

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 026**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2013** E 13382059 (7)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019** EP 2770326

54 Título: **Método para el diagnóstico de glaucoma basándose en la determinación de niveles de proteínas séricas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2020

73 Titular/es:

**INSTITUTO OFTALMOLÓGICO FERNÁNDEZ -
VEGA, S.L. (100.0%)
Avda. Doctores Fernández-Vega, 34
33012 Oviedo - Asturias, ES**

72 Inventor/es:

**GONZÁLEZ-IGLESIAS, HÉCTOR;
ÁLVAREZ FERNÁNDEZ, LYDIA;
GARCÍA DÍAZ, MONTSERRAT y
COCA-PRADOS, MIGUEL**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 759 026 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

Método para el diagnóstico de glaucoma basándose en la determinación de niveles de proteínas séricas

Campo de la invención

5 La presente invención se encuentra dentro del campo del diagnóstico y, más específicamente, se refiere al diagnóstico de glaucoma basándose en la determinación de los niveles séricos de algunas proteínas. Asimismo, la invención también se refiere a un método para el diagnóstico diferencial de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación.

Antecedentes de la invención

10 Una de las principales causas de ceguera en todo el mundo, el glaucoma abarca un grupo complejo de trastornos que son de origen multigénico y multifactorial, pero todos se caracterizan por la degeneración progresiva del nervio óptico, la muerte de células ganglionares de la retina y la pérdida del campo visual. El glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y el glaucoma de pseudoexfoliación (GPEX) se encuentran entre los tipos más prevalentes de glaucoma en los países desarrollados. Aunque una elevación anómala de la presión intraocular (PIO) es el factor de riesgo más conocido asociado con la patogenia y la progresión de GPAA, la presencia del síndrome de pseudoexfoliación está relacionada con GPEX, una forma secundaria de glaucoma. Se estima que el número proyectado de personas en todo el mundo con GPAA en 2020 alcanzará los 60 millones. En determinadas regiones del mundo, incluido el noroeste de España y algunas provincias de Arabia Saudita, la prevalencia de GPEX entre los pacientes con síndrome de pseudoexfoliación puede alcanzar hasta el 30%.

20 El aumento de la PIO observado se asocia habitualmente con una disfunción de la salida normal del humor acuoso en el ojo, debido a una alteración en la fisiología celular de la malla trabecular en GPAA, y a la acumulación de agregados fibrilares de material de los tejidos del segmento anterior del ojo (es decir, iris, cristalino, cuerpo ciliar) en GPEX. Las diferencias clínicas adicionales entre GPAA y GPEX incluyen: (i) una PIO más elevada en pacientes con GPEX que aquellos con GPAA (en relación con el control); (ii) una falta de una respuesta de PIO a los esteroides entre los pacientes con GPEX en comparación con aquellos con GPAA; y (iii) diferencias histológicas cuantitativas de secciones transversales del nervio óptico. La frecuencia de aparición y la tasa de neurodegeneración óptica tanto en GPAA como en GPEX aumentan con la edad y, en última instancia, conducen a ceguera. En la mayoría de los casos, la degeneración de la papila óptica precede a la pérdida de campo detectable, y se ha estimado que el umbral de glaucoma temprano puede implicar una pérdida del 25% al 35% de las células ganglionares de la retina en el momento en que se encuentran defectos de campo tempranos.

30 A pesar de la gran cantidad de estudios de ligamiento, los informes de genes candidatos y las investigaciones de asociación de todo el genoma realizadas en poblaciones con GPAA y GPEX en todo el mundo, sólo se han descubierto genes con efectos poblacionales limitados. Los resultados notables de estos estudios es que las mutaciones en el gen *Myocilin* (de miocilina) han estado en varias frecuencias con GPAA y variantes de secuencia comunes en el gen *Lysyl oxidase-like 1* (de proteína tipo lisil oxidasa 1) están relacionadas con GPEX. Por el contrario, sólo se han realizado investigaciones limitadas en el campo de la proteómica diferencial en busca de biomarcadores moleculares de glaucoma. En particular, la búsqueda de biomarcadores (es decir, proteínas) en líquidos biológicos fácilmente disponibles (aquellos que no requieren cirugía invasiva) tales como lágrimas, ha producido descubrimientos que pueden ser beneficiosos en el diagnóstico temprano y el tratamiento del glaucoma.

40 Tezel G. *et al.*, Invest. Ophthalmol Vis. Sci., vol. 53, n.º 13, 13 de noviembre de 2012, páginas 8222-8231 dan a conocer un análisis inmunoproteómico de posibles candidatos a biomarcadores séricos en glaucoma humano que sigue el mismo procedimiento que el dado a conocer en la presente solicitud. Sin embargo, la apolipoproteína A-IV no está comprendida en los 10 biomarcadores de proteínas séricas enumerados seleccionados para la validación en suero de muestras glaucomatosas y de control mediante ELISA específico. Tezel G., Prog. Retin Eye Res., vol. 35, julio de 2013, páginas 18-43 es una revisión que informa sobre los resultados de los estudios de proteómica y la identificación de los mecanismos moleculares y biomarcadores del glaucoma en diferentes muestras tales como lágrimas, sangre, humor acuoso y material pseudoexfoliativo. Sin embargo, no se menciona la apolipoproteína A-IV. Grus F.H. *et al.*, Mol. Vis., vol. 14, 4 de agosto de 2008, páginas 1437-1445 dan a conocer electroforesis en gel 2D, espectrometría de masas y validación por ELISA realizados en muestras de humor acuoso para la identificación de niveles elevados de transtiretina en humor acuoso de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto. Sin embargo, no se menciona la apolipoproteína A-IV. Bouhenni R.A. *et al.*, Exp. Eye Res., vol. 92, n.º 1, enero de 2011, páginas 67-75 dan a conocer la identificación de proteínas expresadas de manera diferencial en el humor acuoso del glaucoma congénito primario mediante espectrometría de masas e inmunotransferencia de tipo Western y enseñan que la apolipoproteína A-IV se detectó a niveles significativamente mayores en el humor acuoso de pacientes con glaucoma congénito primario en comparación con controles. Sin embargo, el glaucoma primario de ángulo abierto o el glaucoma de pseudoexfoliación no se mencionan. Pieragostino D. *et al.*, Mol. Biosyst., vol. 8, n.º 4, abril de 2012, páginas 1017-1028 dan a conocer la expresión diferencial de proteínas en lágrimas de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y de pseudoexfoliación y enseñan que la serotransferrina y la apolipoproteína A-I se sobreexpresan en el glaucoma de pseudoexfoliación y que la apolipoproteína A-I se sobreexpresa en GPAA. Sin embargo, no se menciona la apolipoproteína A-IV.

Existen varios obstáculos importantes que complican el descubrimiento de biomarcadores. En primer lugar, debe determinarse si la medicación influye o no en la expresión de biomarcadores en líquidos corporales. Algunos estudios proteómicos recientes se llevaron a cabo satisfactoriamente con lágrimas y humor acuoso, que incluyeron pacientes con GPAA y GPEX sometidos a tratamiento para el glaucoma. Sin embargo, no se ha sometido a prueba si puede basarse en los biomarcadores en suero propuestos para diagnosticar el glaucoma no tratado en pacientes que toman medicamentos para el glaucoma. En segundo lugar, generalmente se cree que las pruebas para validar candidatos a biomarcadores de glaucoma deben incluir sujetos con diferentes tipos y estadios de glaucoma, así como pacientes con otras enfermedades oculares y neurodegenerativas.

Por tanto, todavía existe la necesidad en la técnica de métodos fiables útiles para diagnosticar diferentes tipos de glaucoma, tales como GPAA y GPEX, basándose en el análisis de líquidos corporales, que pueden obtenerse fácilmente por medios no invasivos.

Sumario de la invención

Los inventores de la presente invención han observado que, sorprendentemente, los pacientes que padecen glaucoma presenta diferentes niveles de expresión de las proteínas séricas de la tabla 1 en comparación con los sujetos de control. En particular, se realizó un estudio basándose en la identificación mediante electroforesis en gel (2D-DIGE (electroforesis diferencial en gel bidimensional) seguido de análisis mediante espectrometría de masas, de 35 proteínas séricas cuya expresión se alteró en pacientes con glaucoma en comparación con los sujetos de control. Se validaron estas 35 proteínas mediante determinación por ELISA de las concentraciones séricas, mostrando diferencias significativas en los niveles de trece de estas proteínas entre sujetos con glaucoma (GPAA o GPEX) y sujetos de control (tabla 5). Modelos de aprendizaje automático de clasificador bayesiano ingenuo generados a partir de estos datos para cada uno de los biomarcadores individuales mostró valores de AUC en todos los casos mayores de 0,5 y por encima de 0,8 para muchos de los biomarcadores, lo que demuestra la utilidad de cada una de estas proteínas como biomarcadores individuales (tabla 6). Además, los datos de concentración sérica determinados mediante ELISA de los primeros 17 clasificados de dichas 35 proteínas se analizaron mediante un “análisis discriminante por pasos” para determinar las variables que tienen un mayor poder de discriminación. Por medio de esta metodología, se identificaron diferentes paneles adecuados para diagnosticar diferentes tipos de glaucoma; entre ellos, se identificó un panel de 6 proteínas (apolipoproteína A-IV, serotransferrina, C3 del complemento, apolipoproteína L1, C4 del complemento y región C de cadena gamma-2 de Ig) que se usó para generar modelos predictivos multivariable cuyos resultados mostraron que la determinación de los niveles séricos de estos biomarcadores permitió obtener valores de asignación correctos del 81%, con una especificidad del 83% y una sensibilidad del 92% (véase el ejemplo 1). Además, teniendo en cuenta la presencia o ausencia de síndrome de pseudoexfoliación en el sujeto, la determinación del nivel sérico de algunas de las proteínas contenidas en dicho panel de biomarcadores permitió una correcta discriminación entre grupos de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y glaucoma de pseudoexfoliación (GPEX) en el 86% de los pacientes.

Basándose en los hallazgos anteriores, se han desarrollado los siguientes aspectos inventivos.

En un aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación en un sujeto que comprende (i) determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y (ii) comparar el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV con un valor de referencia, en el que (a) si el sujeto padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV en comparación con un valor de referencia es indicativo de glaucoma de pseudoexfoliación, o (b) si el sujeto no padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV en comparación con un valor de referencia es indicativo de glaucoma primario de ángulo abierto.

En otro aspecto, la invención se refiere a un kit tal como se define en las reivindicaciones 11-13 adjuntas.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit tal como se define en las reivindicaciones 14-15 para el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación.

Descripción detallada de la invención

Método para el diagnóstico de glaucoma.

Así, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico de glaucoma seleccionado de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación en un sujeto, denominado más adelante en el presente documento “método de diagnóstico de la invención”, que comprende

(i) determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores de la tabla 1, y

(ii) comparar los niveles de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de dicho al menos un biomarcador con su valor de referencia,

en el que la tabla 1 es

Tabla 1

Nombre de la proteína	Nombre del gen
Apolipoproteína A-IV	APOA4
C3 del complemento	C3
Serotransferrina	TF
Vitronectina	VTN
Transtiretina	TTR
Alfa-1-antitripsina	SERPINA1
Fibulina-1	FBLN1
Apolipoproteína A1	APOA1
Ficolina-3	FCN3
Factor H del complemento	CFH
Cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina	ITIH4
Apolipoproteína L1	APOL1
Albúmina sérica	ALB

y en el que

5 a) si el sujeto padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de dicho al menos un biomarcador en comparación con un valor de referencia es indicativo de glaucoma de pseudoexfoliación, o

10 b) si el sujeto no padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina y apolipoproteína L1 en comparación con un valor de referencia, y/o una disminución del nivel de expresión de albúmina sérica en comparación con una referencia el valor es indicativo de glaucoma primario de ángulo abierto.

15 El término "glaucoma", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de estados oculares que conducen a daños en el nervio óptico, en la mayoría de los casos debido al aumento de la presión en el ojo o la alta presión intraocular. El término glaucoma abarca el glaucoma de ángulo abierto (crónico), glaucoma de ángulo cerrado (agudo), glaucoma de pseudoexfoliación, glaucoma congénito y glaucoma secundario. En la mayoría de los casos, el aumento de la presión intraocular se debe a una disfunción de la salida normal del humor acuoso en el ojo.

20 El término "glaucoma primario de ángulo abierto" o "GPAA", tal como se usa en el presente documento, se refiere al tipo más común de glaucoma. GPAA se caracteriza por un aumento progresivo y lento de la presión ocular con el tiempo acompañado de pérdida de visión periférica o visión de túnel. El GPAA avanzado puede conducir a ceguera. El aumento de la presión intraocular está provocado por el bloqueo de la malla trabecular, que normalmente drena el humor acuoso del ojo.

