

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 551**

51 Int. Cl.:
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/92 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04817973 .3**
96 Fecha de presentación: **06.12.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1697746**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.09.2006**

54 Título: **Marcadores de riesgo para enfermedad cardiovascular**

30 Prioridad:
05.12.2003 US 527178 P
11.08.2004 US 600527 P
11.08.2004 US 600551 P
15.10.2004 US 619044 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.05.2012

73 Titular/es:
THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION
9500 EUCLID AVENUE
CLEVELAND, OH 44195, US

72 Inventor/es:
HAZEN, Stanley;
PENN, Marc, S.;
SMITH, Jonathan;
ZHANG, Renliang y
ZHENG, Lemin

74 Agente/Representante:
Ponti Sales, Adelaida

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).

ES 2 381 551 T3

DESCRIPCIÓN

Marcadores de riesgo para enfermedad cardiovascular.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere al campo de la enfermedad cardiovascular. Más en concreto, se refiere a marcadores y procedimientos para determinar si un sujeto, en particular un sujeto humano, presenta un riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, al tener una enfermedad cardiovascular, o sufrir una complicación de enfermedad cardiovascular. La presente solicitud se refiere también al uso de dichos marcadores y procedimientos para seguimiento del estado de una enfermedad cardiovascular en un sujeto o los efectos de los agentes terapéuticos en sujetos con enfermedad cardiovascular.

[0002] Enfermedad cardiovascular (ECV) es un término general aplicado a cardiopatías y enfermedades de los vasos sanguíneos, lo que incluye aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad aortoiliaca y enfermedad vascular periférica. Los sujetos con ECV pueden desarrollar una serie de complicaciones, que incluyen, pero no se limitan a, infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma aórtico y muerte. La ECV es responsable de una de cada dos muertes en los Estados Unidos y es la principal enfermedad mortal. Así, la prevención de la enfermedad cardiovascular es un área de gran importancia en la salud pública.

[0003] Para prevenir ECV se recomienda una dieta baja en grasas y ejercicio. Además, puede prescribirse una serie de agentes terapéuticos por parte de profesionales médicos a aquellos individuos que, según se sabe, presentan el riesgo de desarrollar o tener ECV. Entre ellos se incluyen agentes de reducción de lípidos que reducen los niveles en sangre de colesterol y triglicéridos, agentes que normalizan la presión arterial, agentes, como aspirina o antagonista de receptor plaquetario del ADP (por ejemplo, clopidogrel y ticlopidina) que previenen la activación de plaquetas y reducen la inflamación vascular, y agentes pleotróficos como agonistas del receptor activado de proliferador de peroxisoma (PPAR), con efectos metabólicos de amplio espectro que reducen la inflamación, promueven la sensibilización a la insulina, mejoran la función vascular y corrigen las anomalías lipídicas. Puede usarse una terapia más agresiva, por ejemplo, con administración de múltiples medicamentos o intervención quirúrgica, en aquellos individuos que presenten un riesgo elevado. Como las terapias de ECV pueden tener efectos secundarios adversos, es deseable tener procedimientos para identificar a aquellos individuos que presenten riesgo, en particular aquellos individuos que presenten un riesgo elevado, de desarrollar o tener ECV.

[0004] En la actualidad, se usan varios factores de riesgo entre los profesionales médicos para valorar el riesgo de un individuo de desarrollar o tener ECV y para identificar a individuos que presenten un riesgo elevado. Entre los principales factores de riesgo de enfermedad cardiovascular se incluyen la edad, hipertensión, antecedentes familiares de ECV prematura, tabaquismo, altos niveles de colesterol total, bajos niveles de colesterol HDL, obesidad y diabetes. Los principales factores de riesgo de ECV son aditivos, y normalmente se usan en conjunto entre los médicos en un algoritmo de predicción de riesgo para dirigirse a aquellos individuos que tengan la máxima probabilidad de beneficiarse de un tratamiento de ECV. Estos algoritmos consiguen una alta sensibilidad y especificidad para predecir el riesgo de ECV en un plazo de 10 años. Sin embargo, la capacidad de los algoritmos actuales de predecir una mayor probabilidad de desarrollar ECV es limitada. Entre los individuos que no tienen ninguno de los factores de riesgo actuales, el riesgo a 10 años de desarrollar ECV sigue siendo del 2 % aproximadamente. Además, se produce un alto número de complicaciones de ECV en individuos con perfiles de riesgo aparentemente bajos o moderados, según se determina usando en la actualidad factores de riesgo conocidos. Así, existe la necesidad para ampliar el algoritmo actual de riesgo cardiovascular para identificar un espectro más amplio de individuos en riesgo de o afectadas por ECV.

[0005] El mecanismo de aterosclerosis no es bien comprendido. En la última década una diversidad de datos clínicos, patológicos, bioquímicos y genéticos sustenta la noción de que la aterosclerosis es un trastorno inflamatorio crónico. Los reactivos de fase aguda (por ejemplo, proteína C reactiva, proteínas de complemento), marcadores sensibles pero inespecíficos de inflamación, están enriquecidos en estrías grasas y las fases tardías de las lesiones ateroscleróticas. En un reciente ensayo clínico prospectivo, los niveles de plasma de base de proteína C reactiva predecían independientemente riesgo de infarto de miocardio e ictus por primera vez en individuos aparentemente sanos. La patente de EE.UU. nº 6.040.147 describe procedimientos que usan proteína C reactiva, citocinas y moléculas de adhesión celular para caracterizar el riesgo de un individuo de desarrollar un trastorno cardiovascular. Aunque útiles, estos marcadores pueden encontrarse en la sangre de individuos con inflamación debido a causas distintas de ECV, y así, estos marcadores pueden no ser suficientemente específicos. Por otra parte, no se ha demostrado que la modulación de sus niveles prediga una disminución en la morbilidad o mortalidad de ECV.

[0006] El documento WO 01/38395 describe el uso de formas oxidadas de apolipoproteínas (específicamente, ciertas formas oxidadas de apoA-I y apoA-II que tienen residuos de metionina (Met) oxidados específicos) en procedimientos de diagnóstico y tratamiento de enfermedades asociadas con estrés oxidativo, como enfermedad cardiovasculares, en particular, aterosclerosis.

[0007] El documento EP 0 722 086 describe procedimientos para determinación inmunológica de lipoproteínas oxidadas basándose en la unión específica de lipoproteínas oxidadas a β 2-glicoproteína I (β 2-GPI). Más específicamente, el documento describe la detección/cuantificación del complejo de β 2-GPI y una lipoproteína oxidada usando un ensayo en sándwich que emplea, por ejemplo, un anticuerpo anti-lipoproteína y/o un anticuerpo anti-apolipoproteína.

[0008] Shishehbor y col., 2003, JAMA, Vol. 289, n° 13, pág. 1675-1680 describen estudios de la relación entre niveles sistémicos de nitrotirosina y enfermedad de la arteria coronaria (EAC). Se recogieron muestras de sangre y se determinaron los niveles totales de nitrotirosina ligada a proteínas. Se encontró que los niveles totales de nitrotirosina ligada a proteínas eran superiores en pacientes con EAC en comparación con los controles.

[0009] Matsunaga y col., 2001, J. Biochemistry, Vol. 130, n° 2, pág. 285-293 describe estudios *in vitro* en los que las lipoproteínas se modificaron oxidativamente usando peroxinitrito (para producir NO_2 -lipoproteína), y se investigaron los efectos de esta NO_2 -lipoproteína en la viabilidad de las células endoteliales en cultivo.

[0010] Bergt y col., 2003, Free Rad. Biol. & Med., Vol. 35, Sup. n° 1, Abs. n° 312, pág. S101 describe estudios de apoA-I que han sido oxidadas por HOCl, en un esfuerzo por determinar si los fagocitos cloran preferentemente sitios específicos en HDL. Los estudios demostraron que el principal sitio de cloración fue un único residuo de tirosina situado en uno de los motivos YxxK de las proteínas.

[0011] La presente invención proporciona procedimientos para caracterizar el riesgo de un sujeto, en particular un sujeto humano, de tener enfermedad cardiovascular. La presente invención también proporciona procedimientos de caracterización del riesgo de un sujeto de desarrollar enfermedad cardiovascular. En otra forma de realización, la presente invención proporciona procedimientos para caracterizar el riesgo de un sujeto de sufrir una complicación de enfermedad cardiovascular. En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un sujeto que presenta dolor torácico tiene un riesgo a corto plazo de sufrir un ataque cardíaco u otro episodio cardíaco adverso importante. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para identificar a aquellos sujetos que tienen necesidad de terapias de ECV altamente agresivas así como a aquellos sujetos que no requieren terapias dirigidas a inhibir o prevenir ECV o complicaciones de ECV.

[0012] Los procedimientos de la invención comprenden la determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apolipoproteína A1 en una muestra corporal obtenida del sujeto, en los que la biomolécula oxidada ligada a apoA-I es apoA-I oxidada, o un fragmento peptídico de apoA-I oxidada; en los que la apoA-I oxidada y el fragmento peptídico de apoA-I oxidada tienen actividad de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 reducida o actividad de unión a lípidos reducida, o ambas, en comparación con apoA-I no oxidada. Los niveles de una o más de las biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica del sujeto pueden compararse con un valor de control que se obtiene de medidas de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en muestras biológicas comparables obtenidas de una población de sujetos de control. Los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica obtenida del sujeto, alternativamente, pueden compararse con niveles de un patrón interno oxidado en la muestra biológica obtenida del sujeto. Los ejemplos de dichos patrones internos incluyen, pero no se limitan a, albúmina oxidada o proteína total oxidada.

[0013] En una forma de realización, la comparación caracteriza el riesgo actual del sujeto de tener ECV, según se determina usando protocolos estándar para diagnosticar ECV. Por otra parte, la magnitud de la diferencia entre los niveles de biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I del sujeto y el valor de control también es útil para caracterizar la magnitud del riesgo y con ello, determinar qué sujetos se beneficiarían más de ciertas terapias. En otra forma de realización, la comparación caracteriza el riesgo del sujeto de desarrollar ECV en el futuro. En otra forma de realización, la comparación puede usarse para caracterizar el riesgo del sujeto de sufrir una complicación de ECV. Los presentes procedimientos pueden usarse también para determinar si un sujeto que se presenta con dolor torácico tiene un riesgo de sufrir un episodio cardíaco adverso importante, como un infarto de miocardio, un nuevo infarto, la necesidad de revascularización o la muerte, a corto plazo, por ejemplo, al día siguiente, 3 meses o 6 meses después de que el sujeto se presente con dolor torácico.

[0014] También se proporcionan en la presente memoria descriptiva procedimientos para seguimiento con el tiempo del estado de la ECV en un sujeto. En una forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de los niveles de una o más de las biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica tomada del sujeto en un instante inicial y en una muestra biológica correspondiente tomada del sujeto en un instante posterior. Un aumento en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica tomada en el instante posterior en comparación con el instante inicial indica que el riesgo de un sujeto de tener ECV ha aumentado. Una disminución en los niveles de la una o más moléculas oxidadas ligadas a apoA-I indica que el riesgo del sujeto de tener ECV ha disminuido. Para aquellos sujetos que ya han sufrido un episodio cardiovascular adverso como un infarto de miocardio o un ictus isquémico, dichos procedimientos son útiles también para valorar el riesgo del sujeto de sufrir un episodio cardiovascular adverso agudo posterior. En dichos sujetos, un aumento en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I indica que el sujeto presenta un riesgo incrementado de sufrir un episodio cardiovascular adverso posterior. Una disminución en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en el sujeto con el tiempo indica que el riesgo del sujeto de sufrir un

episodio cardiovascular posterior adverso ha disminuido.

[0015] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para caracterizar la respuesta de un sujeto a la terapia dirigida a estabilizar o hacer retroceder una ECV. El procedimiento comprende la determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica tomada del sujeto antes de la terapia y la determinación del nivel de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-1 en una muestra biológica correspondiente tomada del sujeto durante o después de la terapia. Una disminución en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra tomada después de o durante la terapia en comparación con niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-1 en la muestra tomada antes de la terapia es indicativa de los efectos positivos de la terapia en la enfermedad cardiovascular en el sujeto tratado.

[0016] Se describen anticuerpos que son inmunoespecíficos para una o más de las biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I usadas en los presentes procedimientos. Dichos anticuerpos son útiles para determinar o medir los niveles de las biomoléculas oxidadas a apoA-I en muestras biológicas obtenidas del sujeto.

[0017] También se describen en la presente memoria descriptiva kits que comprenden reactivos para valorar los niveles de HDL oxidadas, apoA-I y/o fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada en muestras biológicas obtenidas de un sujeto de prueba. Los presentes kits comprenden también materiales impresos como instrucciones para poner en práctica los presentes procedimientos, o información útil para valorar el riesgo de ECV de un sujeto de prueba. Entre los ejemplos de dicha información se incluyen, pero no se limitan a valores de corte, sensibilidades en valores de corte en particular, así como otro material impreso para caracterizar el riesgo basándose en el resultado del ensayo. Dichos kits pueden comprender también reactivos de control, por ejemplo, HDL oxidadas, apoA-I oxidada y/o fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada.

[0018] También se describen en la presente memoria descriptiva procedimientos de tratamiento de un sujeto para reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019] **Fig. 1. Espectros de disociación inducida por colisión (CID) de los péptidos que contienen nitrotirosina.** Los espectros se adquirieron durante el análisis de digestas tripticas en gel de la banda de apoA-I a partir de HDL tratadas con el sistema de nitración de proteínas MPO/H₂O₂/NO₂⁻ (A-D) o peroxinitrito (E), según se describe en los procedimientos. Se detectaron iones de carga doble y triple (según se indica) y se fragmentaron en un experimento de LC-MS en tándem usando un sistema de espectrómetro de masas de trampa iónica. Los péptidos secuenciados en los espectros A y D se detectaron sólo en la reacción mediada por MPO. Los péptidos secuenciados en espectros B y C se detectaron en las reacciones mediadas por MPO y mediadas por peroxinitrito. El péptido secuenciado en el espectro E se detectó sólo en la reacción mediada por peroxinitrito.

[0020] **Fig. 2. Espectros de disociación inducida por colisión (CID) de los péptidos que contienen clorotirosina.** Los espectros se adquirieron durante el análisis de digestas tripticas en gel de la banda de apoA-I a partir de HDL tratadas con el sistema de cloración de proteínas MPO/H₂O₂/Cl⁻, según se describe en los procedimientos. Se detectaron iones de carga doble y triple (según se indica) y se fragmentaron en un experimento de LC-MS tándem usando un sistema de espectrómetro de masas de trampa iónica. Se secuenció la misma serie de péptidos en las reacciones mediadas por MPO y HOCl.

[0021] **Fig. 3. Resumen de los sitios de modificación de apoA-I.** Se indican los residuos de tirosina específicos que fueron modificados por las reacciones respectivas. La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO. 1) se basa en el número de acceso NCBI 229513 para la proteína apoA-I madura. La numeración de todos los residuos de aminoácidos citados en este documento se refiere a la secuencia de aminoácidos de la proteína madura.

[0022] **Fig. 4. Nitración de apoA-I dependiente de la dosis y degradación de la actividad de transporte de colesterol inversa.** Se nitró HDL en una serie de reacciones MPO/H₂O₂/NO₂⁻ con cantidades crecientes de H₂O₂ o peroxinitrito, según se indica, durante 1,5 h. A) Efecto de las reacciones de nitración en el flujo de colesterol inverso dependiente de ABCA1 de HDL. Las HDL modificadas de cada reacción se incubaron posteriormente con macrófagos RAW264 murinos cargados con lipoproteínas de baja densidad acetilada (AcLDL) marcadas con ³H-colesterol. Estas células se trataron con las HDL modificadas en presencia de cAMP para medir el componente dependiente de ABCA1 del transporte de colesterol inverso. Después de 4 horas, se contaron los ³H del medio y celulares y se calculó el flujo porcentual como la cantidad de ³H-colesterol en el medio dividido por el ³H-colesterol total (medio + celular). Se normalizaron todos los valores al flujo de colesterol dependiente de ABCA1 obtenido con HDL sin modificar. B) Cuantificación específica del sitio de nitración de apoA-I determinada usando LC-MS. Se hizo precipitar las proteínas en la reacción de HDL modificada con acetona en frío, se separó por SDS-PAGE, y se detectó mediante tinción de azul de Coomassie. La apoA-I se cortó del gel y fue digerida con tripsina. La progresión de la reacción de nitración se siguió cuantitativamente usando el procedimiento de péptidos de referencia nativos. Se midió la proporción máxima de áreas de cada péptido triptico que contenía las tirosinas respectivas de interés con respecto al péptido de referencia nativo. Se determinó la modificación porcentual de cada péptido determinado

basándose en la disminución de la cantidad de cada péptido con respecto a un control no tratado.

