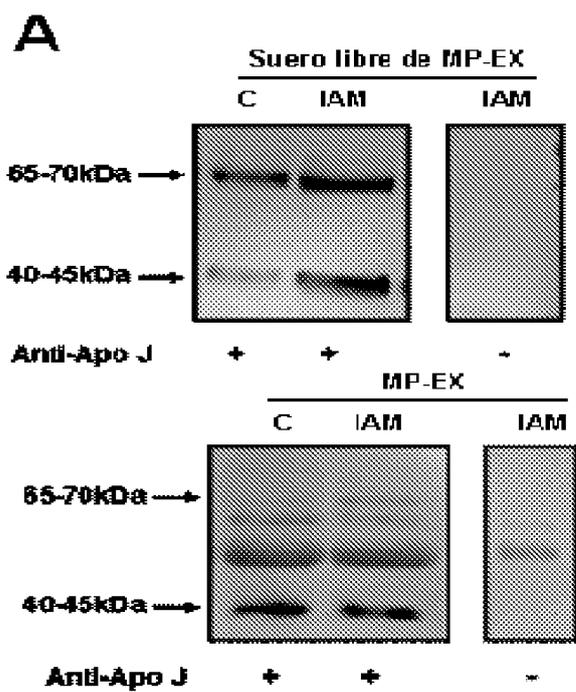
**FIG. 4**



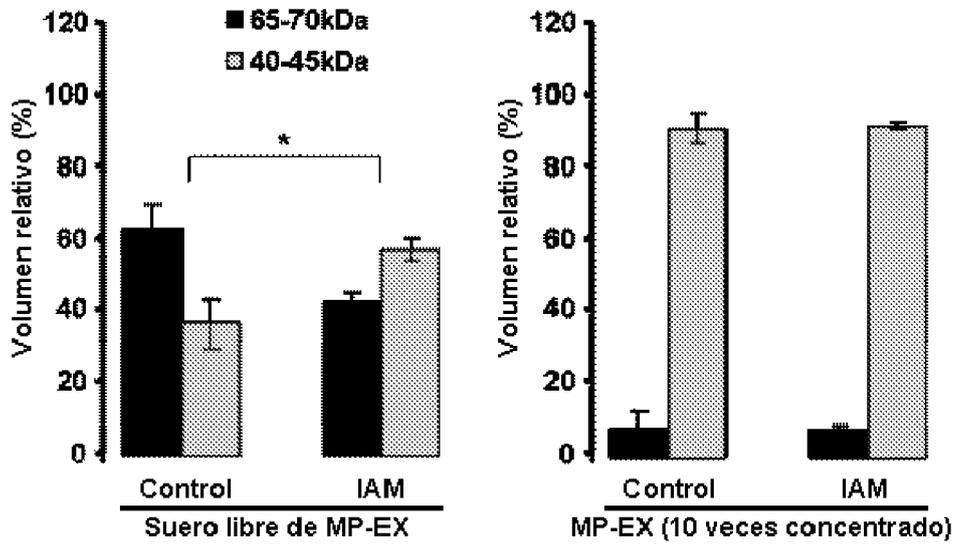
**FIG. 5**



**FIG 6**

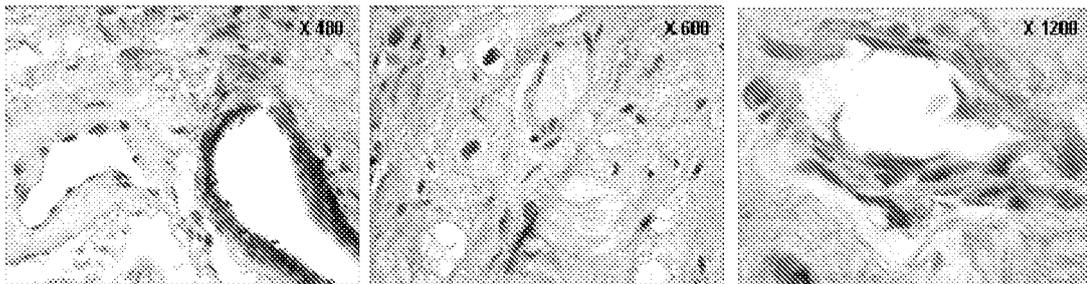


**B**

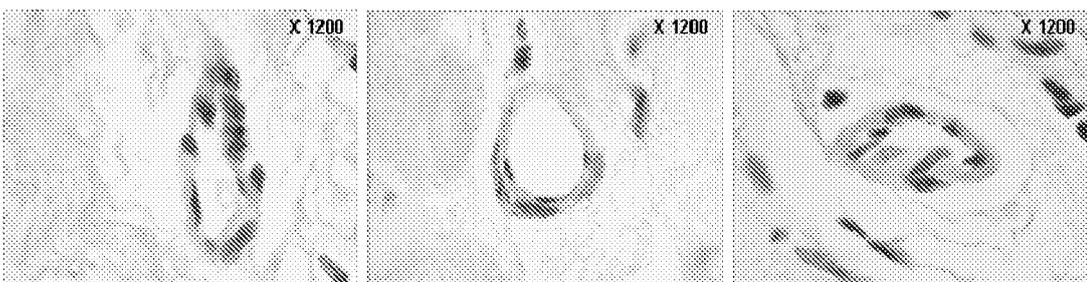


**FIG 7**

**Infarto agudo de miocardio**



**Corazón normal**





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030168

②② Fecha de presentación de la solicitud: 09.02.2010

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (01.01.2006)  
**G01N33/53** (01.01.2006)