25 El término "glaucoma de pseudoexfoliación" o "GPEX", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un tipo de glaucoma provocado por la deposición de un material de tipo proteico dentro del segmento anterior del ojo. El síndrome de pseudoexfoliación (PEX) se considera un factor de riesgo importante para el desarrollo de glaucoma secundario de ángulo abierto. A diferencia de GPAA, la enfermedad GPEX discurre con una evolución clínica más agresiva con una alta PIO al inicio, tasas de progresión más rápidas, escasa respuesta a la terapia médica y una mayor necesidad de intervención quirúrgica.

30 La expresión "método para el diagnóstico de glaucoma", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un método que consiste esencialmente en las etapas del método de diagnóstico de la invención, aunque puede incluir etapas adicionales. "Diagnosticar", tal como se usa en el presente documento, se refiere a evaluar la probabilidad según la cual un sujeto padece una enfermedad, en particular de glaucoma. El método para el diagnóstico de glaucoma de la invención se lleva a cabo *in vitro*. El término "*in vitro*", tal como se usa en el presente documento, significa que no se realiza por el cuerpo humano o animal.

35 El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se restringe a, animales domésticos y de granja, primates y humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano de sexo masculino o femenino de cualquier edad o raza.

La primera etapa del método de diagnóstico de la invención implica la determinación de los niveles de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores de la tabla 1 en una muestra de un sujeto.

5 El término “muestra”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier muestra recogida de un sujeto, en la que pueden medirse los marcadores de los métodos de la invención. Las muestras adecuadas para usar en la presente invención incluyen cualquier líquido corporal.

10 En una realización preferida, la muestra es una muestra de líquido corporal. El término “muestra de líquido corporal”, tal como se usa con el presente documento, se refiere a una muestra de un líquido derivado del cuerpo de un organismo vivo. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, de líquidos corporales incluyen lágrimas, sangre, plasma o suero sanguíneo. Preferiblemente, la muestra de líquido corporal es sangre, plasma o suero sanguíneo.

El término “biomarcador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína cuya aparición o cantidad es característica de una situación específica, por ejemplo, una enfermedad tal como glaucoma.

15 Los biomarcadores útiles para el método de diagnóstico de la invención son aquellas proteínas incluidas en la tabla 1.

20 El término “apolipoproteína A-IV” o “apoA-IV”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que en humanos es el producto del gen *APOA4*. El producto de traducción principal del gen *APOA4* es una preproteína de 396 residuos, que se somete a procesamiento proteolítico para producir apoA-IV, una glicoproteína unida a O madura que de 376 residuos, que se secreta en la circulación en la superficie de partículas de quilomicrón recién sintetizadas. La apoA-IV puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto, que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la apoA-IV es la proteína humana con el número de registro UniProt P06727 (28 de noviembre de 2012).

25 El término “C3 del complemento” o “C3”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína del sistema del complemento que desempeña un papel fundamental en la activación del complemento tanto clásica como alternativa. En humanos, el C3 del complemento está codificado por el gen *C3*. El C3 del complemento puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, el C3 del complemento es la proteína humana con el número de registro UniProt P01024 (28 de noviembre de 2012).

30 El término “serotransferrina” o “transferrina” o “siderofilina” o “TF” tal como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína de plasma sanguíneo que se une al hierro que controla el nivel de hierro libre en los líquidos biológicos. En humanos, la serotransferrina está codificada por el gen *TF*. El TF puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, el TF es la proteína humana con el número de registro UniProt P02787 (28 de noviembre de 2012).

35 El término “vitronectina” o “VTN”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una glucoproteína que se encuentra en el suero y en la matriz extracelular que fomenta la adhesión y diseminación celular. Es un miembro de la familia de las pexinas. En humanos, la vitronectina está codificada por el gen *VTN*. La vitronectina puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la vitronectina es la proteína humana con el número de registro UniProt P04004 (28 de noviembre de 2012).

40 El término “transtiretina” o “TTR”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un transportador sérico y de líquido cefalorraquídeo de la hormona tiroidea tiroxina y de la vitamina A. En humanos, la transtiretina está codificada por el gen *TTR*. La transtiretina puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la transtiretina es la proteína humana con el número de registro UniProt Q53WY6 (28 de noviembre de 2012).

45 El término “alfa-1-antitripsina” o “serpina A1” o “SERPINA1”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un inhibidor de proteasa que pertenece a la superfamilia de las serpinas. En humanos, la alfa-1-antitripsina está codificada por el gen *SERPINA1*. La alfa-1-antitripsina puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la alfa-1-antitripsina es la proteína humana con el número de registro UniProt P01009 (28 de noviembre de 2012).

50 El término “fibulina-1” o “FBLN1”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína secretada que se encuentra en asociación con estructuras de matriz extracelular que incluyen fibras que contienen fibronectina y elastina y membrana basal y en sangre asociada con fibrinógeno. En humanos, la fibulina-1 está

codificada por el gen *FBLN1*. La fibulina-1 puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la fibulina-1 es la proteína humana con el número de registro UniProt P23142 (28 de noviembre de 2012).

5 El término “apolipoproteína A-I” o “apoA-I” o “APOA1”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una apoproteína que es el componente principal de la lipoproteína de alta densidad (HDL) en plasma. En humanos, la apoA-I está codificada por el gen *APOA1*. La apoA-I puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la apoA-I es la proteína humana con el número de registro UniProt P02647
10 (28 de noviembre de 2012).

El término “ficolina-3” o “FCN3”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un miembro de la familia de proteínas ficolinas que consiste en un dominio de tipo colágeno y un dominio de línea de fibrinógeno. En humanos, la ficolina-3 está codificado por el gen *FCN3*. La ficolina-3 puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la ficolina-3 es la proteína humana con el número de registro UniProt
15 O75636 (28 de noviembre de 2012).

El término “factor H del complemento” o “CFH”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una glicoproteína plasmática que actúa como regulador de la ruta alternativa del sistema del complemento. El factor H del complemento puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, el factor H del complemento es la proteína humana con el número de registro UniProt P08603 (28 de
20 noviembre de 2012).

El término “cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina” o “ITI4”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena pesada que puede formar parte de las proteínas plasmáticas inhibidores de inter-alfa-tripsina junto con una cadena ligera seleccionada del grupo de AMBP o SPINT2. En humanos, está codificada por el gen *ITI4*. La cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina es la proteína humana con el número de registro UniProt Q14624 (28 de noviembre de 2012).

30 El término “apolipoproteína L1” o “apoL-I” o “APOL1”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un componente de apoproteína minoritario de la lipoproteína de alta densidad (HDL) que se sintetiza en el hígado y también en muchos otros tejidos, incluidos el páncreas, los riñones y el cerebro. En humanos, la apoL-I está codificada por el gen *APOL1*. La apoL-I puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una
35 realización particular, la apoL-I es la proteína humana con el número de registro 014791 de UniProt (28 de noviembre de 2012).

El término “albúmina sérica” o “albúmina” o “ALB”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína globular que en humanos está codificada por el gen *ALB*. La albúmina sérica, que es la proteína plasmática más abundante en mamíferos, regula la presión coloidosmótica de la sangre. La albúmina sérica puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la albúmina sérica es la
40 proteína humana con el número de registro UniProt P02768 (6 de febrero de 2013).

Los inventores también han hallado que los niveles de expresión de otras proteínas también están alterados en pacientes con glaucoma en comparación con sujetos de control. La determinación de los niveles de expresión de
45 estos biomarcadores adicionales también puede ser útil para ayudar en el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de GPAA y GPEX. Por tanto, en una realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende además determinar el nivel de expresión de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y combinaciones de los mismos.

50 El término “antitrombina III” o “SERPINC1”, tal como se usa se refiere a un inhibidor de serina proteasa en plasma que regula la cascada de coagulación sanguínea. En humanos, la antitrombina III está codificada por el gen *SERPINC1*. La antitrombina III puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una
55 realización particular, la antitrombina III es la proteína humana con el número de registro UniProt P01008 (9 de enero de 2013).

El término “región C de cadena gamma-2 de Ig” o “marcador G2m” o “IGHG2”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que en humanos está codificada por el gen *IGHG2*. La IGHG2 puede ser de cualquier origen, por ejemplo humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a

diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, la IGHG2 es la proteína humana con el número de registro UniProt P01859 (28 de noviembre de 2012).

El término "C4-A del complemento" o "C4A", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína del sistema del complemento que desempeña un papel fundamental en la activación de la ruta clásica del sistema del complemento. En humanos, C4A está codificado por el gen C4A. El C4A puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, el C4A es la proteína humana con el número de registro UniProt P0C0L4 (28 de noviembre de 2012).

El término "componente P de amiloide sérico" o "APCS", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que en humanos está codificada por el gen APCS. El componente P de amiloide sérico puede ser de cualquier origen, por ejemplo, humano, bovino, murino, equino, canino, etc., dependiendo del sujeto que va a diagnosticarse con el método de diagnóstico de la invención. En una realización particular, el componente P de amiloide sérico es la proteína humana con el número de registro UniProt P02743 (9 de enero de 2013).

El método de diagnóstico de la invención implica la determinación del nivel de expresión de los biomarcadores mencionados anteriormente. El término "nivel de expresión", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de una proteína detectable en una muestra. Los métodos para determinar el nivel de los biomarcadores según la presente invención pueden basarse en someter a ensayo el nivel de expresión de proteína en la muestra en su totalidad, preferiblemente en la fracción no celular de la muestra. La determinación de los biomarcadores puede llevarse a cabo mediante cualquier método adecuado para la detección y cuantificación de una proteína y el experto en la técnica está familiarizado con dichos métodos. A modo de ilustración no limitativa, el nivel de expresión de un biomarcador a nivel de proteína puede determinarse mediante una técnica que comprende el uso de anticuerpos con la capacidad de unirse específicamente a la proteína sometida a ensayo (o a fragmentos de la misma que contienen los determinantes antigénicos) y posteriormente la cuantificación de los complejos antígeno-anticuerpo resultantes, o alternativamente por medio de una técnica que no comprende el uso de anticuerpos tales como, por ejemplo, técnicas basadas en espectroscopía de masas. Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o fragmentos de los mismos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. De manera similar, los anticuerpos pueden marcarse. Los ejemplos ilustrativos, pero no exclusivos, de marcadores que pueden usarse en el presente documento incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores o sustratos enzimáticos, inhibidores enzimáticos, partículas o colorantes. Existe una amplia variedad de pruebas conocidas que pueden usarse según la presente invención tales como la aplicación combinada de anticuerpos no marcados (anticuerpos primarios) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios), inmunotransferencia de tipo Western o inmunotransferencia, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático), DAS-ELISA (ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo), electroforesis en gel bidimensional, electroforesis capilar, técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia, técnicas basadas en el uso de biochips o microalineamientos de proteínas que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas y ensayos basados en puntos cuánticos ligados a anticuerpos. Otras formas de detección y cuantificación de proteínas incluyen, por ejemplo, técnicas de cromatografía de afinidad o ensayos de unión a ligando. En una realización preferida de la invención, la determinación de los niveles de biomarcadores se lleva a cabo mediante un método inmunológico. Tal como se usa en el presente documento, "método inmunológico", cuando se aplica a una determinación, se refiere a cualquier método que implique el uso de uno o más anticuerpos específicos para una sustancia diana con el fin de determinar la cantidad/concentración de dicha sustancia diana, excluyendo otras sustancias que se encuentran en la muestra. Los métodos inmunológicos adecuados incluyen, sin limitación, inmunotransferencia de tipo Western, inmunoprecipitación, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), resonancia de plasmones superficiales, radioinmunoensayo (RIA). En una realización preferida, la determinación de los niveles de biomarcadores se lleva a cabo mediante ensayos ELISA o múltiplex basados en puntos cuánticos.

El término "ELISA" o "ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas", tal como se usa en el presente documento, significa ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas y se refiere a un ensayo mediante el cual se fija una cantidad desconocida de sustancia diana (los biomarcadores del método de diagnóstico de la invención) en una superficie, y luego se lava un anticuerpo específico sobre la superficie de modo que pueda unirse al antígeno. Este anticuerpo se une a una enzima, y en la etapa final se añade una sustancia que la enzima puede convertir en alguna señal detectable. Se conocen diferentes tipos de ensayos ELISA y pueden aplicarse al método de la invención, incluyendo ELISA directo, ELISA de tipo sándwich, ELISA competitivo y método y dispositivo inversos de ELISA (ELISA-R m&d).