[0023] Fig. 5. Cloración de apoA-I dependiente de la dosis y degradación de la actividad de transporte de colesterol inversa. Se cloró HDL en una serie de reacciones MPO/H₂O₂/Cl⁻ con cantidades crecientes de H₂O₂ o HOCl, según se indica, durante 1,5 h. A) Efecto de las reacciones de cloración respectivas en el flujo de colesterol inverso dependiente de ABCA1 de HDL. El flujo se determinó usando los mismos procedimientos descritos en la fig. 4 para el producto de nitración. B) Cuantificación específica del sitio de cloración de apoA-I determinada usando LC-MS. Los procedimientos usados para detectar y caracterizar estos sitios se suministran en la fig. 4.

[0024] Fig. 6. La modificación de apoA-I inhibe la unión a lípidos coordinadamente con actividad de aceptor de colesterol dependiente de ABCA1. A) Se sometió a ensayo la actividad de unión a lípidos de apoA-I por su capacidad para inhibir la agregación de LDL inducida por fosfolipasa C (PLC) durante un curso de tiempo de 1 h a 37 °C. 3 µg/ml de apoA-I o apoA-I modificada por H₂O₂ redujeron la agregación de LDL aproximadamente en la misma magnitud. En comparación con apoA-I sin modificar, el sistema de modificación de MPO/H₂O₂/Cl⁻ completo y en menor medida el sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻ condujeron a apoA-I con menor capacidad de unirse a la LDL tratada con PLC e inhiben su agregación. Los valores representan la media de pocillos por triplicado. La capacidad de apoA-I de inhibir la agregación de LDL era dependiente de la dosis (datos no mostrados). B) Se calculó la unión a lípidos a partir de las pendientes iniciales del experimento mostrado en la fig. 6A, y se normalizó al valor para apoA-I sin modificar (eje x). Se usaron preparaciones idénticas de apoA-I para someter a ensayo el flujo de lípidos dependiente de ABCA1 de 8Br-cAMP tratado con RAW264.7 en triplicado (según se muestra en la fig. 5B), y se normalizó al valor de apoA-I sin modificar (eje y). Las modificaciones de MPO llevaron a coordinar reducciones en la unión a lípidos y la actividad de aceptor dependiente de ABCA1 (regresión lineal $r^2 = 0,96$. $p < 0,0001$).

[0025] Fig. 7. Detección de péptidos nitrados en apoA-I aislada a partir de tejido de ateroma humano por LC-espectrometría de masas en tándem. Cromatogramas de monitorización de reacción seleccionados (MRS) para la detección, *in vivo*, de péptidos no modificados, nitrados y clorados, después de digestión triptica en gel de inmunoafinidad a apoA-I purificada a partir de tejido de ateroma humano. A) Detección de formas no modificadas y nitradas de péptido que contiene el sitio Y192 preferido determinado por experimentos *in vitro*. B) Espectro CID registrado en este tiempo de retención para confirmar la identidad del péptido y la posición de la nitración. C) Detección de las formas no modificadas, nitradas y cloradas (de arriba abajo, respectivamente) del péptido que contiene el sitio Y166 secundario. De nuevo, los espectros CID registrados en este tiempo de retención (D) confirman la identidad de los péptidos y la posición de la nitración y la cloración. El espectro CID del péptido nitrado no es ambiguo, mientras el espectro CID del ion molecular del posible péptido clorado muestra también una superposición significativa con la forma que contiene trihidroxifenilalanina de este péptido que coeluye y tiene un peso molecular similar.

[0026] Fig. 8. Detección de péptidos nitrados en apoA-I aisladas a partir de tejido de ateroma humano por LC-espectrometría de masas en tándem. Cromatogramas de monitorización de reacción seleccionados (MRS) para la detección, *in vivo*, de péptidos oxidados no modificados, después de digestión triptica en gel de inmunoafinidad de apoA-I purificada a partir de tejido de ateroma humano. A) Espectro CID del péptido oxidado (T₁₆₁-R₁₇₁) de apoA-I. Se detecta un residuo con masa idéntica a trihidroxifenilalanina (TOPA) o hidroperóxido de la tirosina en la posición 166 usando espectro CID. B) Espectro CID de un péptido no modificado (D₂₈-K₄₀) de apoA-I. C). Espectro CID del péptido oxidado (D₂₈-K₄₀) de apoA-I. Se detecta un residuo con masa idéntica a TOPA o hidroperóxido de la tirosina en la posición 29, y se detecta dihidroxifenilalanina en la posición 33.

[0027] Fig. 9. Modelo cinético para mieloperoxidasa.

[0028] Fig. 10. Representación esquemática de ciertos reactivos intermedios generados por mieloperoxidasa y algunos productos de oxidación generados por MPO.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0029] La presente invención se describirá a continuación como referencia a formas de realización más detalladas, con referencia ocasional a los dibujos adjuntos. Esta invención puede, sin embargo, describirse en diferentes formas y no debe entenderse como limitada a las formas de realización expuestas en la presente memoria descriptiva. Estas formas de realización se proporcionan más bien de manera que esta descripción sea minuciosa y completa.

[0030] Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el mismo significado que entienden comúnmente los expertos en la materia a la que pertenece esta invención. La terminología usada en la descripción de la invención en la presente memoria descriptiva es para describir sólo formas de realización particulares y no pretende limitar la invención. Según se usa en la descripción de la invención y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el/la" pretenden incluir también las formas plurales, salvo que el contexto indique claramente lo contrario.

[0031] Salvo que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes,

propiedades como el peso molecular, las condiciones de reacción, y así sucesivamente según se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, salvo que se indique lo contrario, las propiedades numéricas expuestas en la siguiente memoria descriptiva y reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener en las formas de realización de la presente invención. Aun cuando los intervalos numéricos y los parámetros expuestos en la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se refieren como lo más precisos posible. Sin embargo, cualquier valor numérico contiene inherentemente ciertos errores que resultan necesariamente del error encontrado en sus medidas respectivas.

PROCEDIMIENTOS Y MARCADORES PARA PREDECIR RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

[0032] En la presente memoria descriptiva se proporcionan procedimientos y marcadores para caracterizar el riesgo de un sujeto de desarrollar ECV, tener ECV o sufrir una complicación de ECV. En este contexto, dichos procedimientos y marcadores son útiles para caracterizar el riesgo de un sujeto de tener placas vulnerables o de sufrir un infarto de miocardio.

[0033] Los procedimientos comprenden la determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I según se describe en la presente memoria descriptiva antes de que se obtenga una muestra biológica del sujeto.

[0034] El término "lipoproteína de alta densidad" o "HDL" según se usa en la presente memoria descriptiva se define de acuerdo con su uso común por parte de los expertos en la materia.

[0035] Al menos una de las biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I es una forma oxidada de apolipoproteína A1, o es un fragmento peptídico de apoA-I oxidada según se describe anteriormente en la presente memoria descriptiva. Dicho fragmento tiene una longitud de tres (3) o más aminoácidos y, excepto para el residuo de aminoácidos oxidados contenidos en el mismo, comprende una secuencia de aminoácidos idéntica a una parte de SEQ ID NO. 1. Algunas formas de realización como los fragmentos peptídicos apoA-I comprenden uno o más aminoácidos oxidados que indican que la proteína apoA-I de la que se ha obtenido el péptido se oxidó mediante un sistema ligado a mieloperoxidasa ("MPO"). En ciertas formas de realización, el aminoácido oxidado está en cualquiera de las posiciones 18, 29, 166, 192, 236, o cualquier combinación de las mismas, en SEQ ID NO. 1. La oxidación de apoA-I puede tener lugar por exposición a la especie de cloración de reactivo generada por MPO (como las formadas por el sistema MPO/H₂O₂/Cl⁻, o HOCl), o especie de nitrógeno reactiva relacionada con MPO (como las formadas por el sistema MPO/H₂O₂/NO₂⁻, o ONOO⁻), o rutas de oxidación ligadas a MPO (por ejemplo, sistemas de generación de radical tirosilo generados por MPO). Así, los ejemplos de péptidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, fragmentos peptídicos de apoA-I que comprenden clorotirosina, nitrotirosina, ditirosina, sulfóxido de metionina, oxohistidina, trihidroxifenilalanina, dihidroxifenilalanina, peróxido de tirosina u otros aminoácidos oxidados formados por exposición de apoA-I a oxidantes generados por MPO. Entre los ejemplos de fragmentos peptídicos de apoA-I adecuados se incluyen, pero no se limitan a, los péptidos mostrados en la Tabla I a continuación.

HDL + MPO/H ₂ O ₂ /Cl ⁻			
Péptidos mayores modificados detectados por ESI/MS/MS	H ₂ O ₂ (μM)		
	10	25	100
L ₁₈₉ AEY _{Cl} HAK ₁₉₅ (SEQ ID NO 4)	♦	♦	♦
T ₁₆₁ HLAPY _{Cl} SDLR ₁₇₀ (SEQ ID NO 5)		♦	♦
D ₂₈ Y _{Cl} GSALGK ₄₀ (SEQ ID NO 6)			♦
V ₂₂₇ SFLSALEEY _{Cl} TK ₂₃₈ (SEQ ID NO 7)			♦
HDL + ONOO⁻			
Péptidos mayores modificados detectados			
T ₁₆₁ HLAPY _{NO2} SDLR ₁₇₀ (SEQ ID NO 5)			
D ₁₃ LATVY _{NO2} VDVLK ₂₃ (SEQ ID NO 8)			
V ₂₂₇ SFLSALEEY _{NO2} TK ₂₃₈ (SEQ ID NO. 7)			

[0036] Los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra corporal del sujeto de prueba pueden compararse a continuación con un valor de control que se obtiene a partir de niveles de la una o más biomoléculas ligadas a apoA-I en muestras corporales comparables de sujetos de control. En una forma de realización alternativa, los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra corporal del sujeto de prueba pueden compararse a continuación con un patrón interno basándose en los niveles de otras biomoléculas oxidadas en la muestra corporal del sujeto. Los ejemplos de moléculas de patrón interno adecuadas incluyen, pero no se limitan a, niveles de proteína total oxidada en la muestra corporal del sujeto y niveles de albúmina oxidada en la muestra corporal del sujeto. Los sujetos de prueba cuyos niveles de la una o más biomoléculas ligadas a apoA-I están por encima del valor de control o en el intervalo superior de los valores de control presentan un riesgo mayor de tener o desarrollar enfermedad cardiovascular que los sujetos de prueba cuyos

niveles de la una o más biomoléculas ligadas a apoA-I están por debajo del valor de control o en el intervalo inferior de los valores de control. Por otra parte, la magnitud de la diferencia entre los niveles de biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I del sujeto y el valor de control también es útil para caracterizar la magnitud del riesgo y, con ello, la determinación de los sujetos que más se beneficiarían de ciertas terapias.

[0037] En ciertas formas de realización, el perfil de riesgo del sujeto para ECV se determina combinando un primer valor de riesgo, que se obtiene comparando los niveles de una o más biomoléculas ligadas a apoA-I en una muestra corporal del sujeto con niveles de dichas una o más biomoléculas ligadas a apoA-I en una población de control, con uno o más valores de riesgo adicionales para proporcionar un valor de riesgo final. Dichos valores de riesgo adicionales pueden obtenerse mediante procedimientos que incluyen, pero no se limitan a, la determinación de la presión arterial del sujeto, la valoración de la respuesta del sujeto a una prueba de esfuerzo, la determinación de niveles de mieloperoxidasa, proteína C reactiva, lipoproteína de baja densidad o colesterol en una muestra corporal del sujeto, o la valoración de la carga de placas ateroscleróticas del sujeto.

[0038] En una forma de realización, el procedimiento se usa para valorar el riesgo del sujeto de prueba de tener enfermedad cardiovascular. Los procedimientos médicos para determinar si un sujeto humano tiene enfermedad de la arteria coronaria o presenta un riesgo de sufrir una complicación de enfermedad de la arteria coronaria incluyen, pero no se limitan a, angiografía coronaria, ecografía intravascular coronaria (IVUS), prueba de esfuerzo (con y sin estudio de imagen), valoración del engrosamiento medial intimal carotídeo, estudios ecográficos de la carótida con o sin implementación de técnicas de histología virtual, tomografía computarizada de haz electrónico de la arteria coronaria (EBTC), exploración de tomografía computarizada (TC) cardíaca, angiografía de TC, resonancia magnética (RM) cardíaca y angiografía por resonancia magnética (ARM). Como la enfermedad cardiovascular, normalmente, no está limitada a una región de la vasculatura de un sujeto, un sujeto al que se le haya diagnosticado que tiene una enfermedad de la arteria coronaria, o presenta riesgo de tenerla, se considera también en riesgo de desarrollar o tener otras formas de ECV como enfermedad cerebrovascular, enfermedad aortoiliaca y enfermedad de las arterias periféricas. Los sujetos que presentan riesgo de tener enfermedad cardiovascular tienen riesgo de tener una prueba de esfuerzo anómala o un cateterismo cardíaco anómalo. Los sujetos que presentan riesgo de tener ECV tienen también riesgo de mostrar un aumento del grosor medial intimal carotídeo y calcificación coronaria, características que pueden evaluarse usando técnicas de imagen no invasivas. Los sujetos que presentan riesgo de tener ECV tienen también riesgo de tener un aumento de la carga de placas ateroscleróticas, una característica que puede examinarse usando ecografía intravascular.

[0039] En otra forma de realización, los presentes procedimientos se usan para valorar el riesgo del sujeto de prueba de desarrollar enfermedad cardiovascular en el futuro. En una forma de realización, el sujeto de prueba es un individuo aparentemente sano. En otra forma de realización, el sujeto no presenta por lo demás un riesgo elevado de tener enfermedad cardiovascular. En otra forma de realización, los presentes procedimientos se usan para determinar si un sujeto que se presenta con dolor torácico tiene un riesgo de sufrir un ataque cardíaco u otro episodio cardíaco adverso importante, como un ataque cardíaco, un infarto de miocardio, un nuevo infarto, la necesidad de revascularización o la muerte, a corto plazo. después de que el sujeto se presenta con dolor torácico. Según se usa en la presente memoria descriptiva, el término "a corto plazo" significa en el plazo de un año. Así, los sujetos que presentan riesgo a corto plazo pueden estar en riesgo de sufrir un episodio cardíaco adverso importante al día siguiente, en 3 meses o en 6 meses después de la presentación con dolor torácico.

[0040] La presente invención también proporciona un procedimiento para seguimiento con el tiempo del estado de la ECV en un sujeto al que se le ha diagnosticado que tiene ECV. En este contexto, el procedimiento es útil también para seguimiento del riesgo de progresión o regresión aterosclerótica en un sujeto con ECV. En una forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de los niveles de una o más de las biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica tomada del sujeto en un instante inicial y en una muestra biológica correspondiente tomada del sujeto en un instante posterior. Un aumento en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica tomada en el instante posterior en comparación con el instante inicial indica que la ECV del sujeto ha avanzado o empeorado. Una disminución en los niveles de la una o más moléculas oxidadas ligadas a apoA-I indica que la ECV ha mejorado o retrocedido. Para aquellos sujetos que hayan sufrido ya un episodio cardiovascular adverso agudo como un infarto de miocardio o un ictus isquémico, dicho procedimiento puede usarse también para valorar el riesgo del sujeto de tener un episodio cardiovascular adverso agudo posterior. Un aumento con el tiempo en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en el sujeto indica que el riesgo de un sujeto de sufrir un episodio cardiovascular adverso posterior ha aumentado. Una disminución con el tiempo en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en el sujeto indica que el riesgo del sujeto de sufrir un episodio cardiovascular adverso posterior ha disminuido.