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	POULAKOU MARIA V. et al. "Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease." In vivo (Athens, Greece). 2008 Jul-Ago. Vol. 22, Nº 4, páginas 537-542. ISSN 0258 -851X.	1-20
X	TROUGAKOS IOANNIS P. et al. "Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction". Experimental gerontology. 2002 Oct-Nov. Vol. 37, Nº 10-11, páginas 1175-1187. ISSN 0531-5565.	1-20
X	MUSANTE LUCA et al. "Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli". Proteomics. Feb 2002. Vol. 2; Nº. 2, páginas 197-205. ISSN 1615-9853.	1-20

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
24.01.2011

Examinador  
J. Manso Tomico

Página  
1/4

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

C12Q, G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, NPL, GENECARDS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.01.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-20	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-20	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	POULAKOU MARIA V. et al. "Apolipoprotein J and leptin levels in patients with coronary heart disease." In vivo (Athens, Greece). 2008 Jul-Ago. Vol. 22, Nº 4, páginas 537-542. ISSN 0258-851X.	
D02	TROUGAKOS IOANNIS P. et al. "Serum levels of the senescence biomarker clusterin/apolipoprotein J increase significantly in diabetes type II and during development of coronary heart disease or at myocardial infarction". Experimental gerontology. 2002 Oct-Nov. Vol. 37, Nº 10-11, páginas 1175-1187. ISSN 0531-5565.	
D03	MUSANTE LUCA et al. "Characterization of plasma factors that alter the permeability to albumin within isolated glomeruli". Proteomics. Feb 2002. Vol. 2; Nº. 2, páginas 197-205. ISSN 1615-9853.	

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La presente solicitud divulga un método pronóstico o diagnóstico del infarto agudo de miocardio, IAM, y del fallo renal, mediante la detección diferencial del patrón proteómico de la fracción glicosilada de Apo J sérica aplicando técnicas de electroforesis bidimensional, 2-DE, y detección MALDI-ToF.

Las reivindicaciones 1-6 hacen referencia al uso del perfil proteómico utilizado, las reivindicaciones 7-17 al método desarrollado, las reivindicaciones 18-20 a un Kit desarrollado para llevar a cabo el método propuesto.

Dada la falta de claridad de:

- 1) las reivindicaciones para identificar el perfil, o los perfiles proteómicos utilizados: expresiones tales como "las formas glicosiladas se seleccionan del conjunto...", o "las formas glicosiladas son todas las del conjunto" son ambiguas.
- 2) del método reivindicado, especialmente de la reivindicación 11: expresiones tales como "donde una cantidad de al menos una de las formas glicosiladas del conjunto Apo J-15 y/o donde una cantidad de al menos una de las formas glicosiladas del conjunto Apo J-29, donde tanto J-15 y J-29 hacen referencia a un conjunto de "spots" y no a isoformas concretas.
- 3) del Kit diseñado para el efecto donde se caracterizan los componentes del kit por ser capaces de llevar a cabo el método y no por los reactivos necesarios para llevarlo a cabo

todo ello, en su conjunto, hace que el alcance de las reivindicaciones se limite a la elaboración de métodos para el pronóstico o diagnóstico de patologías cardíacas y renales mediante el uso de formas glicosiladas de Apo J, identificadas aplicando técnicas de electroforesis bidimensional o inmunoensayo para la detección y cuantificación de tales formas glicosiladas.

D01 muestra un estudio donde se identifica como marcador de enfermedad coronaria la glicoproteína heterodímera ApoJ en su forma no reducida (75-80 kDa) concluyendo que los valores séricos de ApoJ en pacientes con estenosis coronaria eran significativamente más elevados de los que aparecían en pacientes sin estenosis.

D02 muestra el análisis de la glicoproteína Apo J mediante la combinación de un ELISA con un inmunoblotting que demuestra el aumento de los niveles séricos de ApoJ en pacientes afectados con diabetes tipo II, pacientes con infarto de miocardio o pacientes que sufren alguna enfermedad coronaria. El estudio demuestra que los niveles encontrados de ApoJ en este tipo de pacientes con respecto a un grupo control son estadísticamente significativos (ver figura 4) y que las fracciones elevadas son las que corresponden a la fracción ApoJ de entre 75-85 kDa y agregados de mayor peso molecular

D03 divulga un estudio donde, aplicando la técnica de 2-DE, caracterizan diversos marcadores séricos en su relación con la glomeruloesclerosis segmental focal (FSGS) y los mecanismos de proteinuria. En concreto se describe la identificación de la proteína ApoJ en su forma heterodímera (figura 3, tabla 1) como uno de los factores implicados en la aparición de la proteinuria.

Considerando los documentos citados como estado de la técnica, las reivindicaciones 1-20 carecerían de novedad y actividad inventiva, dado que tales documentos divulgan métodos de detección de la proteína glicosilada ApoJ y su capacidad pronóstico o diagnóstico de enfermedades coronarias y renales. La elaboración de perfiles proteómicos de la forma glicosilada Apo J, sin concretar el perfil concreto y su rango concreto de variación que le asigne un valor predictivo con respecto a la enfermedad, sería obvio para el experto en la materia, a la luz del estado de la técnica anterior.