El ELISA directo se lleva a cabo poniendo en contacto la muestra de prueba que comprende los biomarcadores con un soporte sólido, que se ha recubierto previamente con una solución concentrada de un reactivo o una proteína que no interacciona (albúmina sérica bovina, caseína). Una vez que los biomarcadores presentes en la muestra de prueba se absorbe sobre el soporte, se añade un anticuerpo específico para el biomarcador en condiciones adecuadas para unirse al biomarcador. El anticuerpo, que está unido, se detecta entonces con un anticuerpo secundario que se acopla a una etiqueta detectable o a una enzima modificadora de sustrato. La señal resultante de la etiqueta detectable o del sustrato es entonces proporcional a la cantidad de anticuerpo unido al soporte que, a su

vez, se correlaciona directamente con la cantidad de biomarcador en la muestra.

El ensayo ELISA competitivo incluye una etapa de diagnóstico en la que la muestra de prueba que comprende una cantidad desconocida de biomarcador se pone en contacto con un primer anticuerpo tal como se definió anteriormente. Los complejos anticuerpo-antígeno se añaden a un pocillo recubierto con antígeno. Una vez que el soporte se lava para retirar cualquier complejo unido de forma inespecífica, la cantidad del primer anticuerpo se detecta con un segundo anticuerpo, que se acopla a un resto detectable. En este tipo de ensayos, cuanto mayor es la concentración de antígeno original, más débil es la señal eventual. Un ensayo ELISA competitivo alternativo es el que incluye un antígeno ligado a enzimas en lugar de un anticuerpo ligado a enzimas. El antígeno marcado compite por los sitios de unión del anticuerpo primario con el antígeno de muestra (sin marcar). Usando este tipo de ensayos, la concentración de antígeno en los resultados de la muestra se correlaciona inversamente con la cantidad de antígeno marcado retenido en el pocillo y, por consiguiente, en una señal más débil.

El método y dispositivo inversos de ELISA (ELISA-R m&d) usan una fase sólida innovadora constituida por una varilla de poliestireno de inmuoabsorción con 4-12 ojivas sobresalientes; todo el dispositivo es adecuado para introducirse en un tubo de ensayo que contiene la muestra recogida y las siguientes etapas (lavado, incubación en conjugado e incubación en cromógeno) se llevan a cabo fácilmente sumergiendo las ojivas en micropocillos de microplacas convencionales precargados con reactivos, sellados y almacenados hasta su uso.

El ensayo ELISA de tipo sándwich consiste en recubrir un soporte con un primer anticuerpo específico para el biomarcador, aplicar la muestra que contiene el biomarcador que dará como resultado la unión del biomarcador al primer anticuerpo y aplicar un segundo anticuerpo también específico para el biomarcador, en el que dicho segundo anticuerpo se acopla habitualmente a una etiqueta detectable o a una enzima modificadora de sustrato. La señal generada por la etiqueta o por el sustrato convertido es la proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

El término “puntos cuánticos” se refiere a nanopartículas semiconductoras con propiedades ópticas y electrónicas únicas, en particular, su tendencia reducida al fotoblanqueo y la dependencia de su longitud de onda de fluorescencia de su tamaño que hacen que sean adecuadas para el tratamiento con sonda fluorescente de biomarcadores. Los biomarcadores del método de diagnóstico de la invención pueden detectarse por medio de puntos cuánticos ligados a anticuerpos. En una realización particular, los biomarcadores según el método de diagnóstico de la invención se detectan mediante un análisis múltiple basado en puntos cuánticos ligados a anticuerpos.

Alternativamente, el nivel de expresión de los biomarcadores según el método de diagnóstico de la invención puede determinarse mediante espectrometría de masas. En una realización particular, el nivel de expresión de los biomarcadores según el método de diagnóstico de la invención se determina mediante monitorización de reacciones múltiples (MRM). El término “monitorización de reacciones múltiples” o “MRM”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un método de detección de múltiples iones de uno o más iones precursores en espectrometría de masas en tándem cuantitativa. La configuración del ensayo de MRM comienza con la selección de péptidos “distintivos” que actúan como sustitutos para la cuantificación de la proteína de interés. La selección de péptidos se basa en la observación experimental usando patrones disponibles comercialmente. Estos péptidos distintivos se sintetizan como patrones internos estables marcados con isótopos. Los ensayos de MRM se basan en la selección de péptidos específicos digeridos enzimáticamente como representantes estequiométricos de las proteínas de las que se escinden. Las muestras deben digerirse enzimáticamente por medio de una “enzima digestiva”, que es una enzima capaz de escindir o hidrolizar péptidos o proteínas en fragmentos de manera aleatoria, o bien específica o bien genérica. Las enzimas digestivas incluyen proteasas tales como tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC. Los péptidos tripticos se cuantifican frente a un patrón interno con adiciones conocidas (un péptido marcado con isótopos estable sintético) para obtener una medida de la concentración de proteína.

La segunda etapa del método de diagnóstico de la invención comprende comparar el nivel de expresión de cada uno de los biomarcadores con su valor de referencia.

El término “valor de referencia”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un criterio predeterminado usado 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 inferior, un intervalo de valores, un valor promedio, una mediana de valores, un valor medio o un valor en comparación con un control o valor de referencia particular. Un valor de referencia puede basarse en un valor de muestra individual tal como, por ejemplo, un valor obtenido de una muestra del sujeto que sometiéndose a prueba, pero en un punto en el tiempo anterior. El valor de referencia puede basarse en un gran número de muestras tales como de la población de sujetos del grupo de edad cronológica emparejado, o basándose en un conjunto de muestras que incluyen o excluyen la muestra que va a someterse a prueba.

El valor de referencia según el método de diagnóstico de la invención se obtiene de uno o más sujetos que no padecen glaucoma (es decir, sujetos de control).

Según el método de diagnóstico para la invención, se considera que un sujeto no padece glaucoma si dicho sujeto

no cumple con los criterios de diagnóstico para el glaucoma, es decir, el sujeto no presenta daño característico del disco óptico con los cambios característicos correspondientes en el campo visual y la presencia de ángulo abierto de la cámara anterior. En una realización particular, los sujetos de los que se obtiene el valor de referencia según el método de diagnóstico de la invención no padecen ninguna patología ocular relevante, tal como inflamación, infección, retinopatías o maculopatías clínicamente detectables. En una realización particular, uno o más de los sujetos de los que se obtiene el valor de referencia según el método de diagnóstico de la invención pueden padecer cataratas.

Según el método de diagnóstico de la invención, una diferencia significativa entre el nivel de expresión de al menos un biomarcador de los biomarcadores de la tabla 1 que comprende al menos una apolipoproteína A-IV es indicativa de glaucoma. Más específicamente, según el método de diagnóstico de la invención, si el sujeto padece síndrome pseudoexfoliativo, un aumento del nivel de expresión de al menos un biomarcador de los biomarcadores de la tabla 1 que comprende al menos apolipoproteína A-IV en comparación con un valor de referencia es indicativo de GPEX y, si el sujeto no padece síndrome pseudoexfoliativo, un aumento de los niveles de expresión de al menos un biomarcador de los biomarcadores de la tabla 1, excepto albúmina sérica y que comprende al menos apolipoproteína A-IV en comparación con un valor de referencia, y/o una disminución del nivel de expresión de albúmina sérica en comparación con un valor de referencia es indicativo de GPAA.

El término “síndrome de pseudoexfoliación” o “PEX”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una microfibrilopatía sistémica asociada a la edad que selecciona como diana tejidos oculares a través de la deposición gradual de residuos fibrilares del cristalino y el epitelio pigmentario del iris, principalmente en la cápsula del cristalino, el cuerpo ciliar, zónulas, endotelio corneal e iris. El diagnóstico de PEX se basa en hallazgos característicos durante el examen oftálmico, como la presencia de residuos fibrilares blancos en la cápsula anterior del cristalino y el borde pupilar, defectos de transiluminación pupilar y pigmentación de la malla trabecular. Según el método de diagnóstico de la invención, se considera que un sujeto padece síndrome de pseudoexfoliación si se le diagnostica un síndrome de pseudoexfoliación y/o si muestra los síntomas del síndrome.

El término “diferencia significativa”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier diferencia entre el nivel de expresión de un biomarcador y su valor de referencia, que es mayor que el error experimental de la medición. La diferencia significativa puede estar aumentado o disminuido.

Según el método de diagnóstico de la invención, el nivel de expresión de un biomarcador se considera “aumentado” cuando el nivel de dicho biomarcador en una muestra es mayor que un valor de referencia. Los niveles de un biomarcador se consideran mayores que un valor de referencia cuando es al menos el 1,5%, al menos el 2%, al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el 130%, al menos el 140%, al menos el 150% o más, mayor que un valor de referencia.

Asimismo, en el contexto del método de diagnóstico de la invención, el nivel de un biomarcador se considera “disminuido” cuando el nivel de dicho biomarcador en una muestra es menor que un valor de referencia. Los niveles de un biomarcador se consideran menores que un valor de referencia cuando es al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, al menos el 20%, al menos el 25%, al menos el 30%, al menos el 35%, al menos el 40%, al menos el 45%, al menos el 50%, al menos el 55%, al menos el 60%, al menos el 65%, al menos el 70%, al menos el 75%, al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 100%, al menos el 110%, al menos el 120%, al menos el 130%, al menos el 140%, al menos el 150% o más, menor que un valor de referencia.

En una realización particular del método de diagnóstico de la invención, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 del inhibidor de inter-alfa-tripsina y apolipoproteína L1, en comparación con un valor de referencia y/o un aumento o una disminución del nivel de expresión de albúmina sérica en comparación a un valor de referencia es indicativo de glaucoma. En una realización más particular, si el sujeto padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1 y albúmina sérica en comparación con un valor de referencia es indicativo de GPEX. Además, en otra realización más particular, si el sujeto no padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y opcionalmente de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina y apolipoproteína L1 en comparación con un valor de referencia y/o una disminución del nivel de expresión de albúmina sérica en comparación con un valor de referencia es indicativo de GPAA.

En una realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende la determinación del nivel de

expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12 o al menos 13 de los biomarcadores de la tabla 1, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV.

5 Por tanto, en una realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende la determinación del nivel de expresión de sólo un biomarcador de los biomarcadores enumerados en la tabla 1, en el que dicho biomarcador es apolipoproteína A-IV.

10 En una realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende la determinación del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y la determinación de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12, de los otros biomarcadores de la tabla 1.

En otra realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende la determinación del nivel de expresión de todos de los 13 biomarcadores de la tabla 1.

15 En una realización particular específica, el método de diagnóstico de la invención comprende determinar el nivel de expresión de al menos dos biomarcadores seleccionados de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 en el que uno de dichos dos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV. En otra realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende determinar el nivel de expresión de al menos tres biomarcadores seleccionados de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 en el que uno de dichos tres biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV. En una realización particular más específica, el método de diagnóstico de la invención comprende la determinación de los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento y serotransferrina.

20 En otra realización particular, el método de diagnóstico de la invención comprende además la determinación del nivel de expresión de un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

25 Por tanto, en una realización particular específica, el método de diagnóstico de la invención comprende además (i) la determinación del nivel de expresión de al menos uno de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, y (ii) la determinación del nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

30 Además, en una realización particular específica, el método de diagnóstico de la invención comprende además (i) la determinación del nivel de expresión de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12 de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, y (ii) la determinación del nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

35 Alternativamente, en una realización particular específica, el método de diagnóstico de la invención comprende además (i) la determinación del nivel de expresión de todos los biomarcadores enumerados en la tabla 1, y (ii) la determinación del nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionados del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

40 En una realización particular específica, el método de diagnóstico de la invención comprende (i) la determinación del nivel de expresión de al menos dos biomarcadores de los biomarcadores de la tabla 1, en el que uno de estos tres biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, y (ii) la determinación del nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico. En una realización más particular, dicho al menos biomarcador adicional es C4A del complemento. Incluso realizaciones más particulares del método de diagnóstico de la invención incluyen la determinación del nivel de expresión de una combinación o panel de biomarcadores, en el que dicha combinación de biomarcadores comprende:

- 45 - los biomarcadores apolipoproteína A-IV, región C de cadena gamma-2 de Ig, apolipoproteína L1 y C4A del complemento;
- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina,
- 50 - los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, serotransferrina, apolipoproteína L1, región C de cadena gamma-2 de Ig y C4A del complemento,

- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, apolipoproteína L1, región C de cadena gamma-2 de Ig y C3 del complemento;
 - los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, serotransferrina y C4A del complemento;
 - los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento y serotransferrina; o
- 5
- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A1, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1, albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico.