[0041] En otra forma de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para evaluar la terapia en un sujeto en el que se sospecha o al que se ha diagnosticado una enfermedad cardiovascular. El procedimiento comprende la determinación de niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I, que incluyen apoA-I oxidada, un fragmento peptídico oxidado de apoA-I, y combinaciones de los mismos, en una muestra biológica tomada del sujeto antes de la terapia y la determinación de niveles de la una o más de las biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica correspondiente tomada del sujeto durante o después de la terapia. Una disminución en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la

muestra tomada después de o durante la terapia en comparación con niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra tomada antes de terapia es indicativa de un efecto positivo de la terapia en la enfermedad cardiovascular en el sujeto tratado.

[0042] Los presentes procedimientos predictivos de enfermedad cardiovascular se basan, al menos en parte, en el descubrimiento de los autores de la invención de que, en comparación con las proteínas totales, la apolipoproteína A1 en muestras corporales obtenidas de sujetos con enfermedad cardiovascular está preferentemente oxidada, por ejemplo, nitrada o clorada. Se cree que la presencia de estas biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I son producidas a través de oxidantes generados por MPO. MPO (donador: peróxido de hidrógeno, oxidorreductasa, EC 1.11.1.7) es una proteína hemo básica tetramérica altamente glucosilada (PI . 10) de aproximadamente 150 kDa. Está formada por dos promotores idénticos ligados a disulfuro, cada uno de los cuales posee una subunidad pesada de 59-64 kDa y una subunidad ligera de 14 kDa que contienen protoporfirina (Nauseef, W. M. y col., Blood 67: 1504-1507; 1986).

[0043] MPO es abundante en los neutrófilos y los monocitos, y supone el 5 %, y del 1 al 2 %, respectivamente, del peso en seco de estas células (Nauseef, W. M. y col., Blood 67: 1504-1507; 1986., (Hurst, J. K. En: Everse J.; Everse K.; Grisham M. B., eds. Peroxidases in chemistry and biology 1ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1991: 37- 62). La proteína hemo se almacena en gránulos azurófilos primarios de leucocitos y se secreta en el medio extracelular y el compartimento fagolisosómico después de la activación de fagocitos mediante una variedad de agonistas (Klebanoff, S. J. y col. The neutrophil: functions and clinical disorders. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co.; 1978).

[0044] En la fig. 12 se muestra un modelo cinético de trabajo propuesto recientemente para MPO. MPO es una proteína hemo compleja que posee múltiples estados intermedios, en cada uno de los cuales influye la disponibilidad de especies de oxígeno reducidas como O_2^- y H_2O_2 , y óxido nítrico (NO, monóxido de nitrógeno) (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000). En estado fundamental, MPO existe en la forma férrica (Fe(III)). Al añadir de H_2O_2 , el grupo hemo de MPO se oxida mediante dos e^- equivalentes que forman un catión π ferrilo reactivo intermedio denominado Compuesto I. En presencia de haluros como Cl^- , Br^- e I^- , y el pseudohaluro tiocianato (SCN^-), el Compuesto I se reduce fácilmente en una etapa única de dos e^- , regenerando MPO-Fe(III) y el ácido hidroxaloso correspondiente (HOX). En niveles de plasma de haluros y tiocianato (100 mM Cl^- 100 mM Br^- , 50 mM SCN^- , 100 nM r, cloruro es un sustrato preferido y se forma ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante de cloración (Foote, C. S. y col.; Nature 301: 715-726; 1983., Weiss, S. J., y col., J. Clin. Invest. 70: 598-607; 1982).

[0045] El compuesto I también puede oxidar numerosos sustratos orgánicos mientras el hemo experimenta dos etapas secuenciales de reducción de e^- para generar el compuesto II y MPO-Fe(III), respectivamente (fig. 12). Los compuestos de bajo peso molecular sirven principalmente como sustratos para MPO, generando oxidantes que pueden difundirse y especies de radicales libres que pueden transportar seguidamente el potencial oxidante del hemo a dianas distantes. Además de haluros y SCN^- , algunos de los sustratos de ocurrencia natural para MPO incluyen nitrito (NO_2^-) (van der Vliet, A., y col., J. Biol. Chem. 272: 7617-7625; 1997), tirosina (van der Vliet, A., y col., J. Biol. Chem. 272: 7617-7625; 1997), ascorbato (Marquez, L. A., y col., J. Biol. Chem. 265: 5666-5670; 1990), urato (Maehly, H. C. Methods Enzymol. 2: 798-801; 1955), catecolaminas (Metodiewa, D., y col., Eur. J. Biochem. 193: 445-448; 1990), estrógenos (Klebanoff, S. J. J. Exp. Med. 145: 983-998; 1977), y serotonina (Svensson, B. E. Chem. Biol. Interact. 70: 305-321; 1989). MPO-Fe(III) puede reducirse también a una forma ferrosa inactiva, MPO-Fe(II) (Hurst, J. K. En: Everse J.; Everse K.; Grisham M. B., eds. Peroxidases in chemistry and biology 1ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1991: 37-62., (Kettle, A. J., y col., Redox. Rep. 3: 3-15; 1997). MPO-Fe(III) y MPO-Fe(II) se unen a $O_2^{\cdot-}$, y O_2 , respectivamente, para formar un producto intermedio dioxi ferroso, el compuesto III (MPO-Fe(II)- O_2) (fig. 12). Los estudios espectrales muestran que la adición de H_2O_2 al Compuesto III forma en última instancia el compuesto II. Así, el compuesto III puede promover indirectamente reacciones de peroxidación e^- .

[0046] Estudios recientes identifican un papel para NO, un radical libre de vida relativamente larga generado por la óxido nítrico sintasa (NOS), en la modulación de la actividad MPO peroxidasa (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000). MPO y la isoforma inducible de NOS se colocalizan en el gránulo primario de los leucocitos. Durante la activación de fagocitos, por ejemplo durante la ingestión de bacterias, MPO y NOS son secretados en el fagolisosoma y compartimentos extracelulares, y se observa nitración de proteínas bacterianas (Evans, T. J., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9553-9558; 1996). Estudios de cinética rápida muestran que para bajos niveles de NO, la velocidad inicial de peroxidación catalizada por MPO de sustratos se mejora. El mecanismo consiste en la aceleración de la etapa de limitación de velocidad en la catálisis de MPO, la reducción de compuesto II a MPO-Fe(III) (fig. 1) (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000, Abu-Soud, H. M., y col. El óxido nítrico es un sustrato fisiológico para peroxidases de animales mamíferos. J. Biol. Chem. 275: 37524-37532, 2000). A niveles superiores de NO, tiene lugar una inhibición reversible de MPO a través de la formación de un complejo de nitrosilo espectroscópicamente distinguible, MPO-Fe(III)-NO (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000). NO también puede servir como un sustrato para compuesto I de MPO, lo que produce su reducción a Compuesto II (Id).. Además, en presencia de NO, la velocidad global de conversión de MPO a través del ciclo de la peroxidasa se potencia casi 1.000 veces (Id.). Finalmente, NO también se une de forma reversible a MPOFe(II) para formar el producto intermedio MPO-Fe(II)-NO correspondiente, que está en equilibrio con MPO-Fe(II) y MPO-Fe(III)-NO (fig. 1) (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000., Abu-Soud, H. M., y

col. El óxido nítrico es un sustrato fisiológico para peroxidasas de animales mamíferos. J. Biol. Chem. 275: 37524-37532, 2000).

[0047] Según se describe anteriormente, MPO puede utilizar una diversidad de cosustratos con H_2O_2 para generar oxidantes reactivos como productos intermedios. Muchos productos finales estables generados por estas especies han sido caracterizados y muestran estar enriquecidos en proteínas, lípidos y LDL recuperados de lesiones ateroscleróticas humanas (Chisolm, G. M., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11452- 11456; 1994, Hazell, L. J., y col., J. Clin. Invest. 97: 1535-1544; 1996, Hazen, S. L., y col., J. Clin. Invest. 99: 2075-2081; 1997, Leeuwenburgh, C., y col., J. Biol. Chem. 272: 1433-1436; 1997, Leeuwenburgh, C., y col., J. Biol. Chem. 272: 3520-3526; 1997). La fig. 13 resume algunos de los productos intermedios reactivos y los productos formados por MPO, de cualquiera de los cuales se sabe que están enriquecidos en lesiones vasculares.

MUESTRAS BIOLÓGICAS

[0048] Las muestras biológicas adecuadas útiles para predecir o llevar un seguimiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto o para valorar el efecto de los agentes terapéuticos en sujetos con enfermedad cardiovascular incluyen muestras de sangre entera y muestras de fracciones sanguíneas, incluyendo suero y plasma. La muestra puede ser sangre nueva o sangre almacenada (por ejemplo en un banco de sangre) o fracciones sanguíneas. La muestra puede ser una muestra de sangre obtenida expresamente para los ensayos de esta invención o una muestra de sangre obtenida para otro fin que pueda ser submuestreada para los ensayos de esta invención. Según la invención, la muestra se limita a sangre, plasma o suero.

[0049] En una forma de realización, la muestra biológica es sangre entera. La sangre entera puede obtenerse del sujeto usando procedimientos clínicos estándar. En otra forma de realización, la muestra biológica es plasma. El plasma puede obtenerse de muestras de sangre entera por centrifugación de sangre anticoagulada. Dicho procedimiento proporciona una capa leucocitaria de componentes de leucocitos y un sobrenadante del plasma. En otra forma de realización, la muestra biológica es suero. El suero puede obtenerse por centrifugación de muestras de sangre entera que se han recogido en tubos que están libres de anticoagulante. Se deja que la sangre se coagule antes de la centrifugación. El fluido amarillento-rojizo que se obtiene por centrifugación es el suero.

[0050] La muestra puede ser pretratada en caso necesario por dilución en una solución tampón apropiada, heparinizada, concentrada si se desea, o fraccionada por cualquier serie de procedimientos que incluyen pero no se limitan a ultracentrifugación, fraccionamiento por cromatografía líquida de rápido rendimiento (FPLC), o precipitación de apolipoproteína B que contiene proteínas con sulfato de dextrano u otros procedimientos. Puede usarse cualquiera de una serie de soluciones tampón acuosas estándar, que emplean uno entre una variedad de tampones, como fosfato, Tris, o similares, a pH fisiológico.

SUJETOS

[0051] El sujeto es cualquier ser humano u otro animal que se someterá a prueba para caracterizar su riesgo de ECV. En ciertas formas de realización, el sujeto no tiene un riesgo elevado de un episodio cardiovascular adverso. Entre los sujetos que tienen un riesgo elevado de un episodio cardiovascular adverso se incluyen aquellos con antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, con lípidos elevados, fumadores, episodio cardiovascular agudo anterior, etc. (Véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Experimental Medicine, 15ª edición, McGraw-Hill, Inc., N.Y., en lo sucesivo "Harrison").

[0052] En ciertas formas de realización el sujeto es un no fumador aparentemente sano. "Aparentemente sano", según se usa en la presente memoria descriptiva, significa individuos a los que previamente no se ha diagnosticado ningún signo o síntoma que indique la presencia de aterosclerosis, como angina de pecho, antecedentes de un episodio cardiovascular adverso agudo como infarto de miocardio o ictus, evidencia de aterosclerosis por procedimientos de estudios de imagen diagnósticos que incluyen, pero no se limitan a, angiografía coronaria. Los individuos aparentemente sanos no muestran tampoco síntomas de otras enfermedades. En otras palabras, dichos individuos, si son examinados por un profesional médico, serían caracterizados como sanos y sin síntomas de enfermedad. "No fumador" significa un individuo que, en el momento de la evaluación, no es fumador. Esto incluye a individuos que nunca han fumado, así como a individuos que han fumado en el pasado pero en la actualidad ya no fuman.

INMUNOENSAYOS PARA DETERMINAR LOS NIVELES DE HDL, APOA-I Y FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE APOA-I OXIDADOS

[0053] Los niveles de apoA-I oxidada, y fragmentos peptídicos de apoA-I en la muestra biológica pueden determinarse usando anticuerpos policlonales o monoclonales que son inmunorreactivos con dicha biomolécula oxidada. Por ejemplo, los anticuerpos inmunoespecíficos para nitrotirosina que contienen fragmentos peptídicos de apoA-I pueden prepararse y marcarse usando procedimientos estándar y emplearse a continuación en inmunoensayos para detectar la presencia de dicha nitrotirosina que contiene péptido de apoA-I en la muestra. Entre los inmunoensayos adecuados se incluyen, por ejemplo, radioinmunoensayos, tanto en fase sólida como líquida,

ensayos ligados a fluorescencia, inmunoensayos competitivos o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas. En ciertas formas de realización, los inmunoensayos se usan también para cuantificar la cantidad de la biomolécula oxidada que está presente en la muestra.

5 **[0054]** Los anticuerpos monoclonales preparados contra las especies de polipéptido oxidadas seleccionadas se producen según procedimientos establecidos. Generalmente, la proteína apoA-I oxidada o el fragmento peptídico de apoA-I se usan para inmunizar a un animal hospedador.

10 **[0055]** Entre los animales hospedadores adecuados se incluyen, pero no se limitan a, conejos, ratones, ratas, cabras y cobayas. Pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica en el animal hospedador. El adyuvante usado depende, al menos en parte, de la especie hospedadora. Dichos animales producen poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos, que se refieren como anticuerpos policlonales y que pueden obtenerse de los sueros de los animales inmunizados.

15 **[0056]** Los anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de un anticuerpo que se unen a un antígeno en particular, se obtienen a partir de líneas celulares continuas. Las técnicas convencionales para producir anticuerpos monoclonales son la técnica del hibridoma de Kohler y Millstein (Nature 356: 495-497 (1975)) y la técnica del hibridoma de células B humanas de Kosbor y col. (Immunology Today 4: 72 (1983)). Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluidas IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier clase de las mismas. Se describen procedimientos para preparar anticuerpos contra aminoácidos modificados, como, por ejemplo, 3-nitrotirosina en Ye, Y. Z., M. Strong, Z. Q. Huang, y J. S. Beckman. 1996. Antibodies that recognize nitrotyrosine. Methods Enzymol. 269: 201-209.

PREPARACIÓN DE ANTICUERPOS

25 **[0057]** La proteína apoA-I oxidada o el fragmento peptídico de apoA-I oxidada pueden usarse como un inmunógeno para producir anticuerpos inmunoespecíficos para la proteína o el fragmento peptídico oxidados. El término "inmunoespecífico" significa que los anticuerpos tienen una afinidad sustancialmente mayor para la proteína apoA-I oxidada o el fragmento peptídico de apoA-I que para otras proteínas o polipéptidos, incluyendo la proteína apoA-I o el fragmento peptídico de apoA-I no oxidadas. Dichos anticuerpos pueden incluir, pero no se limitan a, los policlonales, monoclonales, quiméricos, monocatenarios y fragmentos Fab.

35 **[0058]** Los fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada tienen al menos tres aminoácidos de longitud y comprenden una secuencia de proteínas de apoA-I modificada, es decir, el péptido comprende una secuencia que, a excepción de la presencia de un aminoácido oxidado, en particular un residuo de tirosina oxidado, es idéntica a una secuencia en SEQ ID NO. 1. Los fragmentos peptídicos de apoA-I pueden tener 3 aminoácidos de longitud. En otras formas de realización, el fragmento peptídico de apoA-I tiene 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos de longitud. En otras formas de realización, el fragmento peptídico de apoA-I tiene 11-20, 21-30, 31-40, 41-50, 51-60, 61-70, 71-80, 81-90, 91-100, 101-110, 111-120, 121-130, 131-140, 141-150, 151-160, 161-170, 171-180, 181-190, 191-200, 201-210, 211-220, 221-230 ó 231-242 aminoácidos de longitud.

45 **[0059]** Los péptidos que tienen menos de 6 aminoácidos de longitud se fusionan convencionalmente con los de otra proteína como, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana y molécula quimérica de anticuerpo. En el inmunógeno pueden usarse también fragmentos más grandes, por ejemplo, fragmentos peptídicos de apoA-I que tienen de 6 a 242 aminoácidos de longitud. La estructura de fragmentos inmunógenos mayores de la proteína apoA-I pueden determinarse usando programas de software, por ejemplo el programa MacVector, para determinar la hidrofilia y la hidrofobia y elucidar regiones de la proteína que probablemente estarán presentes en la superficie de la molécula.

50 **[0060]** Los anticuerpos policlonales se generan usando técnicas convencionales mediante administración de la proteína apoA-I o el fragmento peptídico de apoA-I. o apoA-I para un animal hospedador. Dependiendo de la especie hospedadora, pueden usarse varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica. Entre los adyuvantes usados en seres humanos son preferibles especialmente Bacilli-Calmette-Guerin (BCG) y *Corynebacterium parvum*. También se usan protocolos convencionales para recoger sangre de los animales inmunizados y para aislar el suero y/o la fracción IgG de la sangre.

60 **[0061]** Para preparación de anticuerpos monoclonales, se usan técnicas de hibridoma convencionales. Dichos anticuerpos son producidos por líneas celulares continuas. Entre las técnicas adecuadas para preparar anticuerpos monoclonales se incluyen, pero no se limitan a, la técnica de hibridoma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma EBV.

[0062] Pueden usarse diversos inmunoensayos para el cribado con el fin de identificar anticuerpos que tengan la especificidad deseada. Entre ellos se incluyen protocolos que implican ensayos de unión competitiva o inmunoradiométricos e implican normalmente la medida de formación compleja entre el polipéptido de apoA-I oxidada respectivo y el anticuerpo.

[0063] Los presentes anticuerpos pueden usarse para detectar la presencia o medir la cantidad de apoA-I oxidada y fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada en una muestra biológica del sujeto. El procedimiento comprende la puesta en contacto de una muestra tomada del individuo con uno o más de los presentes anticuerpos; y el ensayo para la formación de un complejo entre el anticuerpo y una proteína o péptido en la muestra. Para facilidad de detección, el anticuerpo puede fijarse a un sustrato como una columna, una placa de plástico, una matriz o una membrana, preferentemente nitrocelulosa. La muestra puede ser un tejido o un fluido biológico, lo que incluye orina, sangre entera o exudado, preferentemente suero. La muestra puede estar sin tratar, o someterse a precipitación, fraccionamiento, separación o purificación antes de su combinación con el anticuerpo. Las interacciones entre anticuerpos en la muestra y la proteína o péptido aislados se detectan por medios radiométricos, colorimétricos o fluorométricos, separación según tamaño o precipitación. Preferentemente, la detección del complejo anticuerpo-proteína o péptido es por adición de un anticuerpo secundario que se acopla a una etiqueta detectable, como, por ejemplo, una enzima, un fluoróforo o un cromóforo. La formación del complejo es indicativa de la presencia de apoA-I o fragmentos peptídicos de apoA-I en la muestra biológica del individuo.

[0064] En ciertas formas de realización, el procedimiento emplea un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) o un procedimiento de inmunotransferencia Western.

PROCEDIMIENTOS ADICIONALES PARA MEDIR LA APOA-I OXIDADA Y LOS FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE APOA-I OXIDADA.

[0065] También pueden usarse procedimientos basados en espectrometría de masas (por ejemplo LC/ESI/MS/MS) para valorar los niveles de apoA-I oxidada y fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada en la muestra biológica según se muestra en los ejemplos mostrados a continuación. Dichos procedimientos son estándar en la técnica e incluyen, por ejemplo, HPLC con espectrometría de masas en tándem de ionización de electropulverización en línea. Los péptidos de digesta triptica estándar sintéticos para formas originales (no modificadas) y modificadas (nitradas, cloradas) pueden prepararse fácilmente con sintetizadores de péptidos automatizados usando aminoácidos modificados fmoc disponibles comercialmente. Las moléculas originales, es decir, la apoA-I y los fragmentos peptídicos de apoA-I no modificados, tendrán masas diferentes que las moléculas oxidadas debido a las fracciones añadidas, por ejemplo, la fracción de NO₂ o Cl⁻ añadida). Así, podrían obtenerse diferentes transiciones de iones originales-derivados para cada péptido. La adición del grupo nitro a Tyr cambia el pKa del fenoxihidrógeno en la Tyr de 10 a 7. Así, las diferencias de carga y los cambios de polaridad entre péptido modificado y no modificado tienen también una alta probabilidad de mostrar distintos tiempos de retención en HPLC.

VALOR DE CONTROL

[0066] Los niveles de la apoA-I y/o el polipéptido de apoA-I oxidadas en la muestra biológica obtenida del sujeto de prueba pueden compararse con un valor de control. El valor de control se basa en niveles de, apoA-I oxidada, y/o apoA-I, respectivamente, en muestras comparables obtenidas de una población de control, por ejemplo, la población general o una población seleccionada de sujetos humanos. Por ejemplo, la población seleccionada puede estar formada por sujetos aparentemente sanos. "Aparentemente sano", según se usa en la presente memoria descriptiva, significa individuos que anteriormente no han tenido ningún signo o síntoma que indique la presencia de aterosclerosis, como angina de pecho, historia de un episodio cardiovascular adverso agudo como un infarto de miocardio o ictus, evidencia de aterosclerosis por procedimientos de diagnóstico por imagen que incluyen, pero no se limitan a, angiografía coronaria. Los individuos aparentemente sanos tampoco muestran otros síntomas de enfermedad. En otras palabras, dichos individuos, si son examinados por un profesional médico, serían caracterizados como sanos y sin síntomas de enfermedad. En otro ejemplo, el valor de control puede obtenerse de una población de no fumadores aparentemente sanos. "No fumadores", según se usa en la presente memoria descriptiva, significa un individuo que, en el momento de la evaluación, no es fumador. Esto incluye a individuos que nunca han fumado, así como a individuos que han fumado en el pasado pero en la actualidad ya no fuman. Una población de no fumadores aparentemente sanos puede tener un intervalo normal diferente de apoA-I y/o fragmento peptídico de apoA-I oxidadas que el que tendrá una población fumadora o una población cuyos miembros han sufrido un trastorno cardiovascular anterior. En consecuencia, los valores de control seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en que se encuadra el sujeto de prueba. Las categorías apropiadas pueden seleccionarse con sólo experimentación rutinaria por parte de los expertos en la materia.

[0067] El valor de control está relacionado con el valor usado para caracterizar el nivel del polipéptido oxidado obtenido del sujeto de prueba. Así, si el nivel del polipéptido oxidado es un valor absoluto como, por ejemplo, las unidades de apoA-I oxidada por ml de sangre, el valor de control se basa también en las unidades de apoA-I oxidada por ml de sangre en individuos en la población general o una población seleccionada de sujetos humanos. Análogamente, si el nivel de la apoA-I oxidada, o fragmento peptídico de apoA-I es un valor representativo como, por ejemplo, una unidad arbitraria obtenida de un citograma, el valor de control también se basa en el valor representativo.

[0068] El valor de control puede tomar una diversidad de formas. El valor de control puede ser un valor de corte único, como una mediana o una media. El valor de control puede establecerse basándose en grupos comparativos como cuando el riesgo en un grupo definido es doble que el riesgo en otro grupo definido. Los valores

de control pueden dividirse por igual (o de forma desigual) en grupos, como grupo de bajo riesgo, grupo de riesgo medio y grupo de alto riesgo, o en cuadrantes, siendo el cuadrante mínimo el de individuos con el menor riesgo y siendo el cuadrante máximo el de los individuos con el riesgo más elevado, y el riesgo del sujeto de prueba de tener ECV puede basarse en el grupo en el que se sitúa su valor de prueba.

[0069] Los valores de control de apoA-I y/o fragmento peptídico de apoA-I oxidadas en muestras biológicas obtenidas, como, por ejemplo, niveles medios, niveles de mediana o niveles de "corte", se establecen sometiendo a ensayo una gran muestra de individuos en la población general o la población seleccionada y usando un modelo estadístico como el procedimiento de valores predictivos para seleccionar un criterio de positividad o una curva característica de operador receptor que define la especificidad (máxima tasa negativa verdadera) y la sensibilidad (máxima tasa positiva verdadera) óptimas según se describe en Knapp, R.G., y Miller, M.C. (1992). *Clinical Epidemiology and Biostatistics*. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, PA. Puede determinarse un valor de "corte" para cada predictor de riesgo que se somete a ensayo. El procedimiento estandarizado usado en el Ejemplo 1 mostrado posteriormente emplea el ensayo de oxidación de guayacol según se describe en Klebanoff, S.J., Waltersdorph, A.N. y Rosen, H. 1984. "Antimicrobial activity of myeloperoxidase". *Methods in Enzymology*. 105: 399-403).

COMPARACIÓN DE LA BIOMOLÉCULA OXIDADA DEL SUJETO DE PRUEBA CON EL VALOR DE CONTROL

[0070] Los niveles de cada biomolécula oxidada seleccionada, es decir, apoA-I oxidada, o fragmento polipeptídico apoA-I oxidada en la muestra biológica del individuo pueden compararse con un único valor de control o con un intervalo de valores de control. Si el nivel del presente predictor de riesgo en la muestra biológica del sujeto de prueba es mayor que el valor de control o supera o está en el intervalo superior de valores de control, el sujeto de prueba presenta un riesgo mayor de desarrollar o de tener ECV que los individuos con niveles comparables al o por debajo del valor de control o en el intervalo inferior de valores de control. En cambio, si los niveles del presente predictor de riesgo en la muestra biológica del sujeto de prueba están por debajo del valor de control o están en el intervalo inferior de valores de control, el sujeto de prueba presenta un riesgo menor de desarrollar o de tener ECV que los individuos cuyos niveles son comparables al o por encima del valor de control o que superan o están en el intervalo superior de valores de control. La magnitud de la diferencia entre los niveles del predictor de riesgo del sujeto de prueba niveles y el valor de control también es útil para caracterizar la magnitud del riesgo y, con ello, la determinación de los individuos que más se beneficiarían de ciertas terapias agresivas. En estos casos, cuando los intervalos de valores de control se dividen en una pluralidad de grupos, como los intervalos de valores de control para individuos en riesgo alto, riesgo medio y riesgo bajo, la comparación implica la determinación del grupo en el que se encuadra el nivel del sujeto de prueba del predictor de riesgo relevante.

[0071] Alternativamente, el nivel de biomolécula oxidada, es decir, apoA-I oxidada o fragmento peptídico de apoA-I oxidada, puede compararse con el nivel de un patrón interno oxidado en la muestra. Los ejemplos de patrones internos adecuados incluyen, pero no se limitan a, niveles de proteína total oxidada en la muestra o niveles de albúmina oxidada en la muestra.

[0072] Las presentes pruebas predictivas son útiles para determinar si y cuándo los agentes terapéuticos que son diana para prevención de ECV o para ralentización de la progresión de ECV deben o no deben prescribirse para un individuo. Por ejemplo, los individuos con valores de apoA-I oxidada por encima de un cierto valor de corte, o que están en el tercil o el cuartil superior de un "intervalo normal", podrían identificarse como aquellos que necesitan una intervención más agresiva con agentes de reducción de lípidos, cambios de estilo de vida, etc.

EVALUACIÓN DE AGENTES TERAPÉUTICOS DE ECV

[0073] También se proporcionan procedimientos para evaluar el efecto de agentes terapéuticos de ECV en individuos a los que se ha diagnosticado que tienen o están en riesgo de desarrollar ECV. Dichos agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, agentes antiinflamatorios, agentes de sensibilización de insulina, agentes hipertensivos, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetas, agentes fibrinolíticos, agentes de reducción de lípidos, inhibidores directos de trombina, inhibidor de ACAT, inhibidor de CDTP tioglitazona, inhibidores de receptores de glicoproteína IIb/IIIa, agentes dirigidos a elevar o alterar el metabolismo de HDL como apoA-I Milano o inhibidores de CETP (por ejemplo, torcetrapib), o agentes diseñados para actuar como HDL artificiales. Dicha evaluación comprende la determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica tomada del sujeto antes de la administración del agente terapéutico y un fluido biológico correspondiente tomado del sujeto después de la administración del agente terapéutico. Una disminución en el nivel de los marcadores de riesgo seleccionados en la muestra tomada después de la administración del agente terapéutico en comparación con el nivel de los marcadores de riesgo seleccionados en la muestra tomada antes de administración del agente terapéutico es indicativa de un efecto positivo del agente terapéutico en la enfermedad cardiovascular en el sujeto tratado.

KITS

[0074] También se describen kits para poner en práctica los presentes procedimientos. Dichos kits contienen

reactivos para valorar los niveles de apoA-I oxidada, fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada, HDL oxidada o combinaciones de los mismos en una muestra biológica. En un ejemplo, el reactivo es un anticuerpo que es inmuno-específico para apoA-I oxidada, o un fragmento peptídico de apoA-I oxidada, o ambos. En un ejemplo, el kit comprende también instrucciones para usar el reactivo en los presentes procedimientos. En otro ejemplo, el kit comprende información útil para determinar el riesgo de un sujeto de presentar enfermedad cardiovascular o una complicación. Los ejemplos de dicha información incluyen, pero no se limitan a, valores de corte, sensibilidades en valores de corte particulares, así como otro material impreso para caracterizar el riesgo basándose en el resultado del ensayo. En algunos ejemplos dichos kits pueden comprender también reactivos de control, por ejemplo, HDL oxidada, apoA-I oxidada y/o fragmentos peptídicos de apoA-I oxidada.

PROCEDIMIENTOS TERAPÉUTICOS

[0075] También se describen en la presente memoria descriptiva procedimientos para tratar a un sujeto para reducir el riesgo de un trastorno cardiovascular o una complicación de dicho trastorno. En una forma de realización, el procedimiento comprende la determinación de los niveles de una o más biomoléculas ligadas a apoA-I en una muestra corporal del sujeto, y en el que los niveles de la una o más biomoléculas ligadas a apoA-I son elevados en comparación con los niveles en muestras corporales comparables de una población de sujetos de control, administrando al sujeto un agente escogido entre un agente antiinflamatorio, un agente antitrombótico, un agente antiplaquetas, un agente fibrinolítico, un agente de reducción de lípidos, un inhibidor directo de trombina, un inhibidor de receptor de glicoproteína IIb/IIIa, un agente que se une a las moléculas de adhesión celular e inhibe la capacidad de los glóbulos blancos de fijarse a dichas moléculas, un bloqueante de los canales de calcio, un receptor beta-adrenérgico, un inhibidor de ciclooxigenasa-2, un inhibidor del sistema de la angiotensina y/o combinaciones de los mismos. El agente se administra en una cantidad eficaz para reducir el riesgo del sujeto de desarrollar un trastorno cardiovascular futuro.