10 La presente divulgación también describe un método de diagnóstico que incluye la determinación del nivel de expresión de una combinación o panel de biomarcadores, en el que dicha combinación de biomarcadores comprende

- los biomarcadores C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A1, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1, albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig y componente P de amiloide sérico;
- 15
- los biomarcadores albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico;
 - los biomarcadores albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina y apolipoproteína L1;
- 20
- los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina;
 - los biomarcadores antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina;
- 25
- los biomarcadores C3 del complemento, antitrombina-III, serotransferrina y apolipoproteína L1; o
 - los biomarcadores C3 del complemento, antitrombina-III, componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina;

Kits para el diagnóstico de glaucoma

30 En otro aspecto, la invención se refiere a un kit, denominado más adelante en el presente documento "kit de la invención", que comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de más de un biomarcador seleccionado de los biomarcadores de la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, en el que el reactivo para determinar el nivel de expresión se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo, un aptámero, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína biomarcadora, y (b) un reactivo adecuado para determinar el nivel de expresión del biomarcador por medio de un ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), siendo dicho reactivo un péptido marcado con isótopos que puede obtenerse mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC.

35

40 El término "kit", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un producto que contiene los diferentes reactivos necesarios para llevar a cabo los métodos de la invención envasados para permitir su transporte y almacenamiento. Los materiales adecuados para envasar los componentes del kit incluyen cristal, plástico (por ejemplo, polietileno, polipropileno, policarbonato, etc.), frascos, viales, papel o sobres. El kit también puede incluir instrucciones de uso.

45 Los biomarcadores de la tabla 1 se han definido previamente en relación con el método de diagnóstico de la invención.

50 La expresión "reactivo para determinar el nivel de expresión de (un biomarcador)", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto (o conjunto de compuestos) que permite determinar el nivel de expresión del biomarcador particular. En una realización particular, los reactivos para determinar el nivel de expresión de un biomarcador incluyen compuestos que se unen específicamente a las proteínas biomarcadoras seleccionadas del grupo que consiste en anticuerpos, aptámeros o fragmentos de los mismos. Más preferiblemente, dichos compuestos son anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a los biomarcadores correspondientes.

En otra realización particular, los reactivos para determinar el nivel de expresión de un biomarcador incluyen reactivos adecuados para determinar los niveles de expresión de los biomarcadores por medio de un ensayo de MRM. Dichos reactivos son péptidos marcados con isótopos derivados de las proteínas biomarcadoras cuyo nivel va a determinarse mediante MRM. Dichos péptidos marcados con isótopos pueden obtenerse a partir de la proteína biomarcadora de la que se derivan mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina o endoproteinasa GluC. En otra realización particular, los reactivos para determinar el nivel de expresión de un biomarcador incluyen además una enzima capaz de escindir o hidrolizar péptidos o proteínas en fragmentos de manera o bien específica o bien genérica, preferiblemente tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende puntos cuánticos, más específicamente, puntos cuánticos acoplados a compuestos que se unen específicamente a las proteínas biomarcadoras; preferiblemente puntos cuánticos acoplados a anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen específicamente a las proteínas biomarcadoras.

En otra realización, el kit de la invención comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12, o incluso todos (13), de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV. En una realización específica, el kit de la invención comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de (i) un primer biomarcador, en el que dicho primer biomarcador es apolipoproteína A-IV, y (ii) un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12, de los otros biomarcadores enumerados en la tabla, excepto apolipoproteína A-I. En una realización más específica, dicho primer biomarcador es un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une específicamente a apolipoproteína A-IV.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV de biomarcador y al menos un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12, de los otros biomarcadores enumerados en la tabla 1, excepto apolipoproteína A-I.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de todos de los 13 biomarcadores de la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I.

En una realización particular específica, el kit de la invención comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de al menos tres biomarcadores seleccionados de los biomarcadores enumerados en la tabla 1, excepto apolipoproteína A-I, preferiblemente anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a dichos al menos tres biomarcadores seleccionados de los biomarcadores de la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I, en el que al menos uno de dichos tres biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV. En una realización particular más específica, el kit de la invención comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV, un reactivo para determinar el nivel de expresión de C3 del complemento y un reactivo para determinar el nivel de expresión de serotransferrina; preferiblemente, dichos reactivos son anticuerpos, o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a dichos biomarcadores.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende además un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional, en el que dicho biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

Por tanto, en una realización particular específica, el kit de la invención comprende (i) reactivos para determinar al menos dos de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, y (ii) reactivos para determinar al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

Además, en una realización particular específica, el kit de la invención comprende además (i) reactivos para determinar al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o al menos 12 de los biomarcadores enumerados en la tabla 1, excepto apolipoproteína A-I, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, y (ii) reactivos para determinar al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

Alternativamente, en una realización particular específica, el kit de la invención comprende además (i) reactivos para determinar todos los biomarcadores enumerados en la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I, y (ii) reactivos para

determinar al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig sérica, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cualquier combinación de los mismos.

5 En otra realización particular, el kit de la invención comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de (i) al menos dos biomarcadores de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 excepto apolipoproteína A-I,

en el que uno de dichos dos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, y (ii) al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo de biomarcadores que consiste en región C de cadena gamma-2 de Ig sérica, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y combinaciones de los mismos.

10 En otra realización particular, el kit de la invención comprende reactivos para determinar el nivel de expresión de una combinación de biomarcadores, en el que dicha combinación de biomarcadores comprende:

- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, región C de cadena gamma-2 de Ig, apolipoproteína L1 y C4A del complemento;
- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina;
- 15 - los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, serotransferrina, apolipoproteína L1, región C de cadena gamma-2 de Ig y C4A del complemento;
- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, apolipoproteína L1, región C de cadena gamma-2 de Ig y C3 del complemento;
- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, serotransferrina y C4A del complemento;
- 20 - los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento y serotransferrina o
- los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1, albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico.

25 La presente divulgación describe además un método de diagnóstico que incluye la determinación del nivel de expresión de una combinación o panel de biomarcadores, en el que dicha combinación de biomarcadores comprende

- los biomarcadores C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A1, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1, albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig y componente P de amiloide sérico;
- 30 - los biomarcadores albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico;
- los biomarcadores albúmina sérica, antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina y apolipoproteína L1;
- 35 - los biomarcadores región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina;
- los biomarcadores antitrombina-III, región C de cadena gamma-2 de Ig, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina;
- 40 - los biomarcadores C3 del complemento, antitrombina-III, serotransferrina y apolipoproteína L1; o
- los biomarcadores C3 del complemento, antitrombina-III, componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina.

45 En una realización particular del kit de la invención, los reactivos para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores son, preferiblemente, anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se unen específicamente a dichos biomarcadores.

En todas las realizaciones de los kits mencionados anteriormente, dichos reactivos para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores adicionales son, preferiblemente, anticuerpos o fragmentos de los mismos, que se

unen específicamente a dicho biomarcador adicional.

Los anticuerpos, o fragmentos de los mismos, del kit de la invención pueden usarse según técnicas conocidas en la técnica para determinar niveles de expresión de proteínas tales como, por ejemplo, citometría de flujo, inmunotransferencia de tipo Western, ELISA, RIA, EIA competitivo, DAS-ELISA, técnicas basadas en el uso de biochips, microalineamientos de proteínas, ensayos de precipitación coloidal en tiras reactivas o ensayos múltiplex basados en puntos cuánticos ligados a anticuerpos. En una realización particular, el kit de la invención puede usarse para determinar el nivel de expresión de los biomarcadores por medio de monitorización de reacciones múltiples (MRM) en un enfoque de espectrometría de masas en tándem cuantitativa.

Los anticuerpos pueden fijarse a un soporte sólido tal como una membrana, un plástico o un vidrio, opcionalmente tratados para facilitar la fijación de dichos anticuerpos al soporte. Dicho soporte sólido puede comprender, al menos, un conjunto de anticuerpos que reconocen específicamente el primer panel de biomarcadores y al menos un biomarcador del segundo panel de biomarcadores y que pueden usarse para detectar los niveles de expresión de dicho biomarcador.

Además, los kits de la invención pueden comprender reactivos para detectar proteínas de control. La disponibilidad de dichos reactivos adicionales permite normalizar las mediciones realizadas en diferentes muestras, por ejemplo, la muestra que va a analizarse y la muestra de control, para descartar que las diferencias en la expresión de los biomarcadores se deban a una cantidad diferente de cantidad de proteína total en la muestra más que a las diferencias reales en los niveles relativos de expresión. Las proteínas de control útiles para los kits de la presente invención son proteínas cuyos niveles de expresión no se ven afectados por el glaucoma, por ejemplo, la albúmina sérica.

En una realización preferida, los reactivos para someter a ensayo los niveles de los diferentes biomarcadores comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de reactivos para someter a ensayo los biomarcadores que forman el kit. Por tanto, en el caso particular de los kits que comprenden reactivos para someter a ensayo los niveles de apolipoproteína A-IV, C3 del complemento y serotransferrina, los reactivos específicos para dichos biomarcadores, por ejemplo anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos (es decir, fragmentos de anticuerpos que tienen la capacidad de reconocer el antígeno correspondiente), que se unen específicamente a apolipoproteína A-IV, C3 del complemento y serotransferrina, respectivamente) comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, presentes en el kit. Además, en el caso particular de kits que comprenden reactivos para someter a ensayo los niveles de apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, región de cadena C de gamma-2 de Ig y apolipoproteína L1, los reactivos específicos para dichos biomarcadores, por ejemplo anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, que se unen específicamente a apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, región C de cadena gamma-2 de Ig y la apolipoproteína L1, comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, presentes en el kit. Además, en el caso particular de kits que comprenden reactivos para someter a ensayo los niveles de apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, C3 del complemento, componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina, los reactivos específicos para dichos biomarcadores, por ejemplo anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, que se unen específicamente a apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, C3 del complemento, componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina, comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, presentes en el kit. Además, en el caso particular de kits que comprenden reactivos para someter a ensayo los niveles de apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, C3 del complemento, serotransferrina, apolipoproteína L1 y región C de cadena gamma-2 de Ig, los reactivos específicos para dichos biomarcadores, por ejemplo anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos que se unen específicamente a apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, C3 del complemento, serotransferrina, la apolipoproteína L1 y región C de cadena gamma-2 de Ig, comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, presentes en el kit. Además, en el caso particular de kits que comprenden reactivos para someter a ensayo los niveles de apolipoproteína A-IV, C4A del complemento y todos los biomarcadores de la tabla 1, los reactivos específicos para dichos biomarcadores, por ejemplo anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos que se unen específicamente a apolipoproteína A-IV, C4A del complemento y todos los biomarcadores de la tabla 1, comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total de anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, presentes en el kit. Además, en el caso particular de kits que comprenden reactivos para someter a ensayo los niveles de cualquiera del panel o la combinación de biomarcadores mencionados anteriormente, los reactivos específicos para dichos biomarcadores, por ejemplo, anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos que se unen específicamente a los biomarcadores de dicho panel o combinación de biomarcadores, comprenden al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90% o al menos el 100% de la cantidad total

de anticuerpos, o fragmentos funcionales de los mismos, presentes en el kit.

El kit de la invención es particularmente útil para el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de GPAA y GPEX. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere al uso de un kit que comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores enumerados en la tabla 1, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, para el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación, en el que el reactivo para determinar el nivel de expresión se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo, un aptámero, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína biomarcadora; y (b) un reactivo adecuado para determinar el nivel de expresión del biomarcador por medio de un ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), siendo dicho reactivo un péptido marcado con isótopos que puede obtenerse mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC. En una realización particular, dicho reactivo es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une específicamente a dicho biomarcador.

Dicho de otro modo, la invención se refiere a un kit que comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores enumerados en la tabla 1, en el que al menos uno de dichos biomarcadores de la tabla 1 es apolipoproteína A-IV, para uso en el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de GPAA y GPEX, en el que el reactivo para determinar el nivel de expresión se selecciona del grupo que consiste en: (a) un anticuerpo, un aptámero, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína biomarcadora; y (b) un reactivo adecuado para determinar el nivel de expresión del biomarcador por medio de un ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), siendo dicho reactivo un péptido marcado con isótopos que puede obtenerse mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC. En una realización particular, dicho reactivo es un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une específicamente a dicho biomarcador.

El siguiente ejemplo se incluye con fines ilustrativos, no limitativos.

EJEMPLO 1

Biomarcadores basados en proteómica diferenciales en suero de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación

1. MÉTODOS

Diseño del estudio

El flujo de trabajo del presente estudio consistió en dos fases:

- Fase 1 (descubrimiento) que incluye la población del estudio, recogida de muestras, preparación de muestras de suero, análisis mediante 2D-DIGE, adquisición de imágenes y análisis de datos e identificación de proteínas; y
- Fase 2 (validación) que incluye la validación de biomarcadores mediante análisis por ELISA y generación de modelos predictivos multivariantes.

Cada etapa se describe con detalle por separado.