[0076] Los agentes "antiinflamatorios" incluyen pero no se limitan a, Alclufenaco; Dipropionato de Alclometasona; Acetónido de algestona; Alfa-amilasa; Amcinafal; Amcinafida; Amfenaco sódico; Clorhidrato de amiprilosa; Anakinra; Anilolaco; Anitrazafeno; Apazona; Balsalazida disódica; Bendazaco; Benoxaprofeno; Clorhidrato de bencidamina; Bromelaina; Broperamol; Budesonida; Carprofeno; Cicloprofeno; Cintazona; Cliprofeno; Propionato de clobetasol; Butirato de clobetasona; Clopiraco; Propionato de cloticasona; Acetato de cormetasona; Cortodoxona; Deflazacort; Desonida; Desoximetasona; Dipropionato de dexametasona; Diclofenaco potásico; Diclofenaco sódico; Diacetato de diflorasona; Diflumidona sódica; Diflunisal; Difluprednato; Diftalona; Sulfóxido de dimetilo; Drocironida; Endrisona; Enlimomab; Enolicam sódico; Epirizol; Etodolaco; Etofenamato; Felbinaco; Fenamol; Fenbufeno; Fenclofenaco; Fencloraco; Fendosal; Fempipalona; Fentiazaco; Flazalona; Fluazacort; Ácido flufenámico; Flumizol; Acetato de flunisolida; Flunixinina; Flunixinina-meglumina; Fluocortin-butilo; Acetato de fluorometolona; Fluquazona; Flurbiprofeno; Fluretofenol; Propionato de fluticasona; Furaprofeno; Furobufeno; Halcinonida; Propionato de halobetasol; Acetato de halopredona; Ibufenaco; Ibuprofeno; Ibuprofeno aluminio; Ibuprofeno piconol; Ilonidap; Indometacina; Indometacina sódica; Indoprofeno; Indoxol; Intrazol; Acetato de isoflupredona; Isoxepaco; Isoxicam; Cetoprofeno; Clorhidrato de lofemizol; Lornoxicam; Etabonato de loteprednol; Meclofenamato sódico; Ácido meclofenámico; Dibutirato de meclorisona; Ácido mefenámico; Mesalamina; Meseclazona; Metilprednisolona Suleptanato; Morniflumato; Nabumetona; Naproxeno; Naproxeno sódico; Naproxol; Nimazona; Olsalazina sódica; Orgoteína; Orpanoxina; Oxaprozina; Oxifenbutazona; Clorhidrato de paranilina; Polisulfato de pentosán sódico; Glicerato de fenbutazona sódico; Pírfenidona; Píroxicam; Cinnamato de píroxicam; Píroxicam-olamina; Píroprofeno; Prednazato; Prifelona; Ácido prodólico; Proquazona; Proxazol; Citrato de proxazol; Rimexolona; Romazarit; Salcolex; Salmecidina; Salsalato; Salicilatos; Cloruro de sanguinario; Seclazona; Sermetacina; Sudoxicam; Sulindaco; Suprofenol; Talmetacina; Talniflumato; Talosalato; Tebufelona; Tenidap; Tenidap sódico; Tenoxicam; Tesicam; Tesimida; Tetridamina; Tiopinaco; Pivalato de tixocortol; Tohnetin; Tohnetina sódica; Triclonida; Triflumidato; Zidometacina; Glucocorticoides; Zomepirac sódico.

[0077] Los agentes "antitrombóticos" y/o "fibrinolíticos" incluyen pero no se limitan a, Plasminógeno (a plasmina por medio de interacciones de precalicreína, cininógenos, factores KII, XIIIa, proactivador de plasminógeno y activador de plasminógeno tisular [TPA]) estreptocinasa; Urocinasa; Complejo activador de plasminógeno-estreptocinasa anisolatado; Pro-Urocinasa; (Pro-UK); rTPA (alteplasa o activasa; r denota recombinante); rPro-UK; Abbocinasa; Eminasa; Clorhidrato de estreptasa anagrelida; Bivalirrudina; Dalteparina sódica; Danaparoide sódico; Clorhidrato de dazoxibeno; Sulfato de efegatrán; Enoxaparina sódica; Ifetrobán; Ifetrobán sódico; Tinzaparina sódica; retaplaza; Trifenagrel; Warfarina; Dextranos.

[0078] Los agentes "antiplaqueta" incluyen, pero no se limitan a, Clopidogrel; Sulfpirazona; Aspirina; Dipiridamol; Clofibrato; Carbamato de piridinol; PGE; Glucagón; Fármacos de antiserotonina; Cafeína; Teofilina; Pentoxifilina; Ticlopidina; Anagrelida.

[0079] Los agentes de "reducción de lípidos" incluyen, pero no se limitan a, gemfibrozil, colistiramina, colestipol, ácido nicotínico, probucol lovastatina, fluvastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, cerivastatina y otros inhibidores de HMG-CoA reductasa.

[0080] Los "inhibidores directos de trombina" incluyen, pero no se limitan a, hirudina, hirugeno, hirulogo,

agatrobán, PPACK, aptámeros de trombina.

[0081] Los "inhibidores de receptores de glicoproteína IIb/IIIa" son anticuerpos y no anticuerpos, e incluyen, pero no se limitan a ReoPro (abcixamab), lamifibán, tirofiban.

[0082] Los "bloqueantes de los canales de calcio" son una clase químicamente diversa de compuestos que tienen valor terapéutico importante en el control de una diversidad de enfermedades que incluyen varios trastornos cardiovasculares, como hipertensión, angina y arritmias cardíacas (Fleckenstein, Cir. Res. v. 52, (supl. 1), pág. 13-16 (1983); Fleckenstein, Experimental Facts and Therapeutic Prospects, John Wiley, Nueva York (1983); McCall, D., Curr Pract Cardiol, v. 10, pág. 1-11 (1985)). Los bloqueantes de los canales de calcio son un grupo heterogéneo de fármacos que previenen o ralentizan la entrada de calcio en las células regulando los canales de calcio celulares. (Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Mack Publishing Company, Eaton, Pa., pág. 963 (1995)). La mayoría de los bloqueantes de los canales de calcio disponibles en la actualidad, y útiles según la presente invención, pertenecen a uno de tres grandes grupos químicos de fármacos, las dihidropiridinas, como nifedipina, las aminas fenilalquilicas, como verapamilo, y las benzotiazepinas, como diltiazem. Otros bloqueantes de los canales de calcio útiles según la invención incluyen, pero no se limitan a, amrinona, amlodipina, benciclano, felodipina, fendilina, flunarizina, isradipina, nicardipina, nimodipina, perhexileno, gallopamilo, tiapamilo y análogos de tiapamilo (coo 1993RO-11-2933), fenitofina, barbitúricos, y los péptidos dinorfina, omega-conotoxina y omega-agatoxina, y similares y/o sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0083] Los "agentes bloqueantes de receptores beta-adrenérgicos" son una clase de fármacos que antagonizan los efectos cardiovasculares de las catecolaminas en angina de pecho, hipertensión y arritmias cardíacas. Los bloqueantes de receptores beta-adrenérgicos incluyen, pero no se limitan a, atenolol, acebutolol, alprenolol, befunolol, betaxolol, bunitrolol, carteolol, celiprolol, hedroxalol, indenolol, labetalol, levobunolol, mepindolol, metipranolol, metindol, metoprolol, metrizoranolol, oxprenolol, pindolol, propranolol, practolol, practolol, sotalolnadolol, tiprenolol, tomalolol, timolol, bupranolol, penbutolol, trimepranol, 2-(3-(1,1-dimetiletil)-amino-2-hidroxiopropoxi)-3-piridencarbonitril-HCl, 1-butilamino-3-(2,5-diclorofenoxi)-2-propanol, 1-isopropilamino-3-(4-(2-ciclopropilmetoxietil)fenoxi)-2-propanol, 3-isopropilamino-1-(7-metilindan-4-iloxi)-2-butanol, 2-(3-t-butilamino-2-hidroxi-propilio)-4-(5-carbamoil-2-tienil)tiazol, 7-(2-hidroxi-3-t-butilaminopropoxi)ftaluro. Los compuestos identificados anteriormente pueden usarse como mezclas isoméricas, o en su forma levorrotatoria o dextrorrotatoria respectiva.

[0084] Los inhibidores de COX-2 adecuados incluyen, pero no se limitan a, los inhibidores de COX-2 descritos en la patente de EE.UU. n° 5.474.995 "Phenyl heterocycles as cox-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.521.213 "Diaryl bicyclic heterocycles as inhibitors of cyclooxygenase-2"; la patente de EE.UU. n° 5.536.752 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.550.142 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.552.422 "Aryl substituted 5,5 fused aromatic nitrogen compounds as anti-inflammatory agents"; la patente de EE.UU. n° 5.604.253 "N-benzylindol-3-yl propanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.604.260 "5-methanesulfonamido-1-indanones as an inhibitor of cyclooxygenase-2"; la patente de EE.UU. n° 5.639.780 "N-benzyl indol-3-yl butanoic acid derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.677.318 "Diphenyl-1,2,3-thiadiazoles as anti-inflammatory agents"; la patente de EE.UU. n° 5.691.374 "Diaryl-5-oxygenated-2-(5H)-furanones as COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.698.584 "3,4-diaryl-2-hydroxi-2,5-dihydrofurans as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.710.140 "Phenyl heterocycles as COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.733.909 "Diphenyl stilbenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.789.413 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.817.700 "Bisaryl cyclobutenes derivatives as cyclooxygenase inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.849.943 "Stilbene derivatives useful as cyclooxygenase-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.861.419 "Substituted pyridines as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.922.742 "Pyridinyl-2-cyclopenten-1-ones as selective cyclooxygenase-2 inhibitors"; la patente de EE.UU. n° 5.925.631 "Alkylated styrenes as prodrugs to COX-2 inhibitors"; todas las cuales son cedidas comúnmente a Merck Frosst Canada, Inc. (Kirkland, Calif).. Se describen también inhibidores de COX-2 adicionales en la patente de EE.UU. n° 5.643.933, cedida a G. D. Searle & Co. (Skokie, Ill), titulada: "Substituted sulfonylphenylheterocycles as cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase inhibitors."

[0085] Un "inhibidor del sistema de angiotensina" es un agente que interfiere con la función, síntesis o catabolismo de la angiotensina II. Estos agentes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), antagonistas de angiotensina II, antagonistas de receptor de angiotensina II, agentes que activan el catabolismo de angiotensina II, y agentes que impiden la síntesis de angiotensina I a partir de la cual se obtiene finalmente la angiotensina II. El sistema renina-angiotensina interviene en la regulación de la hemodinámica y el equilibrio de agua y electrolitos. Los factores que reducen el volumen sanguíneo, la presión de perfusión renal o la concentración de Na⁺ en plasma tienden a activar el sistema, mientras que los factores que aumentan estos parámetros tienden a suprimir su función.

[0086] Los inhibidores del sistema de la angiotensina (renina-angiotensina) son compuestos que actúan para interferir con la producción de angiotensina II a partir de angiotensinógeno o angiotensina I o interfieren con la actividad de angiotensina II. Dichos inhibidores son bien conocidos para los expertos en la materia e incluyen compuestos que actúan para inhibir las enzimas que intervienen en la producción final de angiotensina II, entre ellos

renina y ACE. También incluyen compuestos que interfieren con la actividad de angiotensina II, una vez producida. Algunos ejemplos de clases de dichos compuestos incluyen anticuerpos (por ejemplo, a renina), aminoácidos y análogos de los mismos (incluidos los conjugados en moléculas mayores), péptidos (que incluyen análogos de péptidos de angiotensina y angiotensina I), análogos relacionados con prorrénina, etc. Entre los inhibidores más potentes y útiles del sistema renina-angiotensina están los inhibidores de renina, los inhibidores de ACE y los antagonistas de angiotensina II.

[0087] Los ejemplos de antagonistas de angiotensina II incluyen: compuestos peptídicos (por ejemplo, saralasin, [(San1)(Val5)(Ala8)] angiotensina-(1-8) octapéptido y análogos relacionados); imidazol-2-ona sustituido en N (patente de EE.UU. n° 5.087.634); derivados de acetato de imidazol que incluyen ácido 2-N-butil-4-cloro-1-(2-clorobencil)imidazol-5-acético (véase Long y col., J. Pharmacol. Exp. Ther. 247(1), 1-7 (1988)); ácido 4,5,6,7-tetrahidro-1H-imidazo[4, 5-c]piridin-6-carboxílico y derivados análogos (patente de EE.UU. n° 4.816.463); análogos de N2-tetrazol-beta-glucuronida (patente de EE.UU. n° 5.085.992); pirroles, pirazoles y triazoles sustituidos (patente de EE.UU. n° 5.081.127); fenol y derivados heterocíclicos como 1,3-imidazoles (patente de EE.UU. n° 5.073.566); heterociclos imidazo-fusionados de 7 anillos (patente de EE.UU. n° 5.064.825); péptidos (por ejemplo, patente de EE.UU. n° 4.772.684); anticuerpos para angiotensina II (por ejemplo, patente de EE.UU. n° 4.302.386); y compuestos de aralkilimidazol como imidazoles bifenil-metil sustituidos (por ejemplo, EP número 253.310, 20 de enero de 1988); ES8891 (N-morfolinoacetil-(1-naftil)-L-alanil-(4-tiazolil)-L-alanil(35,45)-4-amino-3-hidroxi-5-ciclohexapentanoil-N-hexilamida, Sankyo Company, Ltd., Tokio, Japón); SKF108566 (ácido E-alfa-2-[2-butil-1-(carboxifenil)metil] 1H-imidazol-5-il[metilan]-2-tiofenepropanoico, Smith Kline Beecham Pharmaceuticals, Pa.); Losartan (DUP753IMK954, DuPont Merck Pharmaceutical Company); Remikirin (R042-5892, F. Hoffman LaRoche AG); agonistas A₂ (Marion Merrill Dow) y ciertos heterociclos no peptídicos (G. D. Searle and Company). Las clases de compuestos que, según se sabe, son útiles, como inhibidores de ACE, incluyen acilmercapto y mercaptoalcanoilprolinas como captopril (patente de EE.UU. n° 4.105.776) y zofenopril (patente de EE.UU. n° 4.316.906), dipéptidos de carboxialquilo como enalapril (patente de EE.UU. n° 4.374.829), lisinopril (patente de EE.UU. número 4.374.829), quinapril (patente de EE.UU. n° 4.344.949), ramipril (patente de EE.UU. n° 4.587.258) y perindopril (patente de EE.UU. n° 4.508.729), emuladores de dipéptidos de carboxialquilo como cilazapril (patente de EE.UU. n° 4.512.924) y benazapril (patente de EE.UU. n° 4.410.520), fosfinilalcanoilprolinas como fosinopril (patente de EE.UU. n° 4.337.201) y trandolopril.

[0088] Ejemplos de inhibidores de renina que son el sujeto de patentes de Estados Unidos son los siguientes: derivados de urea de péptidos (patente de EE.UU. n° 5.116.835); aminoácidos conectados a enlaces no peptídicos (patente de EE.UU. n° 5.114.937); derivados de di y tripéptidos (patente de EE.UU. n° 5.106.835); aminoácidos y derivados de los mismos (patente de EE.UU. n° 5.104.869 y 5.095.119); diolsulfonamidas y sulfínilos (patente de EE.UU. n° 5.098.924); péptidos modificados (patente de EE.UU. n° 5.095.006); peptidil-beta-aminoacilaminodiol-carbamatos (patente de EE.UU. n° 5.089.471); pirolimidazolonas (patente de EE.UU. n° 5.075.451); flúor y cloro estatina o péptidos que contienen estatona (patente de EE.UU. n° 5.066.643); peptidilaminodiolos (patente de EE.UU. n° 5.063.208 y 4.845.079); derivados de N-morfolino (patente de EE.UU. n° 5.055.466); derivados de pepstatina (patente de EE.UU. n° 4.980.283); alcoholes N-heterocíclicos (patente de EE.UU. n° 4.885.292); anticuerpos monoclonales a renina (patente de EE.UU. n° 4.780.401); y una variedad de otros péptidos y análogos de los mismos (patente de EE.UU. n° 5.071.837, 5.064.965, 5.063.207, 5.036.054, 5.036.053, 5.034.512 y 4.894.437).

[0089] En ciertos ejemplos, los sujetos de prueba son sujetos aparentemente sanos libres por lo demás de una necesidad actual de tratamiento con el agente prescrito según la presente invención. Por ejemplo, si el tratamiento con un agente en particular se produce basándose en niveles elevados de biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I, entonces el paciente está libre de síntomas que requieran tratamiento con ese agente (o la categoría de agente en la que se encuadra el agente), aparte del síntoma de tener niveles elevados de biomoléculas ligadas a apoA-I. En algunos ejemplos, el sujeto está libre por lo demás de síntomas que requieran tratamiento con una cualquiera de cualquier combinación de o la totalidad de las categorías anteriores de agentes. Por ejemplo, con respecto a agentes antiinflamatorios, el sujeto está libre de síntomas de artritis reumatoide, dolor crónico de espalda, enfermedades autoinmunes, enfermedades vasculares, enfermedades víricas, malignidades, y similares. En otro ejemplo, el sujeto no presenta un riesgo elevado de un episodio cardiovascular adverso (por ejemplo, sujeto sin antecedentes familiares de estos episodios, sujetos que son no fumadores, sujetos que son no hiperlipidémicos, sujetos que no tienen niveles elevados de un marcador inflamatorio sistémico), aparte de tener un nivel elevado de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I.