Fase 1 - Descubrimiento; esta fase incluyó:

i) Población de estudio. Se examinaron casos de GPAA, GPEX y de control y se seleccionaron a través del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega (IOFV) y se clasificaron según su edad y sexo;

ii) Recogida de muestras. Se extrajeron muestras de sangre de cada participante, y se separaron los sueros de los factores de coagulación y las células sanguíneas mediante centrifugación;

iii) Preparación de muestras de suero. Se sometieron muestras de suero a ecualización de proteínas usando ProteoMiner para reducir el rango dinámico de las proteínas altamente abundantes;

iv) 2D-DIGE. Se llevó a cabo el marcaje de proteínas séricas *in vitro* con colorantes de cianina (CyDye) (Cy2, Cy3, Cy5), y se separaron las proteínas mediante 2D-DIGE;

v) Adquisición de imágenes y análisis de datos. Se barrieron los geles y se realizó el análisis de imágenes con el software Progenesis SameSpots; y

vi) Identificación de proteínas. Se aislaron manchas de proteína y se llevó a cabo su identificación mediante MALDI TOF/TOF y nCL-EM/EM.

Fase 2 - Validación; esta fase incluyó:

5 vii) Validación de biomarcadores. Se realizó la determinación cuantitativa de la naturaleza discriminadora de las proteínas identificadas como posibles biomarcadores a través del análisis de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimática (ELISA) disponible individualmente. Se llevaron a cabo ensayos con algunas de las mismas muestras incluidas en la fase uno de este estudio, así como en los nuevos casos de GPAA, GPEX y de control; y

10 viii) Modelos predictivos univariantes y multivariantes. Una vez que se cuantificó la naturaleza discriminadora de los biomarcadores, se usaron sus concentraciones para construir modelos predictivos multivariantes capaces de segregar los casos de GPAA, GPEX y de control con el mejor poder de discriminación.

Población del estudio

15 El estudio se adhiere a los principios de la Declaración de Helsinki, y se obtuvo la aprobación ética completa del Comité de Ética de Investigación Clínica en el Hospital Universitario Central de Asturias (Oviedo, España). Todos los pacientes incluidos en este estudio fueron reclutados, firmaron un consentimiento informado y se les realizó exámenes oftalmológicos completos en el IOFV. Se reclutó un total de 202 pacientes en este estudio. En la fase de descubrimiento, se incluyeron 53 pacientes con GPAA, 45 con GPEX y 51 de control (n = 149, véase la tabla 2).

Tabla 2

Detalles demográficos de los grupos de control, GPAA y GPEX involucrados en la fase de descubrimiento

	Estado patológico		
	Control (n = 51)	GPAA (n = 53)	GPEX (n = 45)
Edad, a			
Media ± DE ^a	64,93 ± 11,34	67,46 ± 11,27	73,11 ± 8,43
Intervalo	43 - 87	35 - 89	55 - 92
valor de p frente a control ^b	-	0,3054	0,0001
valor de p frente a GPAA ^b	-	-	0,0049
Sexo			
Hombres, n (edad media ± DE) ^a	24 (64,67 ± 9,33)	29 (65,00 ± 11,17)	22 (73,09 ± 8,16)
Mujeres, n (edad media ± DE) ^a	27 (65,19 ± 13,05)	24 (69,92 ± 11,03)	23 (73,13 ± 8,87)

^aLos datos se muestran como promedio ± desviación estándar

^bSe calculan los valores de p entre cada par de grupos usando la prueba de la t para datos independientes con corrección de Welch.

20 En la fase de validación, se incluyeron 30 pacientes con GPAA, 29 con GPEX y 29 de control (n = 88), de los cuales también se incorporaron 10 con GPAA, 15 con GPEX y 10 de control en la fase de descubrimiento (véase la tabla 3).

Tabla 3

Detalles demográficos de los grupos de control, GPAA y GPEX usados para los ensayos ELISA

	Estado patológico		
	Control (n = 29)	GPAA (n = 30)	GPEX (n = 29)
Edad, a			
Media ± DE ^a	64,45 ± 12,39	69,30 ± 9,00	73,48 ± 6,74
Intervalo	48 - 92	48 - 84	56 - 92
valor de p frente a control ^b	-	0,0922	0,0013
valor de p frente a GPAA ^b	-	-	0,0479
Sexo			
Hombres, n (edad media ± DE) ^a	14 (64,07 ± 13,90)	16 (69,06 ± 7,86)	16 (74,69 ± 7,19)
Mujeres, n (edad media ± DE) ^a	15 (64,80 ± 11,28)	14 (69,57 ± 10,45)	13 (72,00 ± 6,10)

^aLos datos se muestran como promedio ± desviación estándar

^bSe calculan los valores de *p* entre cada par de grupos usando la prueba de la *t* para datos independientes con corrección de Welch.

El criterio de diagnóstico para el glaucoma, tanto primario de ángulo abierto como de pseudoexfoliación, fue la presencia de daño característico del disco óptico (por ejemplo, una razón excavación/disco vertical > 0,3, anillo neuroretiniano delgado o con muescas, o hemorragia de disco) con los cambios característicos correspondiente en el campo visual y la presencia de ángulo abierto de la cámara anterior (grado III o IV de Shaffer). Los pacientes con GPAA no presentaron causas secundarias de neuropatía óptica, mientras que los sujetos con GPEX mostraron material exfoliativo característico en la superficie anterior del cristalino y/o iris durante el examen con lámpara de hendidura, en uno o ambos ojos. Se seleccionaron los sujetos de control de pacientes sometidos a cirugía de cataratas. Cabe destacar que la mayoría de los pacientes con glaucoma también tenían cataratas (el 90,4% y el 94,9% de los sujetos con GPAA y con GPEX, respectivamente). Ningún sujeto involucrado en este estudio presentó otras patologías oculares relevantes, tales como inflamación, infección, retinopatías o maculopatías clínicamente detectables.

Recogida de muestras

Se recogió sangre en tubos de 5 ml de activador de coagulación con separador de suero Z recubiertos con partículas de sílice microscópicas, lo que activa el proceso de coagulación (Vacuette, Madrid, España). Se centrifugaron los tubos a 1.800 g durante 18 min a 4°C, y se almacenó el sobrenadante (suero) a -80°C hasta su uso. Se recogió sangre de los grupos de glaucoma y de control y se procesó de manera idéntica.

Preparación y cuantificación de muestras de suero.

Dado que la concentración de proteínas en las muestras de suero es muy alta (60-80 mg/ml), y aproximadamente el 95% de todo el contenido de proteína está representado por catorce proteínas (un alto rango dinámico), se introdujo una etapa preliminar antes de 2D-DIGE conocida como "ecualización". La ecualización incluyó el kit de pequeña capacidad ProteoMiner™ (BioRad Laboratories, Hercules, CA, EE.UU.), que aumenta la representación (es decir, la concentración) de las proteínas dentro de los rangos dinámicos medio y bajo. Por tanto, en lugar de agotar las proteínas altamente abundantes, el enfoque de ProteoMiner reduce el rango dinámico al ecualizar sus concentraciones con las de las proteínas más escasas. El kit ProteoMiner se basa en una tecnología que usa una biblioteca combinatorio de ligandos de 10^9 - 10^{12} ligandos de hexapéptidos degenerados de forma única, cada uno de los cuales se une a una perla de resina. Se espera que cada proteína en la muestra de suero tenga la misma probabilidad de unirse a su perla de resina/ligando de hexapéptido único presente en el ProteoMiner y, por tanto, quede retenido. Por tanto, cada ligando puede unirse a una proteína o complejo proteico único. Dado que el número de ligandos de hexapéptidos representados en el kit ProteoMiner para cada proteína es el mismo, las proteínas más abundantes saturarán rápidamente sus ligandos de hexapéptidos únicos y se eliminará el exceso de proteínas no unidas. En condiciones de saturación (es decir, > 10 mg de proteína por muestra/separación cromatográfica), y siguiendo el protocolo del fabricante del kit ProteoMiner, se reducen las concentraciones de proteínas abundantes en muestras de suero mientras que se enriquecen las proteínas menos concentradas.

Tras la ecualización, se precipitaron las proteínas séricas para retirar los lípidos con el kit CleanUp (GE Healthcare, Sunnyvale, CA, EE.UU.), se solubilizaron en 30 μ l de disolución de enfoque (Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, tiourea 2 M, urea 7 M y CHAPS al 4% (1-propanosulfonato de 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio])) compatible con DIGE (electroforesis diferencial en gel) y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Se determinó la concentración de proteína en cada muestra de suero antes de su fraccionamiento a través de ProteoMiner, según el método de Bradford, y tras ecualización, mediante el kit de cuantificación de proteínas EZQ (Invitrogen Dynal AS, Oslo, Noruega).

2D - DIGE para el descubrimiento de biomarcadores

En el presente estudio, se usó 2D-DIGE para identificar cambios en las concentraciones de proteínas entre muestras de suero ecualizadas de pacientes con GPAA, con GPEX y de control. Se hicieron correr tres muestras diferentes juntas en un gel. Se marcaron las proteínas en cada muestra con distintos colorantes fluorescentes: Cy2, Cy3 y Cy5. Las proteínas marcadas con Cy2 correspondieron a un patrón interno (véase a continuación), que se incluyó en cada gel de 2D-DIGE que se hizo correr. Las otras dos muestras en cada gel correspondieron a suero ecualizado de pacientes con GPAA, con GPEX o de control, y se marcaron con Cy3 o Cy5. Este enfoque redujo aproximadamente a la mitad el número total de geles 2D necesarios en comparación con el método de electroforesis en gel bidimensional convencional. Se hicieron correr y analizaron un total de 75 geles (es decir, 2D-DIGE).

El patrón interno se generó mezclando cantidades equimolares de cada una de las muestras de suero ecualizadas incluidas en este estudio (es decir, 149). El conjunto de proteínas en este patrón interno se marcó mínimamente con Cy2 usando CyDye, según el protocolo del fabricante (GE Healthcare, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Las proteínas en las otras dos muestras (sueros ecualizados) se marcaron con o bien Cy3 o bien Cy5 a un pH de 8-9. El patrón interno se usó para normalizar las diferencias en la carga de proteína, las variaciones de un gel a otro, así como para ayudar en la alineación de las imágenes barridas. En estas condiciones, la abundancia de cada proteína en cada

muestra podía normalizarse en relación con el patrón interno. Debido a que las propiedades espectrales de Cy2, Cy3 y Cy5 no son idénticas, se introdujo una *etapa de volteo de compensación*, para que las proteínas marcadas con Cy3 y Cy5 de las muestras de cada grupo en estudio (es decir, Cy3-GPAA y Cy5-GPEX; Cy3-GPEX y Cy5-GPAA; Cy3-GPAA y Cy5-Control; Cy3-Control y Cy5-GPAA ; Cy3-GPEX y Cy5-Control; Cy3-Control y Cy5-GPEX) estuviesen representadas en números aproximadamente iguales.

Se realizó el marcaje de las proteínas mediante la adición de 400 pmol del CyDye requerido por 50 µg de proteína en 1 µl de N,N-dimetilformamida anhidra. Se llevó a cabo la reacción de marcaje durante 30 min en hielo y en la oscuridad, y se añadió 1 µl de lisina 10 mM (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) durante 10 min para terminar la reacción. Antes de la separación en gel 2D, se reunieron las tres muestras marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 y se mezclaron con tampón de rehidratación [Tris-HCl 30 mM, pH 8,5, tiourea 2 M, urea 7 M y CHAPS al 4%, ditiotreitól (DTT) 20 mM y anfolito transportador al 0,25%, pH 4-7 (Bio-lyte; Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.)]. Posteriormente se aplicaron las muestras a tiras con gradiente de pH inmovilizadas (24 cm, pH 4-7) y se enfocaron en una celda de isoelectroenfoque Protean (BioRad, Malvern, Pensilvania, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se equilibraron las tiras enfocadas, durante 15 min con tampón 1 (urea 6 M, Tris-HCl 0,375 M, SDS al 2%, glicerol al 20%) complementado con DTT al 2% (p/v), y luego se incubaron posteriormente otros 15 min con tampón 1 complementado con yodoacetamida al 2,5% (p/v).

Se llevó a cabo la separación de segunda dimensión mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) en geles de poliácridamida al 12,5% grandes usando el sistema de electroforesis DALT-SIX (GE Healthcare, Sunnyvale, CA, EE.UU.) según protocolos convencionales. Todos los procedimientos de electroforesis (marcaje, separaciones mono y bidimensionales) se realizaron en la oscuridad.

Adquisición de imágenes y análisis de datos.

Se tomaron imágenes de proteínas marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 después de la separación de proteínas en cada gel (es decir, 75 geles de 2D-DIGE) tras excitación a las longitudes de onda de 488, 532 y 633 nm mientras se capturaba la señal de emisión a 530, 605 y 695 nm, respectivamente, usando un sistema de obtención de imágenes VersaDoc (BioRad, Malvern, Pensilvania, EE.UU.). Se barrieron los geles usando 180 segundos de exposición a la luz para cada uno de los canales.