[0090] En algunos ejemplos el sujeto es un sujeto no hiperlipidémico. Un "no hiperlipidémico" es un sujeto que es un sujeto no hipercolesterolémico y/o no hipertrigliceridémico. Un sujeto "no hipercolesterolémico" es aquel que no cumple los criterios actuales establecidos para un sujeto hipercolesterolémico. Un sujeto no hipertrigliceridémico es aquel que no cumple los criterios actuales establecidos para un sujeto hipertrigliceridémico (Véase, por ejemplo, Harrison's Principles of Experimental Medicine, 15ª edición, McGraw-Hill, Inc., N.Y. — en lo sucesivo "Harrison"). Los sujetos hipercolesterolémicos y los sujetos hipertrigliceridémicos se asocian a una mayor incidencia de cardiopatía coronaria prematura. Un sujeto hipercolesterolémico tiene un nivel de LDL de > 160 mg/dL, o > 130 mg/dL y al menos dos factores de riesgo seleccionados entre el grupo que consiste en sexo masculino, antecedentes familiares de cardiopatía coronaria prematura, fumador de cigarrillos (más de 10 al día), hipertensión,

baja HDL (< 35 mg/dL), diabetes mellitus, hiperinsulinemia, obesidad abdominal, alta lipoproteína (a) e historia personal de enfermedad cerebrovascular o enfermedad vascular periférica oclusiva. Un sujeto hipertriglicéridémico tiene un nivel de triglicéridos (TG) de > 250 mg/dL. Así, un sujeto no hiperlipidémico se define como aquel cuyos niveles de colesterol y triglicéridos están por debajo de los límites establecidos según se describe anteriormente para los sujetos hipercolesterolémicos e hipertriglicéridémicos.

EJEMPLOS

A. ESTUDIOS DE PROTEÍNAS

Materiales

[0091] L-[¹³C₆]tirosina y L-[¹³C₉, ¹⁵N₁]tirosina se adquirieron en Cambridge Isotopes Inc. (Andover, MA). Los medios de cultivo tisulares y los aditivos se adquirieron en Life Technologies (Gaithersburg, MD). Las células RAW264.7 se obtuvieron en la American Type Culture Collection (Rockville, MD). [³H]Colesterol se obtuvo en Amersham (Piscataway, NJ), y se resuspendió en etanol antes de su uso. Todos los demás reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) salvo que se indique lo contrario.

Procedimientos

[0092] *Procedimientos generales.* El peroxinitrito se sintetizó y cuantificó según se describe (Beckman, J.S., Chen, J., Ischiropoulos, H., y Crow, J.P. 1994. Oxidative chemistry of peroxynitrite. *Methods in Enzymology* 233: 229-240). L-3-[¹³C₆]nitrotirosina se sintetizó a partir de L-[¹³C₆]tirosina y peroxinitrito, y se aisló por HPLC de fase inversa para extraer el NO₂⁻ residual antes de su uso (Wu, W., Chen, Y., y Hazen, S.L. 1999. Eosinophil peroxidase nitrates protein tyrosyl residues. Implications for oxidative damage by nitrating intermediates in eosinophilic inflammatory disorders. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 25933-25944). El contenido de proteínas determinado por el ensayo de proteínas de Markwell-Lowry modificado (Markwell, M.A., Haas, S.M., Bieber, L.L., y Tolbert, N.E. 1978. A modification of the Lowry method to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Analytical Biochemistry*. 87: 206-210) con albúmina de suero bovino como patrón. La concentración de reactivo H₂O₂ determinada espectrofotométricamente ($\epsilon_{240} = 39,4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$; ref. (Nelson, D.P., y Kiesow, L.A. 1972. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*. 49: 474-478). La mieloperoxidasa (donador: peróxido de hidrógeno, oxidoreductasa, EC 1.11.1.7) se purificó inicialmente a partir de extractos de detergente de leucocitos humanos por afinidad de lectina secuencial y cromatografía por filtración de gel según se describe en Rakita (Rakita, R.M., Michel, B.R., y Rosen, H. 1990. Differential inactivation of *Escherichia coli* membrane dehydrogenases by a myeloperoxidase-mediated antimicrobial system. *Biochemistry*. 29: 1075-1080), y a continuación los niveles traza de peroxidasa de eosinófilos contaminantes se eliminan mediante el paso sobre una columna Sephadex de sulfopropilo (Wever, R., Plat, H., y Hamers, M.N. 1981. Human eosinophil peroxidase: a novel isolation procedure, spectral properties and chlorinating activity. *FEBS Letters*. 123: 327-331). La pureza de MPO aislada se estableció demostrando un RZ de > 0,84 (A_{430}/A_{280}), análisis SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie, y tinción de tetrametilbencidin-peroxidasa (van Dalen, C.J., Whitehouse, M.W., Winterbourn, C.C., y Kettle, A.J. 1997. Thiocyanate and chloride as competing substrates for myeloperoxidase. *Biochemical Journal*. 327: 487-492). La concentración de enzimas se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción de 89.000 M⁻¹cm⁻¹/hemo de MPO (Agner, K. 1972. Structure and function of oxidation-reduction enzymes. Tarrytown, NY: Pergamon Press. 329-335). La apoA-I deslipidada y purificada se adquirió en Biodesign International (Saco, ME) y se usó sin purificación adicional después de demostración de pureza mediante SDS-PAGE y análisis de tinción de plata, y ausencia de ácidos grasos libres importantes por HPLC con análisis de espectrometría de masas en tándem en línea (Zhang, R., Brennan, M.L., Shen, Z., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Molenda, C.E., y Hazen, S.L. 2002. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 46116-46122). Las lipoproteínas de baja densidad (LDL; 1,019 < d < 1,063 g/ml fracción) y las lipoproteína de alta densidad (HDL; 1,063 < d < 1,21 g/ml fracción) se aislaron de plasma nuevo mediante ultracentrifugación secuencial (Hatch, F.T. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. *Advances in Lipid Research* 6: 1-68). Las preparaciones finales se dializaron extensamente frente a fosfato de sodio 50 mM (pH 7,0), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 200 μM y se almacenó bajo N₂ hasta su uso. Las LDL se acetilaron con ácido acético anhídrido (Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K., y Brown, M.S. 1979. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 76: 333-337). Se realizó inmunotinción NO₂Tyr según se ha descrito (MacPherson, J.C., Comhair, S.A., Erzurum, S.C., Klein, D.F., Lipscomb, M.F., Kavuru, M.S., Samoszuk, M.K., y Hazen, S.L. 2001. Eosinophils are a major source of nitric oxide-derived oxidants in severe asthma: characterization of pathways available to eosinophils for generating reactive nitrogen species. *Journal of Immunology*. 166: 5763-5772). La especificidad de la inmunotinción para NO₂Tyr se confirmó mostrando pérdida de tinción (i) en estudios de competencia con nitrotirosina 10 mM presente durante incubaciones anticuerpo-antígeno; y (ii) con la reducción de la muestra con ditionita.

[0093] *Especímenes clínicos – Suero.* Para estudios que implican cuantificación dependiente de espectrometría de masas de proteína total en suero, contenido de apoA-I y apoB-100 de NO₂Tyr y CITyr, se

inscribieron pacientes en secuencia (n = 45) con enfermedad cardiovascular (ECV) que recibían atención en la Preventive Cardiology Clinic de la Cleveland Clinic Foundation y voluntarios sanos (n = 45) que respondieron a los anuncios. La ECV se definió clínicamente como enfermedad de la arteria coronaria, enfermedad de las arterias periféricas o enfermedad cerebrovascular. Los sujetos con ECV estaban estables y sin síntomas cardíacos. Los pacientes que habían sufrido infarto de miocardio o ictus en el plazo de un mes antes de la inscripción no pudieron ser escogidos. Los estudios que correlacionaban niveles de HDL de NO₂Tyr y CITyr con actividad de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 se realizaron en conjuntos de sujetos en secuencia separados (n = 12) que, según lo que se sabía, no recibieron atención (ECV) en la Preventive Cardiology Clinic. Todos los participantes ofrecieron su consentimiento informado por escrito y la Institutional Review Board de la Cleveland Clinic Foundation aprobó el protocolo de estudio. Las investigaciones clínicas se realizaron de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki. Se realizó una historia médica y una revisión de registros para definir factores de riesgo coronarios, entre ellos diabetes mellitus (definida por glucosa en sangre en ayunas > 125 mg/dl o medicamentos hipoglucémicos), hipertensión (presión arterial > 140/90 o medicamentos antihipertensivos en ausencia de enfermedad cardíaca conocida), antecedentes familiares de cardiopatía coronaria prematura (parientes de primer grado con cardiopatía coronaria antes de los 60 años por informe del sujeto), historia de hipercolesterolemia (colesterol LDL en ayunas > 160 mg/dl o medicamentos para reducción de lípidos en ausencia de cardiopatía conocida) y consumo de cigarrillos (cualquier hábito tabáquico en un plazo de 1 año de estudio). Se obtuvo una muestra de sangre en ayunas usando un tubo separador de suero. Se aisló el suero, se colocaron partes alícuotas en crioviales con suplemento de un cóctel antioxidante formado por hidroxitolueno butilado (100 µM final) y DTPA (2 mM final, pH 7,0), cubierto con argón y congelado al instante a -80 °C hasta el momento del análisis.

[0094] *Purificación de inmunoafinidad de proteínas nitradas.* Se utilizó un kit de orientación de proteína A ImmunoPure (Pierce) para purificar por afinidad proteínas nitradas a partir de suero de albúmina/IgG deplecionado. En breve, se deplecionó suero humano (45 µl) a partir de albúmina y IgG usando el kit de depleción de albúmina ProteoPrep (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO) según la recomendación del fabricante. El anticuerpo antinitrotirosina purificado por afinidad preparado frente a un octapéptido sintético (Cys-Gly-NO₂Tyr-Gly-Gly-Gly-NO₂Tyr-Gly) se unió a proteína A y se reticuló con dimetilpimelidato. El suero del paciente de albúmina/IgG deplecionado se diluyó en NaCl 0,15 M, fosfato 0,1 M, pH 7,2, y se aplicó a la columna. Se eluyeron las fracciones de proteínas no ligadas con 20 ml de PBS, y 10 ml de NaCl 0,5 M. Se eluyeron las proteínas ligadas con 3-nitrotirosina 5 mM en NaCl 0,5 M. Las fracciones ligadas se concentraron usando dispositivos de filtro Centriprep (YM-10, Millipore), dializados frente a urea 0,1 M, y se secó hasta un pequeño volumen usando un concentrador Savant Instrument SpeedVac (Savant Instruments Inc., Holbrook, Nueva York). Se monitorizó la proteína en las fracciones con ensayo de ácido bicinchonínico (Pierce), usando BSA como patrón.

[0095] *SDS-PAGE 2D.* Después de diálisis, se añadieron aproximadamente 50 µg de proteína a 155 µl de tampón de rehidratación de muestra y se absorbió durante toda la noche en tiras de 7 cm de pH 3-10 IPG ZOOM no lineales (Invitrogen). Se efectuó enfoque electrofórico usando el sistema ZOOM IPG de Invitrogen y la fuente de alimentación Biorad 3000V usando el siguiente protocolo de etapas de tensión: 100 V durante 30 min, 200 V durante 20 min, 450 V durante 15 min, 750 V durante 15 min y 2.000 V durante 30 min. Para la segunda dimensión, se equilibraron tiras IPG enfocadas en tampón de muestra LDS (Invitrogen) en presencia de agente de reducción de muestra NUPAGE (Invitrogen) durante 15 min, y una incubación adicional en tampón de muestra LDS en presencia de yodoacetamida 125 mM durante 15 min. Se colocaron las tiras en geles bis-tris al 4-12 % y se embebieron en agarosa al 0,5 % (p/v). Se tiñeron los geles para proteína usando tinción de azul coloidal o de plata. Para geles de inmunotransferencia se transfirieron a membranas Immun-Blot PVDF de 0,2 µm (Bio-Rad, Hercules, CA).

[0096] *Especímenes clínicos - Tejido.* Se aislaron partículas de tipo LDL y HDL de lesiones ateroscleróticas de aortas y tejidos de arteria femoral obtenidos en autopsia (recogida de tejido en menos de 10 h desde la muerte). Los estudios de control para confirmar que los artefactos *post mortem* no eran importantes usaron tejidos vasculares (n = 5) obtenidos nuevos en el momento de cirugía vascular. Los tejidos aórticos humanos normales se obtuvieron de donantes para trasplante. Todos los tejidos se lavaron de inmediato en solución salina con tampón de fosfato enfriada en hielo con DPTA 100 µM y se congelaron de inmediato en Tampón A (fosfato de sodio 65 mM, pH 7,4, DTPA 100 µM, hidroxitolueno butilado 100 µM), en N₂ a -80 °C hasta análisis.

[0097] *Aislamiento de partículas de tipo LDL y HDL y caracterización a partir de tejidos aórticos humanos normales y lesiones ateroscleróticas humanas.* Se aislaron partículas de tipo LDL y HDL a partir de estrías grasas y lesiones intermedias de aortas torácicas humanas por ultracentrifugación de densidad secuencial (d = 1,019-1,070 g/ml fracción para "LDL de lesión", 1,063-1,21 g/ml fracción para "HDL de lesión") usando una modificación del procedimiento de Steinbrecher y Loughheed (Steinbrecher, U.P., y Loughheed, M. 1992. Scavenger receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by low density lipoprotein extracted from human aortic intima. *Arteriosclerosis & Thrombosis*. 12: 608-625) según se ha descrito (Krul, E.S., Tang, J., Kettler, T.S., Clouse, R.E., y Schonfeld, G. 1992. Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 189: 1069-1076). Análogamente se aislaron partículas de tipo "LDL aórtica de control" y "HDL aórtica de control" a partir de tejidos aórticos residuales libres de placas ateroscleróticas visibles de donantes de trasplante. Se incluyeron un agente de quelación metálico (DTPA 100 µM), un inhibidor de mieloperoxidasa (3-aminotriazol 10 mM) y un cóctel de proteasa formado por cóctel

inhibidor de proteasa PMSF y Sigma (nº catálogo P8340) en todas las soluciones usadas para aislamiento de lipoproteínas. Las LDL y HDL aórticas de control y de lesión se sometieron a SDS-PAGE (Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 680-685) con análisis de inmunotransferencia Western usando un antisuero apoB-100 antihumano de conejo (Hazen, S.L., y Heinecke, J.W. 1997. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *Journal of Clinical Investigation*. 99: 2075-2081), o apoA-I antihumano de cabra (Bioscience Resource Project, Saco, ME), respectivamente. El análisis de partículas de tipo LDL aórticas de control y de lesión con anticuerpo policlonal para apoB-100 detectó una proteína de 500 kDa, la masa de apolipoproteína intacta B100. Según se observó anteriormente (Krul, E.S., Tang, J., Kettler, T.S., Clouse, R.E., y Schonfeld, G. 1992. Lengths of truncated forms of apolipoprotein B (apoB) determine their intestinal production. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 189: 1069-1076), ambas formas de masa molecular menor y agregadas/reticuladas de proteína inmunorreactiva también estaban presentes en partículas de tipo LDL aisladas de tejidos vasculares. Se realizaron análisis Western similares en partículas de tipo HDL aórticas de control y de lesión usando anticuerpos para apoA-I, confirmando la presencia de apoA-I. El análisis de partículas de tipo LDL aórticas de control y de lesión mediante cromatografía de exclusión de tamaño de alta resolución (tándem Superose 6 y 12 columnas; Pharmacia LKB) mostró que la apoB-100 inmunorreactiva, el colesterol total y la mayoría de la masa de proteína mostraban un valor de M_r aparente similar al de LDL aislada de plasma. La identidad de apoA-I como un constituyente proteínico mayor presente en preparaciones de partículas de tipo HDL aórticas de control y de lesión también se consiguió mediante análisis de secuencia de MS en tándem después de escisión a partir de geles SDS-PAGE con tinción de azul de Coomassie.