El análisis de imagen de las proteínas marcadas con Cy2, Cy3 y Cy5 en cada gel se realizó con el software *Progenesis SameSpots*, versión 4.0 (NonLinear Dynamics Limited, Newcastle, R.U.). La variación en la abundancia de proteínas (manchas) entre los grupos (es decir, GPAA, GPEX y controles) se determinó mediante el método de análisis de significación de microalineamientos (SAM, por sus siglas en inglés) (Quigley HA, 2006, J Ophthalmol 90(3): 262-7), usando volúmenes de "mancha" normalizados (obtenidos a partir del software Progenesis SameSpots) con un valor de punto de corte de tasa de descubrimientos falsos de 0,01.

Análisis mediante espectrometría de masas

Para identificar las manchas de proteína mediante espectrometría de masas (EM), los inventores primero tuvieron que aislarlas. Se realizó la separación con un gel preparativo de SDS al 12,5%, en el que se cargaron y se tiñeron con SYPRO Ruby 400 µg de proteína de una muestra reunida, que incluía una cantidad equimolar de todas las muestras analizadas en el presente estudio (BioRad, Malvern, Pensilvania, EE.UU.). Se cortaron robóticamente las manchas de proteína con un poder estadístico significativo con un robot Ettan Spot Picker (GE Healthcare) del gel preparativo y se sometieron a digestión con tripsina en gel según Shevchenko (Quigley HA, 2006, J Ophthalmol 90(3): 262-7), con las siguientes modificaciones menores. Se redujeron los trozos de gel con 30 µl de DTT 10 mM a 56°C durante 20 min, seguido de alquilación en 30 µl de yodoacetamida 50 mM a temperatura ambiente durante 20 min en la oscuridad. A continuación, las manchas se hincharon en un baño de hielo con un tampón de digestión que contenía bicarbonato de amonio 50 mM y 12,5 ng/µl de tripsina (Roche Diagnostics, tripsina de calidad proteómica, recombinante, Penzberg, Alemania). Después de 30 min, se retiró el sobrenadante y se desechó, se añadieron 20 µl de bicarbonato de amonio 50 mM al trozo de gel, y se permitió que avanzara la digestión a 37°C durante la noche. Después de la tripsinización, se transfirió el sobrenadante a un tubo Eppendorf y se acidificó con ácido trifluoroacético al 0,1%.

Identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF

Se realizó el análisis mediante MALDI-EM con un espectrómetro de masas MALDI-LIFT-TOF AUTOFLEX III SmartBeam (Bruker Daltonics). Cada muestra digerida se cargó (1 µl) en un objetivo (acero rectificado Bruker 384) con 1 µl de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico. Se realizaron adquisiciones de EM dependientes de los datos con un estado de carga de 1 en un intervalo de relación masa-carga de 500-4000. Se realizó la ionización con un láser de estado sólido con una longitud de onda de 360 nm y una frecuencia de 200 Hz. Se variaron las energías de intensidad del láser según el análisis requerido. Para EM, se usó el 30-50% de la intensidad, mientras que alrededor del 90% para EM/EM. La resolución siempre fue superior a 7500 en todos los intervalos de ventana de masa para el análisis mediante EM. La adquisición de datos se realizó manualmente. Rutinariamente se recogieron 1400 barridos para la huella de masa peptídica (PMF, por sus siglas en inglés), mientras que se seleccionaron los picos más intensos para EM/EM (400 barridos para la selección parental y 1600 barridos para fragmentos). Se procesaron los

espectros obtenidos usando los softwares Flex Analysis 3.0 y Biotoools 3.2 (Bruker Daltonics). Se realizó una búsqueda en bases de datos usando MASCOT 2.2 (Matrixscience, Londres, R.U.) frente a la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (versión SwissProt 2011_08; 531.473 entradas de secuencias). Se adoptaron los siguientes parámetros para la identificación de proteínas: carbamidometilación de cisteínas como modificación fija, oxidación de metioninas como modificación variable, 50 ppm de tolerancia de masa peptídica, 0,7 Da de tolerancia de masa de fragmento y hasta dos puntos de escisión que faltan. La calibración se realizó externamente, con Pepmix (Bruker Daltonics), e internamente con péptidos de tripsina, cuando fue posible.

Identificación de proteínas mediante nCL-EM/EM

Se preconcentraron y desalaron péptidos trípticos usando una precolumna Symmetry C18 (180 μm x 20 mm, tamaño de partícula de 5 μm , Waters) seguido de elución en una columna BEH C130 (75 μm x 200 mm, tamaño de partícula de 1,7 μm , Waters) usando dos disolventes, A (ácido fórmico al 0,1%) y B (ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo), con un gradiente lineal de disolvente B de desde el 3% hasta el 50% en 50 min. Todas las ejecuciones de cromatografía de líquidos de alta resolución se realizaron usando un sistema Waters nanoACQUITY nHPLC (Waters) con una velocidad de flujo constante de 300 nl/min. Se barrieron y fragmentaron los péptidos de elución con un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de nanoelectropulverización Proxeon. Se usó una tensión de electropulverización de 1,6 kV y una tensión de capilar de 40 V a 280°C. Se realizaron barridos de consulta que oscilaron entre 400 y 2000 de relación masa-carga en el analizador Orbitrap (30000 de FWHM). La fragmentación de EM/EM y la medición de los seis iones más intensos se realizaron mediante disociación inducida por colisión en la trampa de iones lineal LTQ. La energía de colisión normalizada se estableció en el 35%. Se realizaron búsquedas usando el software Proteome Discoverer 1.3 (Thermo Fisher Scientific) y el motor de búsqueda Mascot. Se permitió una tolerancia de 5 ppm para la búsqueda de precursores, mientras que se analizaron los fragmentos con una tolerancia de 0,5 Da. La carbamidometilación de cisteínas se consideró como modificación fija y la oxidación de metionina se consideró como modificación variable. Se permitió que faltasen dos escisiones para la digestión tríptica. Se buscaron espectros en todas las entradas de la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot y proteínas con al menos dos péptidos identificados ($p < 0,05$) se consideraron coincidencias significativas.

Validación de biomarcadores candidatos y análisis de datos.

Se realizó la validación de los marcadores proteicos en suero de pacientes con GPAA, con GPEX y de control en un total de 88 muestras, de las cuales 35 se incluyeron en la fase 1 (10 con GPAA, 15 con GPEX y 10 de control) y 53 provenían de casos recién diagnosticados (20 con GPAA, 14 con GPEX y 19 de control) (véase la tabla 3). Se llevaron a cabo ensayos ELISA de tipo sándwich con las 17 proteínas más significativas de un total de 35 candidatos identificados mediante análisis de 2D-DIGE y EM. Los kits de ELISA se adquirieron de USCN Life Science Inc. (Wuhan, China) para las siguientes proteínas: CFH, C3, FBLN1, ALB, ITIH4, TF, APOA1, VTN, APOA4, IGHG2, APCS, APOL1, FCN3, SERPINA1, TTR. Se adquirió un kit de ELISA para C4A de BD Biosciences (San José, CA, EE.UU.). Se obtuvo un kit de ELISA para SERPINC1 de AssayPro LLC (St. Charles, MO, EE.UU.). Todos los ensayos ELISA se realizaron siguiendo las instrucciones descritas por los fabricantes.

Las concentraciones de cada una de las 17 proteínas en los distintos grupos de muestra (es decir, con GPAA, con GPEX y de control) se determinaron mediante ELISA y se expresaron con respecto al volumen sérico. La sustracción del subconjunto de características se realizó mediante análisis discriminante por pasos usando el paquete 'candisc' en el software R (<http://www.r-project.org/>), y se aplicaron varias herramientas estadísticas basadas en enfoques de *aprendizaje automático* para evaluar qué método proporcionaba la mejor precisión para la clasificación clínica correcta de muestras en función del panel seleccionado de marcadores proteicos. Estas herramientas incluyeron análisis de curva de característica operativa del receptor (ROC, por sus siglas en inglés) para cada uno de los marcadores, algoritmos de clasificador bayesiano ingenuo (NB, por sus siglas en inglés), k vecinos más próximos (kNN, por sus siglas en inglés), bosques aleatorios (RF, por sus siglas en inglés), árboles de clasificación y un conjunto de algoritmos de clasificador bayesiano ingenuo y máquinas de vectores de soporte (AdaBoost.M1). Se entrenó cada algoritmo mediante el panel de biomarcadores. Para evaluar el rendimiento del alumno, se llevó a cabo un muestreo aleatorio 5 veces con el 75% de las muestras como conjunto de entrenamiento y el 25% restante como conjunto de prueba. Se llevaron a cabo análisis estadísticos usando el software Orange Canvas v2.6 (<http://orange.biolab.si>).

2. RESULTADOS

Características de los sujetos

En la fase 1 (descubrimiento), la edad media (\pm DE) de los participantes en los grupos de GPAA ($n = 53$) y de control ($n = 51$) fue comparable ($67,46 \pm 11,27$ años para pacientes con GPAA en comparación con $64,93 \pm 11,34$ años para los controles, respectivamente; $p > 0,05$). La edad media en el grupo de GPEX ($n = 45$; $73,11 \pm 8,43$ años) fue ligeramente mayor que la de los grupos de GPAA ($p < 0,05$) y de control ($p < 0,001$). Por sexo, el número de hombres y mujeres en cada grupo, así como sus edades medias, fueron similares (tabla 2).

En la fase 2 (validación), la edad media (\pm desviación estándar (DE)) de los participantes de pacientes con GPAA (n

= 30) y de control (n = 29) fue comparable (69,30 ± 9,00 años para GPAA, en comparación con 64,45 ± 12,39 años para el control, respectivamente; $p > 0,05$) La edad media del grupo de GPEX (n = 29; 73,48 ± 6,74 años) fue ligeramente mayor que la de los grupos de GPAA ($p < 0,05$) y de control ($p < 0,01$) grupos. Por sexo, el número de hombres y mujeres en cada grupo, así como sus edades medias, fueron similares (tabla 3).

5 Análisis mediante 2D-DIGE de proteoma sérico

Se necesitaron un total de 75 geles (2D-DIGE) para analizar 149 muestras de suero ecualizadas (53 con GPAA, 45 con GPEX, 51 de control) tal como se describe en Materiales y métodos. Se separaron las proteínas en la primera dimensión a lo largo de un intervalo de punto isoeléctrico (pI) de 4 a 7, y en la segunda dimensión entre masas moleculares de 10 kDa y 150 kDa. Para evitar un sesgo de marcaje de las proteínas en cada muestra con Cy3 o Cy5, se aplicó un diseño de *volteo de colorante*. Después de deformar satisfactoriamente los geles e importar sus imágenes en el programa Progenesis SameSpots, se obtuvo un mapa de proteínas séricas ecualizadas para cada muestra. Se detectaron un total de 823 manchas de proteína usando el software del sistema de obtención de imágenes VersaDoc. Después de la normalización de los volúmenes de mancha (área x intensidad), se expresaron los datos en notación matricial y se filtraron por medio de un valor de corte de tasa de descubrimientos falsos de 0,01 (valor de $q < 0,01$), que dio como resultado 214 manchas significativas. Las manchas de proteína que presentaron alteraciones significativas en las veces de cambio en la expresión entre casos de GPAA o GPEX y de control se clasificaron de mayor a menor poder de discriminación, en función de sus valores de ReliefF, ganancia de información y razón de ganancia. Se seleccionó un total de 149 manchas de proteína que presentaron cambios significativos en la abundancia con fines de identificación al especificar un umbral de razón de ganancia $\geq 0,05$, y posteriormente se clasificaron según sus valores de ID de mancha, ReliefF, ganancia de información y razón de ganancia.

Identificación de la mayoría de las proteínas expresadas de manera diferencial

Las 149 manchas de proteína mencionados anteriormente se cortaron de un gel de 2D-PAGE preparativa, y se sometieron a digestión con tripsina en gel y análisis mediante MALDI-TOF/TOF o nCL-EM/EM para su identificación, tal como se describe en Materiales y métodos. Se estableció la identidad de proteínas de 118 manchas del total de 149 manchas de proteína, lo que dio como resultado la identificación de 35 proteínas distintas. Catorce de estas proteínas estaban presentes en manchas únicas, mientras que el resto se encontraban en dos o más manchas. Estas últimas manchas podían ser el resultado de modificaciones postraduccionales incluyendo escisiones proteolíticas de proteínas específicas. Diez manchas de proteína permanecen sin identificar, debido lo más probablemente a su baja concentración. Veintiuna manchas de proteína se identificaron como queratinas humanas, que son proteínas no séricas, y no se tuvieron en cuenta ni se incluyeron para un análisis adicional porque probablemente representan contaminantes de la manipulación del gel. La tabla 4 muestra la lista de las 35 proteínas distintas identificadas mediante 2D-DIGE expresadas de manera diferencial entre los tres grupos de muestra y clasificadas por significación estadística de mayor a menor.

35 Tabla 4

Lista de las 35 proteínas expresadas de manera diferencial en pacientes con glaucoma en comparación con los controles, clasificadas en orden descendente de significación

Clasificación de discriminación	Número de registro UniProt	Nombre de la proteína	Nombre del gen
1	P08603	Factor H del complemento	CFH
2	P23142	Fibulina-1	FBLN1
3	P01024	C3 del complemento	C3
4	Q14624	Cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina	ITIH4
5	P01008	Antitrombina-III	SERPINC1
6	P02787	Serotransferrina	TF
7	P02768	Albumina sérica	ALB
8	P04004	Vitronectina	VTN
9	P01859	Región C de cadena gamma-2 de Ig	IGHG2
10	P02743	Componente P de amiloide sérico	APCS
11	P01009	Alfa-1-antitripsina	SERPINA1
12	P06727	Apolipoproteína A-IV	APOA4
13	O14791	Apolipoproteína L1	APOL1
14	P0C0L4	C4-A del complemento	C4A
15	O75636	Ficolina-3	FCN3
16	P02647	Apolipoproteína A-I	APOA1

ES 2 759 026 T3

17	P02766	Transtiretina	TTR
18	P27169	Paraoxonasa sérica/arilesterasa 1	PON1
19	Q15485	Ficolina-2	FCN2
20	Q03591	Proteína 1 relacionada con factor H del complemento	CFHR1
21	P02748	Componente C9 del complemento	C9
22	P22352	Glutación peroxidasa 3	GPX3
23	P01860	Región C de cadena gamma-3 de Ig	IGHG3
24	Q9BXR6	Proteína 5 relacionada con factor H del complemento	CFHR5
25	Q6UX53	Proteína 7B de tipo metiltransferasa	METTL7B
26	P02774	Proteína de unión a vitamina D	GC
27	P06681	C2 del complemento	C2
28	P19823	Cadena pesada H2 de inhibidor de inter-alfa-tripsina	ITIH2
29	P00734	Protrombina	F2
30	P02649	Apolipoproteína E	APOE
31	P02741	Proteína C reactiva	CRP
32	P10909	Clusterina	CLU
33	P01871	Región C de cadena mu de Ig	IGHM
34	P01834	Región C de cadena kappa de Ig	IGKC
35	O00187	Lectina serina proteasa 2 de unión a manano	MASP2

Validación de biomarcadores candidatos: mediante análisis ELISA

Las proteínas séricas diferenciales identificadas mediante la proteómica de 2D-DIGE se validaron mediante ensayos ELISA de las 17 primeras de las 35 proteínas clasificadas que se muestran en la tabla 4. Los resultados de ELISA se muestran en la tabla 5.

Tabla 5

Concentraciones de 17 proteínas expresadas de manera diferencial (en miligramos) con respecto al volumen sérico (en dl) obtenidas por análisis ELISA. Los valores de *p* se obtuvieron mediante la prueba de Kruskal-Wallis

Nombre del gen	Grupo de GPAA mg/dl	Grupo de GPEX mg/dl	Grupo de control mg/dl	CAMBIO EN VECES		Prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico)	
				GPAA frente a control	GPEX frente a control	GPAA frente a control	GPEX frente a control
APOA4	9,95 ± 3,72	6,10 ± 1,65	3,81 ± 1,17	2,6	1,6	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
C3	437,25 ± 97,62	333,15 ± 49,77	285,54 ± 45,38	1,5	1,2	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
TF	477,95 ± 162,65	303,78 ± 61,54	258,77 ± 55,34	1,8	1,2	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
VTN	117,39 ± 43,48	73,92 ± 25,42	51,86 ± 14,90	2,3	1,4	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,01
TTR	169,80 ± 61,84	111,12 ± 40,03	84,08 ± 25,70	2,0	1,3	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,001
SERPINA1	296,12 ± 63,42	254,45 ± 57,39	198,33 ± 55,71	1,5	1,3	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> > 0,05
FBLN1	29,33 ± 9,50	21,94 ± 8,09	14,71 ± 5,26	2,0	1,5	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,05
APOA1	259,33 ± 59,32	212,32 ± 39,07	182,26 ± 34,42	1,4	1,2	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,05
FCN3	117,14 ± 26,51	92,54 ± 22,56	85,31 ± 19,56	1,4	1,1	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,01
CFH	119,90 ± 26,84	107,81 ± 25,73	91,87 ± 30,46	1,3	1,2	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> > 0,05
ITIH4	614,22 ± 312,00	389,87 ± 196,29	352,53 ± 221,15	1,7	1,1	<i>p</i> < 0,01	<i>p</i> < 0,05
APOL1	9,01 ± 3,07	8,21 ± 2,76	6,05 ± 2,16	1,5	1,4	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> > 0,05
ALB	3339,11 ± 1021,24	3885,80 ± 913,34	3609,80 ± 908,36	0,9	1,1	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
SERPINC1	78,54 ± 10,40	79,45 ± 12,99	82,01 ± 12,72	1,0	1,0	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
IGHG2	770,19 ± 253,78	809,27 ± 290,21	1136,81 ± 354,62	0,7	0,7	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> > 0,05
C4A	0,16 ± 0,05	0,15 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,9	0,8	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
APCS	17,08 ± 12,13	19,20 ± 14,53	19,43 ± 12,96	0,9	1,0	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05

- Se presenta la concentración (mg de proteína/dL de suero) (valor medio \pm DE) hallada para cada una de las 17 proteínas sometidas a prueba en muestras de GPAA, GPEX y de control, así como sus valores de veces de cambio y de la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) entre grupos (es decir, GPAA/control, GPEX/control y GPAA/GPEX). Cuatro proteínas: ALB, SERPINC1, C4A y APCS, no presentaron diferencias significativas entre los tres grupos de muestra (es decir, GPAA, GPEX y control). El resto de las proteínas investigadas se encontraron en concentraciones mayores en casos de glaucoma (GPAA y/o GPEX) en comparación con el control, excepto en el caso de la proteína IGHG2, que mostró una menor concentración en los dos grupos de glaucoma en comparación con los controles.
- 5 Seis proteínas: APOA4, C3, TTR, VTN, FBLN1 y APOA1, se encontraron en mayores concentraciones (de 1,2 a 2,6 veces) en GPAA y GPEX en relación con los casos de control (es decir, GPAA frente a control, $p < 0,001$, GPEX frente a control: APOA4, $p < 0,001$; VTN y FBLN1, $p < 0,01$; C3, TTR y APOA1, $p < 0,05$). Estas concentraciones también se elevaron significativamente (de 1,2 a 1,6 veces) entre GPAA en comparación con los casos de GPEX (es decir, APOA4, C3 y TTR, $p < 0,001$; VTN $p < 0,01$; FBLN1 y APOA1 $p < 0,05$).
- 10 Las proteínas SERPINA1, CFH y APOL1 se encontraron en las mayores concentraciones (de 1,2 a 1,5 veces) en los casos de GPAA y GPEX en comparación con los controles (GPAA frente a control, $p < 0,001$, GPEX frente a control, SERPINA1, $p < 0,01$; CFH y APOL1, $p < 0,05$). Ninguna de estas tres últimas proteínas mostró diferencias significativas entre los grupos de GPAA y GPEX ($p > 0,05$).
- 15 Las proteínas TF, FCN3 e ITIH4 se encontraron en mayores concentraciones (de 1,4 a 1,8 veces) entre GPAA en relación con los casos de control (es decir, TF y FCN3, $p < 0,001$; ITIH4, $p < 0,01$). Estas concentraciones también estaban significativamente elevadas (de 1,3 a 1,6 veces entre GPAA en comparación con los casos de GPEX (es decir, TF, $p < 0,001$; FCN3, $p < 0,01$; ITIH4, $p < 0,05$), pero no se encontraron diferencias entre GPEX y el control ($p > 0,05$).
- 20 La proteína IGHG2 se encontró en menores concentraciones en los casos de GPAA (0,7 veces) y GPEX (0,7 veces) en comparación con los controles (GPAA, $p < 0,001$; GPEX $p < 0,01$). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de GPAA y GPEX ($p > 0,05$).
- 25

Modelos de aprendizaje automático

- Una vez que se hubo obtenido la concentración de cada proteína, se realizó el análisis de la curva ROC con cada uno de los marcadores individualmente por medio del algoritmo de aprendizaje automático de clasificador bayesiano ingenuo. Se llevaron a cabo estadísticas de aprendizaje automático usando el paquete estadístico Orange Canvas, versión 2.6 (<http://orange.biolab.si>). La tabla 6 muestra los datos obtenidos de asignación correcta (CA, *correct assignment*), sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC). El poder de discriminación para cada una de las proteínas se clasificó en función de sus valores de AUC, lo que indica la precisión de la prueba.
- 30
- Se realizó un análisis de curva ROC adicional por medio del algoritmo de aprendizaje automático de clasificador bayesiano ingenuo para algunas combinaciones particulares de biomarcadores. La tabla 7 muestra los datos de sensibilidad, especificidad y área bajo la curva (AUC) obtenidos para cada panel de biomarcadores. Curiosamente, los paneles 1, 4, 7, 8 muestran un excelente poder de discriminación entre el grupo de GPEX y el grupo de control; los paneles 2, 7, 8 y 14 muestran un excelente poder de discriminación entre el grupo de GPAA y el grupo de control; los paneles 5, 6, 7 y 8 muestran un excelente poder de discriminación entre el grupo de GPAA y el grupo de GPEX; y los paneles 3, 7, 8 y 13 muestran un excelente poder de discriminación entre el grupo de GPAA, el grupo de GPEX y el grupo de control.
- 35
- 40

Tabla 6

Resultados de la discriminación de potencia de biomarcadores individuales obtenidos con el algoritmo de clasificador bayesiano ingenuo en la clasificación de muestras de suero con GPAA, con GPEX y de control.

Nombre del gen	GPAA frente a GPEX frente a control			GPAA frente a control			GPEX frente a control			GPAA frente a GPEX						
	CA ^a	Sens. ^b	Espec. ^c	AUC ^d	CA	Sens.	Espec.	AUC	CA	Sens.	Espec.	AUC				
APOA4	0,70	0,93	0,93	0,89	0,95	0,93	0,97	0,99	0,90	0,93	0,86	0,89	64,0	0,63	0,65	0,77
C3	0,69	0,76	0,91	0,85	0,86	0,90	0,83	0,97	0,79	0,76	0,83	0,89	0,75	0,67	0,83	0,72
TF	0,72	0,90	0,86	0,85	0,88	0,93	0,83	0,97	0,84	0,90	0,79	0,84	0,71	0,57	0,86	0,72
VTN	0,65	0,90	0,85	0,80	0,91	0,93	0,90	0,96	0,76	0,79	0,72	0,86	0,61	0,47	0,76	0,68
TTR	0,65	0,83	0,85	0,81	0,85	0,83	0,87	0,95	0,79	0,83	0,76	0,79	0,69	0,63	0,76	0,70
SERPINA1	0,61	0,93	0,80	0,77	0,90	0,93	0,87	0,92	0,81	0,86	0,76	0,89	0,59	0,50	0,69	0,55
FBLN1	0,62	0,53	0,84	0,76	0,86	0,93	0,79	0,94	0,81	0,79	0,83	0,84	0,64	0,53	0,76	0,52
APOA1	0,59	0,76	0,78	0,75	0,78	0,79	0,77	0,88	0,74	0,76	0,72	0,85	0,59	0,40	0,79	0,53
FCN3	0,64	0,65	0,85	0,74	0,80	0,86	0,73	0,86	0,74	0,65	0,83	0,73	0,66	0,57	0,76	0,62
CFH	0,61	0,79	0,86	0,72	0,80	0,79	0,80	0,86	0,83	0,79	0,86	0,81	0,54	0,47	0,62	0,51
ITIH4	0,47	0,79	0,58	0,63	0,71	0,79	0,63	0,77	0,59	0,76	0,41	0,56	0,63	0,47	0,79	0,55
APOL1	0,45	0,65	0,76	0,61	0,68	0,69	0,67	0,80	0,71	0,65	0,76	0,77	0,47	0,53	0,41	0,27
ALB	0,44	0,28	0,86	0,55	0,37	0,28	0,52	0,35	0,72	0,65	0,79	0,70	0,64	0,57	0,72	0,64
SERPINC1	0,35	0,45	0,78	0,49	0,64	0,45	0,83	0,52	0,67	0,55	0,79	0,63	0,37	0,40	0,34	0,32
IGHG2	0,34	0,38	0,63	0,45	0,54	0,59	0,50	0,58	0,43	0,38	0,48	0,38	0,52	0,37	0,69	0,37
C4A	0,26	0,45	0,63	0,42	0,46	0,45	0,47	0,43	0,60	0,62	0,59	0,56	0,36	0,47	0,24	0,25
APCS	0,24	0,52	0,63	0,33	0,36	0,48	0,23	0,21	0,52	0,62	0,41	0,49	0,34	0,43	0,24	0,32

^aCA, asignación correcta.