[0098] Varios experimentos de control indicaron que era poco probable que los cambios *post mortem* contribuyeran a nitración y cloración de apoA-I. En primer lugar, los estudios de control se realizaron en tejidos arteriales frescos recogidos en el momento de cirugía vascular (para lesión) y recogida de órganos para trasplante (para tejidos arteriales normales/sin lesión). Se observaron niveles comparables de NO₂Tyr y ClTyr dentro de estos tejidos vasculares recogidos frescos, en comparación con los obtenidos en autopsia. En segundo lugar, después de la generación de tejidos aórticos en polvo usando un mortero de acero inoxidable a temperaturas de nitrógeno líquido, la incubación de polvo de tejido aórtico (suspendido en PBS) con MPO (100 nM) durante 10 h a temperatura ambiente no consiguió aumentar los niveles de NO₂Tyr o ClTyr, según monitorización por espectrometría de masas y análisis SDS-PAGE y Western (para NO₂Tyr). En tercer lugar, los estudios de control no mostraron una formación importante de 3-[¹³C₆]ClTyr o 3-[¹³C₆]NO₂Tyr en las mezclas de polvo de tejido aórtico anterior/MPO con suplemento de L-[¹³C₆]tirosina, incubadas a temperatura ambiente durante 10 h, y sometidas a continuación a análisis de espectrometría de masas.

[0099] *Identificación de proteínas por espectrometría de masas.* Las identificaciones de proteínas se efectuaron según se ha descrito anteriormente (Kinter, M., y Sherman, N. 2000. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, Willard, B.B., Ruse, C.I., Keightley, J.A., Bond, M., y Kinter, M. 2003. Site-specific quantitation of protein nitration using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 75: 2370-2376). En breve, se cortaron bandas de geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Coomassie, se redujeron con DTT y se alquilaron con yodoacetamida. A continuación se digirió la proteína en gel mediante adición de tripsina, se extrajeron los péptidos y a continuación se analizó mediante espectrometría de masas en tándem HPLC de columna capilar en un sistema de espectrómetro de masas de trampa iónica LCQDeca (ThermoFinnigan, San Jose, CA) equipado con una fuente de ionización de nanopulverización a una velocidad de flujo de 200 nL/min. Se separaron los péptidos digeridos mediante HPLC capilar de fase inversa usando una columna de 50 µm de d.i. con una punta de 10 µm adquirida en New Objective Corp. (Woburn, MA). La columna se cargó con ~ 6 cm de material de carga C18 (Phenomenex, Torrence, CA) y se eluyó usando un gradiente de 45 min de acetonitrilo creciente (2-70 %) en ácido acético 50 mM. La identificación de proteínas se realizó usando un análisis dependiente de datos que adquirió los espectros de masa y los espectros CID en una única pasada (Kinter, M., y Sherman, N. 2000. Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry, Willard, B.B., Ruse, C.I., Keightley, J.A., Bond, M., y Kinter, M. 2003. Site-specific quantitation of protein nitration using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 75: 2370-2376). Se usaron los programas de búsqueda Sequest y Mascot para identificaciones de proteínas. Se realizaron análisis de secuencia manual en péptidos enriquecidos con deuterio seleccionados durante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio.

[0100] *Análisis de nitrotirosina y clorotirosina.* Se cuantificaron nitrotirosina y clorotirosina unidas a proteínas mediante espectrometría de masas en tándem cromatografía líquida de dilución de isótopos estables (Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., y col. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. *Journal of Biological Chemistry*. 277: 17415-17427) en un espectrómetro de masas en cuadrupolo triple (API 4000, Applied Biosystems, Foster City, CA) en interfaz con un sistema de multiplexado de Cohesive Technologies Aria LX Serie HPLC (Franklin, MA). Se añadieron patrones sintéticos marcados con [¹³C₆] a muestras (bien en partes alícuotas de suero, homogeneizados de tejido/lesión o bien en bandas visualizadas en membranas PVDF por tinción de azul coloidal y a continuación se escindieron) y se usaron como patrones internos para cuantificación de analitos de abundancia natural. Simultáneamente, se añadió un aminoácido precursor marcado universal, [¹³C₉, ¹⁵N₁]tirosina.

Se hidrolizaron las proteínas en atmósfera de argón en ácido metanosulfónico, y a continuación se pasaron muestras sobre minicolumnas de extracción C18 de fase sólida (minicolumna Supelclean LC-C18-SPE; 3 ml; Supelco, Inc., Bellefonte, PA) antes del análisis de espectrometría de masas. Los resultados se normalizan en contenido de la tirosina de aminoácido precursor, que se sometió a seguimiento dentro de la misma inyección. La formación intrapreparatoria de nitro[¹³C₉, ¹⁵N]tirosina y cloro[¹³C₉, ¹⁵N]tirosina fue objeto de seguimiento rutinario y resultó insignificante (es decir, < 5 % del nivel del producto de abundancia natural observado) en las condiciones empleadas.

[0101] *Análisis estadístico.* Los cálculos de potencia se realizaron basándose en medios comunicados anteriormente y en desviaciones típicas de NO₂Tyr y ClTyr en estudios clínicos. Se determinó que se necesitaban al menos 30 pacientes en cada grupo para tener una potencia del 80 % para detectar un 40 %.

EJEMPLO 1. Identificación de apolipoproteína A-I como una proteína nitrada en suero.

[0102] Los niveles en suero de nitrotirosina unida a proteínas sirven como un predictor de riesgo aterosclerótico y carga en sujetos (Shishehbor, M.H., Aviles, R.J., Brennan, M.L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G.L., Gokce, N., Keaney, J.F., Jr., Penn, M.S., Sprecher, D.L., y col. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. JAMA. 289: 1675-1680), lo que suscita la cuestión de si la nitración de proteínas específicas podría contribuir al proceso aterosclerótico. Como primera etapa en la investigación de esta cuestión, los autores de la invención buscaron determinar las identidades de proteínas nitradas en suero. Se analizaron muestras de pacientes con ECV y controles mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante análisis de inmunotransferencia Western usando anticuerpos anti-nitrotirosina, y tinción de azul de Coomassie para proteínas. La comparación del patrón de inmunoreactividad observado en una inmunotransferencia Western frente a tinción de. proteínas reveló que no todas las proteínas séricas se nitrán por igual. Un ejemplo de una disparidad entre una abundancia modesta frente a un grado extenso de nitración se observó de forma reproducible en una proteína de 29 kDa. Esta banda de proteínas se cortó de un gel teñido con azul de Coomassie, se digirió con tripsina y se identificó inequívocamente como apoA-I (número de acceso NCBI 253362) basándose en la detección y secuenciación de > 30 péptidos que cubrían el 96 % de la secuencia de proteínas. Se obtuvo una confirmación adicional de la identidad de apoA-I como una proteína nitrada a través del paso de suero a través de una columna formada por anticuerpos inmovilizados para nitrotirosina y el lavado de la columna con alto contenido en sal, seguido por elución con alto contenido en sal suplementado con nitrotirosina 5 mM. El análisis de las muestras por SDS-PAGE bidimensional y secuenciación basada en espectrometría de masas en tándem capilar de LC confirmó apoA-I como una proteína recuperada (> 90 % cobertura por LC/ESI/MS/MS). Un examen adicional del eluyente de columna anti-nitrotirosina (alto contenido en sal + nitrotirosina 5 mM) por SDS-PAGE 2-D seguido de análisis de inmunotransferencia Western usando anticuerpos para apoA-I proporcionó evidencia complementaria adicional de apoA-I como una proteína nitrada *in vivo*.

EJEMPLO 2. Demostración de apolipoproteína A-I como una diana preferida de nitración y cloración en suero, así como en sujetos con frente a sin enfermedad cardiovascular.

[0103] Dada la plétora de dianas en los tejidos como suero y la distancia de difusión relativamente corta para una especie de nitrógeno reactiva en matrices biológicas complejas, la nitración selectiva aparente de apoA-I entre proteínas séricas sugería intensamente la existencia de una fuente enzimática para oxidantes derivados de NO en estrecha proximidad con la lipoproteína *in vivo*. Un candidato probable era la enzima MPO, ya que estudios recientes han demostrado que esta enzima es capaz tanto de catalizar la nitración de proteínas *in vivo* (Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., y col. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. Journal of Biological Chemistry. 277: 17415-17427, Zhang, R., Brennan, M.L., Shen, Z., MacPherson, J.C., Schmitt, D., Molenda, C.E., y Hazen, S.L. 2002. Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation. Journal of Biological Chemistry. 277: 46116-46122, Baldus, S., Eiserich, J.P., Mani, A., Castro, L., Figueroa, M., Chumley, P., Ma, W., Tousson, A., White, C.R., Bullard, D.C., y col. 2001. Endothelial transcytosis of myeloperoxidase confers specificity to vascular ECM proteins as targets of tyrosine nitration. Journal of Clinical Investigation. 108: 1759-1770, Gaut, J.P., Byun, J., Tran, H.D., Lauber, W.M., Carroll, J.A., Hotchkiss, R.S., Belaaouaj, A., y Heinecke, J.W. 2002. Myeloperoxidase produces nitrating oxidants in vivo. Journal of Clinical Investigation. 109: 1311-1319), así como de desempeñar un papel dominante en la generación de oxidantes derivados de NO en ciertas circunstancias, como dentro del compartimento extracelular en sitios de inflamación (Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., y col. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation in vivo using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. Journal of Biological Chemistry. 277: 17415-17427). Con el fin de probar la hipótesis de que MPO sirve como un posible catalizador enzimático para nitración selectiva de apoA-I *in vivo*, así como de valorar cuantitativamente si apoA-I se nitra en mayor magnitud en sujetos con ECV, se consideraron pacientes secuenciales que se presentaron en una clínica de cardiología con ECV documentada (n = 45) y sujetos de control sanos (n = 44) y se recogieron muestras de su suero para su análisis. El contenido de NO₂Tyr y ClTyr se cuantificó simultáneamente en las proteínas séricas totales, apoA-I aislada y apoB-100 aislada usando HPLC de

dilución de isótopos estables con espectrometría de masas en tándem de ionización de electropulverización en línea (LC/ESI/MS/MS). La tabla 2 recoge las características clínicas y de laboratorio de los sujetos examinados. Como se preveía, los pacientes con ECV tenían más posibilidades de tener factores de riesgo conocidos de ECV incluidos historia de diabetes, hipertensión, tabaquismo, antecedentes familiares de ECV e historia de hiperlipidemia. Los sujetos con ECV tenían también niveles de colesterol LDL más bajos y era más probable que se sometieran a tratamiento con estatinas, características atribuibles probablemente a sesgo de certidumbre en la inscripción de sujetos con ECV en una clínica de cardiología.

TABLA 2

Características clínicas y de laboratorio

	Controles (n = 44)	ECV (n = 45)	valor p
Edad	44,3 ± 11,1	65,6 ± 8,5	< 0,001
Sexo masculino (%)	24 (54,6)	17 (37,8)	0,12
Diabetes (%)	0 (0)	24 (53,3)	< 0,001
Hipertensión (%)	14 (31,8)	32 (71,1)	< 0,001
Fumar (%)	22 (50,0)	37 (82,2)	0,001
Antecedentes familiares ECV (%)	5 (11,4)	19 (42,2)	0,001
Hx hiperlipidemia (%)	7 (15,9)	31 (68,9)	< 0,001
Uso de estatinas	0 (0)	28 (62,2)	< 0,001
CT (mg/dL)	201 ± 33	165 ± 36	< 0,001
HDLc (mg/dL)	60 ± 16	42 ± 15	< 0,001
LDLc (mg/dL)	120 ± 34	91 ± 24	< 0,001
TG (mg/dL)	108 ± 54	171 ± 96	< 0,001
Glucosa en ayunas (mg/dL)	93 ± 13	94 ± 3	0,43

Los datos se presentan como porcentaje o media ± desviación típica según se indique.
ECV = enfermedad cardiovascular; HDLc = colesterol por lipoproteínas de alta densidad; Hx = historia de; LDLc = colesterol por lipoproteínas de baja densidad; CT = colesterol total; TG = triglicérido.

[0104] En coherencia con los estudios publicados recientemente por los autores de la invención (Shishehbor, M.H., Aviles, R.J., Brennan, M.L., Fu, X., Goormastic, M., Pearce, G.L., Gokce, N., Keaney, J.F., Jr., Penn, M.S., Sprecher, D.L., y col. 2003. Association of nitrotyrosine levels with cardiovascular disease and modulation by statin therapy. JAMA. 289: 1675-1680), el contenido sérico de NO₂Tyr estaba aumentado significativamente en aproximadamente 1,5 veces (p < 0,001) en sujetos con ECV con respecto al de los controles sanos (Tabla 3). Se observaron resultados similares (aumento de 2 veces; p = 0,001 para ECV frente a controles, Tabla 3) cuando se analizó el contenido de NO₂Tyr de apoB-100 aislada, la principal proteína constituyente de LDL y se comunicó que una lipoproteína se unía a MPO *in vitro* (Carr, A.C., Myzak, M.C., Stocker, R., McCall, M.R., y Frei, B. 2000. Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis. FEBS Letters. 487: 176-180, Yang, C.Y., Gu, Z.W., Yang, M., Lin, S.N., Garcia-Prats, A.J., Rogers, L.K., Welty, S.E., y Smith, C.V. 1999. Selective modification of apoB-100 in the oxidation of low density lipoproteins by myeloperoxidase *in vitro*. Journal of Lipid Research. 40: 686-698). De forma notable, se advirtió un enriquecimiento de 70 veces en el contenido en NO₂Tyr en el suero apoA-I con respecto a las proteínas totales en suero y se aisló apoB-100. Por otra parte, se advirtió también un aumento importante en el contenido de NO₂Tyr de apoA-I en suero en sujetos con ECV con respecto a sujetos de control sanos (p = 0,005; Tabla 2). Los análisis paralelos de muestras para contenido de CITyr, una modificación de proteína específica para oxidación catalizada por MPO (Hazen, S.L., Hsu, F.F., Gaut, J.P., Crowley, J.R., y Heinecke, J.W. 1999. Modification of proteins and lipids by myeloperoxidase. Methods in Enzymology 300: 88-105, Brennan, M.L., Wu, W., Fu, X., Shen, Z., Song, W., Frost, H., Vadseth, C., Narine, L., Lenkiewicz, E., Borchers, M.T., y col. 2002. A tale of two controversies: defining both the role of peroxidases in nitrotyrosine formation *in vivo* using eosinophil peroxidase and myeloperoxidase-deficient mice, and the nature of peroxidase-generated reactive nitrogen species. Journal of Biological Chemistry. 277: 17415-17427, Hazen, S.L., y Heinecke, J.W. 1997. 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalyzed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. Journal of Clinical Investigation. 99: 2075-2081, Brennan, M.L., Anderson, M., Shih, D., Qu, X., Wang, X., Mehta, A., Lim, L., Shi, W., Hazen, S.L., Jacob, J., Crowley, J., Heinecke, J.W., y Lusi, A.J. 2001. Increased atherosclerosis in myeloperoxidase-deficient mice. J. Clin. Invest. 107: 419-30), revelaron niveles relativamente bajos en las proteínas totales y apoB-100 aislada de suero en comparación con enriquecimiento de más de 100 veces en contenido de CITyr observado en apoA-I aislada (Tabla 2). Además, aunque se advirtieron tendencias a aumentos en contenido de CITyr en sujetos con ECV en proteína total y apoB100 aislada, estas diferencias no consiguieron alcanzar significación estadística. En cambio, se observaron aumentos importantes en contenido de CITyr en apoA-I recuperada de suero (p < 0,001; Tabla 3).