^bSens., sensibilidad.

^cEspec., especificidad.

^dAUC, área bajo la curva.

Tabla 7

Resultados de discriminación de potencia de paneles de biomarcadores obtenidos con el algoritmo de clasificador bayesiano ingenuo en la clasificación de mues suero con GPAA, con GPEX y de control.

Panel	Nº. de panel	Nº. de marcadores	Grupos asignados	Sens. (%)	Espec. (%)	AUC (%)
APOA4, IGHG2, APOL1 y C4A	1	4	GPEX frente a control	77,78	90,00	91,60
APOA4, C3, C4A, APCS y SERPINA1	2	5	GPAA frente a control	96,67	96,67	99,75
APOA4, C3, TF, APOL1, IGHG2 y C4A	3	6	GPAA frente a GPEX frente a control	92	83	96
APOA4, C4A, APOL1, IGHG2 y C3	4	5	GPEX frente a control	76,67	87,78	92,47
APOA4, C3, TF, C4A	5	4	GPAA frente a GPEX	75,56	80,00	83,33
APOA4, C3 y TF	6	3	GPAA frente a GPEX	72,22	85,56	84,20
APOA4, C3, TF, VTN, TTR, SERPINA1, FBLN1, APOA1, FCN3, CFH, ITIH4, APOL1, ALB, SERPINC1, IGHG2, C4A y APCS	7	17	GPAA frente a GPEX frente a control	87,78	95,00	92,16
		17	GPAA frente a control	97,78	92,22	99,26
		17	GPEX frente a control	81,11	94,44	96,42
		17	GPAA frente a GPEX	65,56	73,33	78,89
C3, TF, VTN, TTR, SERPINA1, FBLN1, APOA1, FCN3, CFH, ITIH4, APOL1, ALB, SERPINC1, IGHG2 y APCS	8	15	GPAA frente a GPEX frente a control	88,89	95,00	91,13
		15	GPAA frente a control	96,67	88,89	98,77
		15	GPEX frente a control	81,11	94,44	95,68
		15	GPAA frente a GPEX	62,22	74,44	75,37
ALB, SERPINC1, IGHG2, C4A y APCS	9	5	GPAA frente a GPEX frente a control	62,22	72,22	62,51
ALB, SERPINC1, IGHG2, C4A, APCS, ITIH4 y APOL1	10	7	GPAA frente a GPEX frente a control	74,44	83,89	77,49
IGHG2, C4A, APCS e ITIH4	11	4	GPEX frente a control	47,78	70,00	60,86
SERPINC1, IGHG2, C4A, APCS e ITIH4	12	5	GPEX frente a control	55,56	71,11	71,60
C3, SERPINC1, TF, APOL1	13	4	GPAA frente a GPEX frente a control	88,89	95,00	91,13
C3, SERPINC1, APCS, SERPINA1	14	4	GPAA frente a control	96,67	88,89	98,77

Basándose en la concentración hallada para cada una de las 17 proteínas en muestras de suero de pacientes con GPAA, con GPEX y de control, se usó un análisis discriminante por pasos con un punto de corte de significación de 0,05 para determinar qué variables (proteínas) eran las más importantes para diferenciar entre los grupos. Como resultado de esta sustracción de subconjunto de características, seis biomarcadores proteicos parecen ser significativos en la discriminación de los grupos estudiados. Este panel incluyó las proteínas C3, APOA4, C4A, TF, IGHG2 y APOL1, que se seleccionaron por consiguiente para generar modelos predictivos multivariantes. Para ello, los inventores realizaron un entrenamiento usando muestreo aleatorio con el 75% de los datos y distintos algoritmos de aprendizaje automático, tales como clasificador bayesiano ingenuo, k vecinos más próximos, bosques aleatorios, árbol de clasificación o un conjunto de algoritmos de clasificador bayesiano ingenuo y máquinas de vectores de soporte (AdaBoost.M1). Posteriormente, se validó el método de clasificación usando el 25% restante de datos.

Como resultado de este análisis, se descubrió que la mejor eficiencia de clasificación se obtuvo cuando se usó el panel completo de seis marcadores y entrenando principalmente los datos con el clasificador bayesiano ingenuo y Adaboost.M1 (conjunto de dos algoritmos: máquinas de vectores de soporte y clasificador bayesiano ingenuo) con valores de asignación correcta del 79,87% y el 81,17% respectivamente, y comparando los tres grupos de estudio (tabla 8).

Tabla 8

Rendimiento predictivo entre los grupos GPEX, GPAA y de control obtenidos en el estudio de validación de un panel de 6 marcadores (C3, APOA4, C4A, TF, IGHG2 y APOL1) implementando diferentes algoritmos de aprendizaje automático

Resultados de la evaluación

	Método	CA ^a	Sens. ^b	Espec. ^c	AUC ^d
1	Clasificador bayesiano ingenuo	0,7987	0,8214	0,9286	0,9583
2	kNN	0,6948	0,8214	0,8673	0,9228
3	Árbol de clasificación	0,7078	0,8036	0,8571	0,8154
4	Bosques aleatorios	0,7078	0,8571	0,8367	0,9042
5	AdaBoost.M1	0,8117	0,8214	0,9490	0,9210

^aCA, asignación correcta.
^bSens., sensibilidad.
^cEspec., especificidad.
^dAUC, área bajo la curva.

La matriz de confusión que resultó de la validación del clasificador, generada por medio del clasificador bayesiano ingenuo aleatorio, se muestra en la tabla 8. En términos generales, la eficiencia de diagnóstico alcanzó el 81% (asignación correcta, CA) y una especificidad (Espec.) del 83% y sensibilidad (Sens.) del 92% (véase la tabla 9).

Tabla 9

Matriz de confusión resultante de la validación del clasificador generada por medio del clasificador bayesiano ingenuo aleatorio, sometiendo a prueba cinco veces mediante muestreo aleatorio con el 25% de las muestras no usadas en el proceso de aprendizaje cuando se comparan los grupos de CT, GPEX y GPAA

Diagnóstico clínico

		CT	GPEX	GPAA	
Total	CT	33	7	0	40
	GPEX	5	23	7	35
	GPAA	0	2	33	35
		38	32	40	110
Tasa de error	CA ^a (%)	Sens. ^b	Espec. ^c	Discr. ^d GPAA frente a GPEX	
0,19	0,81	0,92	0,83	0,86	

^aCA, asignación correcta.
^bSens., sensibilidad.
^c Espec., especificidad.
^dDiscr., discriminación.

De ese modo, los inventores lograron clasificar correctamente el 83% de las muestras de control y el 92% de los casos con patología GPAA o GPEX. Cabe destacar que se alcanzó el 100% de eficacia cuando se discriminó el grupo de GPAA del grupo de control, puesto que ninguna muestra de control se clasificó como GPAA o viceversa. El panel de seis marcadores también mostró una discriminación correcta de GPAA y GPEX en el 86% de las muestras patológicas, mientras que la predicción menos precisa fue el diagnóstico del grupo de GPEX, con una asignación correcta global del 66%.

REIVINDICACIONES

1. Método *in vitro* para el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación en un sujeto, que comprende
 - (i) determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y
 - (ii) comparar el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV con un valor de referencia
 y, en el que,
 - a) si el sujeto padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV en comparación con un valor de referencia es indicativo de glaucoma de pseudoexfoliación, o
 - b) si el sujeto no padece síndrome de pseudoexfoliación, un aumento del nivel de expresión de apolipoproteína A-IV en comparación con un valor de referencia es indicativo de glaucoma primario de ángulo abierto.

2. Método según la reivindicación 1, que comprende además determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1, albúmina sérica y combinaciones de los mismos, en el que
 - a) si el sujeto padece síndrome de pseudoexfoliación,
 - un aumento del nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1 y albúmina sérica en comparación con un valor de referencia es indicativo de glaucoma de pseudoexfoliación, o
 - b) si el sujeto no padece síndrome de pseudoexfoliación,
 - un aumento del nivel de expresión de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, transtiretina, alfa-1-antitripsina, fibulina-1, apolipoproteína A-I, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina y apolipoproteína L1 en comparación con un valor de referencia, y/o
 - una disminución del nivel de expresión de albúmina sérica en comparación con un valor de referencia,
 - es indicativo de glaucoma primario de ángulo abierto.

3. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende además determinar en una muestra de dicho sujeto el nivel de expresión de al menos un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y combinaciones de los mismos.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, que comprende determinar el nivel de expresión de los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C3 del complemento y serotransferrina.

5. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende determinar el nivel de expresión de los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, región C de cadena gamma-2 de Ig y apolipoproteína L1.

6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende determinar el nivel de expresión de los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, C3 del complemento, componente P de amiloide sérico y alfa-1-antitripsina.

7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende determinar el nivel de expresión de los biomarcadores apolipoproteína A-IV, C4A del complemento, C3 del complemento, serotransferrina, apolipoproteína L1 y la región C de cadena gamma-2 de Ig.

8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende determinar el nivel de expresión de todos los biomarcadores de la tabla 1 y los biomarcadores adicionales región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento y componente P de amiloide sérico, en el que la tabla 1 es

Nombre de la proteína	Nombre del gen
Apolipoproteína A-IV	APOA4
C3 del complemento	C3
Serotransferrina	TF
Vitronectina	VTN
Transtiretina	TTR
Alfa-1-antitripsina	SERPINA1
Fibulina-1	FBLN1
Apolipoproteína A-I	APOA1
Ficolina-3	FCN3
Factor H del complemento	CFH
Cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina	ITIH4
Apolipoproteína L1	APOL1
Albúmina sérica	ALB

9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la muestra es una muestra de líquido corporal.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la muestra de líquido corporal es sangre, plasma o suero sanguíneo.
- 5 11. Kit que comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de apolipoproteína A-IV y un biomarcador adicional seleccionado del grupo que consiste en C3 del complemento, serotransferrina, vitronectina, fibulina-1, ficolina-3, factor H del complemento, cadena pesada H4 de inhibidor de inter-alfa-tripsina, apolipoproteína L1, albúmina sérica y combinaciones de los mismos en el que el reactivo para determinar el nivel de expresión se selecciona del grupo que consiste en:
- 10 (a) un anticuerpo, un aptámero, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína biomarcadora; y
- (b) un reactivo adecuado para determinar el nivel de expresión del biomarcador por medio de un ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), siendo dicho reactivo un péptido marcado con isótopos que puede obtenerse mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC.
- 15 12. Kit según la reivindicación 11, que comprende además un reactivo para determinar el nivel de expresión de un biomarcador adicional, en el que dicho biomarcador adicional se selecciona del grupo que consiste en región C de cadena gamma-2 de Ig, antitrombina-III, C4A del complemento, componente P de amiloide sérico y combinaciones de los mismos y en el que el reactivo para determinar el nivel de expresión se selecciona del grupo que consiste en:
- 20 (a) un anticuerpo, un aptámero, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína biomarcadora; y
- (b) un reactivo adecuado para determinar el nivel de expresión del biomarcador por medio de un ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), siendo dicho reactivo un péptido marcado con isótopos que puede obtenerse mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC.
- 25 13. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dichos reactivos son anticuerpos, o fragmentos de los mismos que tienen la capacidad de reconocer el antígeno correspondiente, que se unen específicamente a dichos biomarcadores.
- 30 14. Uso de un kit que comprende un reactivo para determinar el nivel de expresión de al menos apolipoproteína A-IV y opcionalmente al menos un biomarcador seleccionado de los biomarcadores enumerados en la tabla 1 para el diagnóstico de un glaucoma seleccionado de glaucoma primario de ángulo abierto y glaucoma de pseudoexfoliación, en el que el reactivo para determinar el nivel de expresión se selecciona del grupo que consiste en:
- 35 (a) un anticuerpo, un aptámero, o un fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína

biomarcadora; y

- 5 (b) un reactivo adecuado para determinar el nivel de expresión del biomarcador por medio de un ensayo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), siendo dicho reactivo un péptido marcado con isótopos que puede obtenerse mediante digestión enzimática de dicha proteína biomarcadora con una enzima digestiva seleccionada del grupo que consiste en tripsina, papaína, endoproteinasa LysC, endoproteinasa ArgC, V8 de *Staphylococcus aureus*, quimotripsina, Asp-N, Asn-C, pepsina y endoproteinasa GluC.
15. Uso de un kit según la reivindicación 14, en el que dicho reactivo es un anticuerpo, o un fragmento del mismo que tiene la capacidad de reconocer el antígeno correspondiente, que se une específicamente a dicho biomarcador.

10