TABLA 3

Apolipoproteína A-I es una diana preferida para nitración y cloración en suero y en enfermedad cardiovascular

	Nitrotirosina		Clorotirosina	
	mediana (IIC)	valor p	mediana(IIC)	valor p
	($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)		($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	
Sección 1.01 Suero				
proteína total				
Control	6,1 [3,9 – 7,8]		1,6 [0,6 – 2,4]	
ECV	9,0 [5,7 – 12,9]	< 0,001	1,9 [1,3 – 3,1]	0,07
apoB-100				
Control	4,0 [1,3 – 6,9]		0,0 [0,0 – 1,9]	
ECV	8,7 [5,2 – 12,1]	0,001	1,9 [0,1 – 4,0]	0,24
Sección 1.02 apoA-1				
Control	438 [335 – 598]		186 [114 – 339]	
ECV	629 [431– 876]	0,005	500 [335 –765]	< 0,001

Las partes alícuotas de suero (100 μg proteína) de toda la cohorte de la Tabla 2 (ECV y sujetos de control sanos) se analizaron directamente (para proteína total) o se resolvieron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas PVDF y se visualizaron bandas correspondientes a apoA-I y apoB-100, se escindieron y a continuación se analizaron mediante dilución de isótopos estables LC/ESI/MS/MS, según se describe en Procedimientos. Los resultados mostrados son para medianas e intervalos intercuartílicos de contenido de nitrotirosina y clorotirosina de proteína de suero total o la lipoproteína indicada, expresada como razón en moles entre aminoácido oxidado y aminoácido original, tirosina. Los valores p mostrados son para comparación de contenido de NO₂Tyr y ClTyr entre grupos de Control y de ECV dentro de la(s) proteína(s) indicada(s) correspondiente(s). apo = apolipoproteína; ECV = enfermedad cardiovascular; IIC = intervalo intercuartílico.

5 [0105] La fuerza de la relación entre el contenido de NO₂Tyr y ClTyr en proteínas totales y apoA-I aislada de suero se examinó adicionalmente en toda la cohorte (ECV más controles). Según se muestra en la Tabla 4 (arriba), el aumento en el contenido de NO₂Tyr estaba asociado a un aumento en la frecuencia de ECV, según seguimiento en proteínas séricas totales o apoA-I aislada de suero. Además, las comparaciones entre sujetos con niveles altos frente a bajos de NO₂Tyr (tercer tercil frente al quinto) demostraron un aumento de aproximadamente 6 veces en probabilidades de tener ECV, si se examinaban proteínas totales o apoA-I aislada del suero (Tabla 3, abajo). En cambio, sólo el contenido de ClTyr de apoA-I aislada, y no el contenido de ClTyr de proteínas séricas totales (o apoB-100, no mostrado), se asoció con un aumento en la frecuencia o las probabilidades de ECV dentro de la cohorte. De forma notable, los sujetos que poseen un contenido de ClTyr apoA-I alto (tercil superior) tenían una probabilidad multiplicada por 16 de tener ECV que aquellos con contenido de ClTyr apoA-I bajo (tercil inferior) (Tabla 4, abajo).

TABLA 4

Relación entre proteína total en suero y contenido de nitrotirosina y clorotirosina de apolipoproteína A1 con prevalencia de enfermedad cardiovascular

	Frecuencia de ECV por tercil			
	1	2	3	p para tendencia
Suero				
Proteína total	30,8 %	33,3 %	69,2 %	0,005
NO ₂ Tyr				
apoA-I NO ₂ Tyr	32,0 %	44,0 %	72,0 %	0,005
1.proteína total				
CITyr	40,0 %	50,0 %	58,3 %	0,20
apoA-I CITyr	20,0 %	48,0 %	80,0 %	< 0,001
Cociente de probabilidades (IC 95 %) de ECV por tercil				
	1	2	3	
Suero				
Proteína total	1,0	1,1 (0,4-3,6)		5,1 (1,6-16,4)
NO ₂ Tyr				
apoA-I NO ₂ Tyr	1,0	1,7 (0,5-5,3)		5,5 (1,6-18,4)
2.proteína total	1,0	1,5 (0,5-4,6)		2,1 (0,7-6,6)
CITyr				
apoA-I CITyr	1,0	3,7 (1,1-13,0)		16,0 (4,0-64,0)

Se muestran las frecuencias (arriba) de prevalencia de enfermedad cardiovascular dentro de cada tercil de la cohorte completa; y (abajo) cocientes de probabilidades e intervalos de confianza al 95 % para segundo y tercer tercil en comparación con el menor (primer) tercil como predictores de ECV. apo = apolipoproteína; IC = intervalo de confianza; CITyr = clorotirosina; ECV = enfermedad cardiovascular; NO₂Tyr = nitrotirosina.

EJEMPLO 3 Demostración de apolipoproteína A1 como una diana preferida de nitración y cloración en lesiones ateroscleróticas humanas.

- 10 **[0106]** Para examinar si la diana preferente de apoA-I por oxidantes generados por NO[•] y MPO tenía lugar dentro del ateroma humano, se realizaron estudios adicionales que examinaban proteínas totales, apoB-100 y apoA-I recuperadas de tejidos aórticos humanos. Se aislaron partículas de tipo LDL y de tipo HDL de tejidos aórticos normales y tejidos ateroscleróticos mediante centrifugación de densidad de flotación diferencial, y a continuación se confirmó que se enriquecían en colesterol y en la preparación de apolipoproteínas apropiada mediante análisis
- 15 Western usando anticuerpos policlonales para apoB-100 o apoA-I, según se describe en "Procedimientos". La mayoría de las apoA-I recuperadas en partículas de tipo HDL de lesiones ateroscleróticas eran monoméricas. Se obtuvieron más valoraciones cuantitativas de contenidos de NO₂Tyr y CITyr de apoA-I recuperadas de tejidos aórticos normales y de lesión con respecto a lo observado en proteínas totales aórticas y de lesión y apoB-100 por análisis LC/ESI/MS/MS de dilución de isótopos estables, cuyos resultados se muestran en la Tabla 4. Debe
- 20 observarse que los contenidos de NO₂Tyr y CITyr en proteínas totales, apoB-100 y apoA-I recuperadas de tejidos aórticos normales y lesiones ateroscleróticas humanas fueron superiores a los observados (compárense las Tablas 3 y 5), lo que sugiere que la modificación de proteínas por oxidantes generados por NO[•] y MPO preferentemente tiene lugar en la pared arterial, en particular en lesiones ateroscleróticas, en comparación con el compartimento intravascular (sangre). Según se observó en suero y lipoproteínas aisladas obtenidas de suero, los contenidos de
- 25 NO₂Tyr y CITyr en apoA-I de lesión mostraron un enriquecimiento selectivo espectacular con respecto a las proteínas totales de lesión y apoB-100 de lesión (Tabla 5). Análogamente, se observan niveles superiores en proteínas totales y las lipoproteínas aisladas a partir de tejidos enfermos frente a vasculares normales.

TABLA 5

La apolipoproteína A-I es una diana preferida para nitración y cloración en lesiones ateroscleróticas aórticas humanas

	Nitrotirosina		Clorotirosina	
	Mediana (IIC) ($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	valor p	Mediana (IIC) ($\mu\text{mol oxTyr/mol Tyr}$)	valor p
Sección 1.03 normal				
<i>proteína total</i>	55 [24 - 143]		63 [25 - 128]	
<i>apoB-100</i>	97 [43 - 222]	0,57	49 [21 - 121]	0,93
Sección 1.04 apoA-I	401 [185 - 637]	< 0,001	678 [299 - 1,311]	< 0,001
Sección 1.05 lesión				
<i>proteína total</i>	108 [51 - 346]		232 [111 - 431]	
<i>apoB-100</i>	255 [91 - 480]	0,67	318 [59 - 385]	0,92
Sección 1.06 apoA1	2.340 [1.665 - 5.050]*	< 0,001 *	3.930 [1.679 - 7.005]	< 0,001
Los especímenes de tejidos de aorta humana normal (n = 10 sujetos) y ateroscleróticos aórticos humanos (n = 22 sujetos) se despojaron de adventicia, y después, se pulverizaron en un polvo en un mortero de acero inoxidable a temperaturas de nitrógeno líquido, y se analizó el contenido de nitrotirosina y clorotirosina mediante dilución de isótopos estables LC/ESI/MS/MS, según se describe en Procedimientos. El contenido de proteína total de los biomarcadores se elucidó usando tejido vascular humano pulverizado. El contenido de aminoácidos oxidados en apoB-100 y apoA-I aórticas normales y obtenidas de lesión aterosclerótica se valoró después de aislamiento de partículas de tipo LDL y de tipo HDL a partir de tejidos vasculares en polvo mediante centrifugación de densidad de flotación secuencial, con resolución posteriormente por SDS-PAGE, transferencia a membranas PVDF, y a continuación bandas correspondientes a apoA-I y apoB-100 visualizadas, escindidas y analizadas por dilución de isótopos estables LC/ESI/MS/MS, según se describe en Procedimientos. Los resultados mostrados corresponden a mediana e intervalos intercuartílicos de contenido de nitrotirosina y clorotirosina de proteína total aórtica normal y de lesión o las lipoproteínas indicadas, expresado como la razón molar de aminoácido oxidado con respecto al original, tirosina. Los valores p mostrados son para comparación de contenido de nitrotirosina o clorotirosina en las lipoproteínas aisladas indicadas de tejido aórtico normal humano y lesiones ateroscleróticas frente al contenido correspondiente observado en proteínas totales de tejido aórtico normal o de lesión. * P < 0,001 para comparación de apoA-I de lesión frente a apoA-I de tejido aórtico normal.				

[0107] Los presentes estudios proporcionan la primera evidencia directa de apoA-I, el principal constituyente de proteínas de HDL, como una diana preferente para nitración y cloración en la pared arterial, así como uno o varios mecanismos potenciales para generación de una forma proaterógena de HDL. El enriquecimiento selectivo notable en contenido de NO₂Tyr y ClTyr de apoA-I observado en lesiones ateroscleróticas humanas y en la circulación sistémica indica que los oxidantes obtenidos de NO⁻ y las reacciones catalizadas por MPO se dirigen selectivamente a la lipoproteína para modificación oxidativa. Los autores de la invención observaron un contenido de aminoácido ox combinado (ox-AA) de 5.500 $\mu\text{mol ox-AA/mol Tyr}$ en apoA-I de lesión (Tabla 5). Dados 7 residuos de tirosina por apoA-I y hasta 4 moléculas de apoA-I por partícula de HDL, los autores de la invención calculan que, en promedio, aproximadamente el 15 % de las partículas de tipo HDL recuperadas de lesiones aórticas humanas poseen al menos una modificación oxidativa (es decir, 5,5 ox-AA/103 Tyr x 7 Tyr/apoA-I x 4 apoA-I/partícula HDL = 15,4 %). Si se examinan los valores de cuartiles superiores, que mostraron un contenido de ox-AA combinado comprendido entre 10.000 y 25.000 $\mu\text{mol ox-AA/mol Tyr}$, entonces un notable 28 % al 50 % de HDL de lesión en este cuartil superior posee un residuo de ClTyr o de NO₂Tyr. Como proteínas modificadas por MPO, HOCl⁻, y apoA-I se colocan en el entorno protegido del compartimento subendotelial, es difícil imaginar que este número pueda ser todavía superior en algunas localizaciones. Aunque el enriquecimiento selectivo de productos de oxidación generada por MPO fue más acusado en HDL circulantes de individuos con ECV y lesiones ateroscleróticas humanas, se observó también un acusado enriquecimiento en apoA-I recuperadas de suero de sujetos sanos y de tejidos aórticos de donantes de trasplante, lo que sugiere un papel antiinflamatorio/antioxidante fisiológico potencial para unión a apoA-I de MPO y secuestro de oxidantes generados por MPO.

B. ESTUDIOS DE FRAGMENTOS PEPTÍDICOS DE APOA-I

[0108] Los presentes estudios establecen los episodios moleculares asociados con modificación mediada por MPO de apoA-I y se relacionan específicamente con los episodios de alteraciones de función apoA-I. Los autores de la invención han cartografiado los sitios de nitración y cloración mediadas por MPO con espectrometría de masas en tándem y actualmente muestran la modificación específica de dos regiones de la proteína. Los autores de la invención establecen también la jerarquía de las modificaciones y comunican una colocación del residuo preferido modificado por cloración y nitración catalizadas por NTO con el sitio de interacción de MPO en la región de

hélíce 8. Se observa una intensa correlación entre la progresión dependiente de la dosis de modificaciones específicas de sitio mediadas por MPO de apoA-I y pérdida de transporte de colesterol inverso dependiente de ABCA1 e inhibición de unión a lípidos de apoA-I. Los datos de los autores de la invención sugieren una unión entre el grado de modificaciones de apoA-I específicas del sitio catalizadas por MPO y la pérdida de funciones antiateroscleróticas importantes de HDL. La modificación oxidativa catalizada por MPO de apoA-I en la pared arterial puede contribuir así a la asociación clínica entre MPO y enfermedad cardiovascular.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Reacciones de modificación de HDL y apoA-I.

[0109] Se extrajo sangre entera de donantes sanos que habían firmado su consentimiento informado por escrito para un protocolo de estudio aprobado por el Comité de Revisión Institucional de la Cleveland Clinic Foundation. Se aisló HDL de plasma humano (intervalo de densidad – 1,063 g/mL a 1,210 g/mL) usando ultracentrifugación diferencial y dializado extensivamente en tampón de fosfato 50 mM (pH 7,0) con ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) 100 μ M en oscuridad a 4 °C. Se adquirió apoA-I deslipidada y purificada en Bidesign International (Saco, ME) y se usó sin purificación adicional.

[0110] Las reacciones de modificación mediadas por MPO se efectuaron en un tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0, que contenía DTPA 100 μ M, 1 mg/mL de proteína (apoA-I), MPO humana purificada 57 nM (donador: peróxido de hidrógeno, oxidorreductasa, EC 1.11.1.7; cociente A430/A280 de 0,79), y nitrito 1 mM (para las reacciones de nitración) o cloruro 100 mM (para las reacciones de cloración). Las reacciones de mieloperoxidasa se iniciaron añadiendo peróxido de hidrógeno en concentraciones variables (0 - 200 μ M) y se efectuaron a 37 °C durante 1 h. Estas condiciones de reacción incluyen cantidades fisiológicamente relevantes de MPO, cloruro y nitrito, y concentraciones de peróxido de hidrógeno que están comprendidas entre el intervalo fisiológico y el patológico.

[0111] Las reacciones de peroxinitrito y HOCl se efectuaron análogamente a 37 °C durante 1 h en tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0, que contenía DTPA 100 μ M con el peroxinitrito y el HOCl añadidos para dar concentraciones finales entre 0 y 200 μ M.

[0112] En todas las reacciones, las concentraciones de los reactivos clave se verificaron espectrofotométricamente usando coeficientes de extinción molar de 170 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 430 nm para MPO, 39,4 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 240 nm para peróxido de hidrógeno, 350 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 292 nm para HOCl (NaOCl) y 1.670 $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a 302 nm para peroxinitrito.

[0113] Las proteínas modificadas se tomaron inmediatamente para los estudios funcionales de apoA-I descritos más adelante. Se extrajo una parte alícuota de cada reacción, se precipitó con acetona y se separó mediante SDS-PAGE para los experimentos de espectrometría de masas.

Experimentos de espectrometría de masas.

[0114] Digestión de proteínas. Las bandas de proteínas se digirieron según un procedimiento de digestión en gel (Kinter, M., y Sherman, N.E. (2000) Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. John Wiley y Sons, New York). En breve, las bandas de proteínas se cortaron del gel y se lavaron con etanol al 50 %/ácido acético al 5 % antes de la digestión triptica con una tripsina de calidad de secuenciación modificada (Promega, Madison, WI) durante toda la noche a temperatura ambiente. Los péptidos se extrajeron del gel, se evaporaron hasta sequedad y se reconstituyeron en ácido acético al 1 % o ácido fórmico al 0,1 % para análisis por espectrometría de masas de ionización de electropulverización HPLC de columna capilar.

[0115] Identificación de los sitios de modificación. El cartografiado detallado y la detección de los sitios de nitración y cloración se efectuaron usando un sistema de espectrómetro de masas de trampa iónica LCQ Deca (ThermoFinnigan, San Jose, CA) equipado con una fuente de ionización de nanopulverización (Protana, Odense, Dinamarca). La fuente se manejó en condiciones de micropulverización a una velocidad de flujo de 200 nL/min. Se analizaron las digestas mediante HPLC capilar de fase inversa usando una columna de 50 μ m d.i. con una punta de 15 μ m d.i. adquirida en New Objective Corp. (Woburn, MA). La columna se cargó con ~ 6 cm de material de carga C18 (Phenomenex, Torrance, CA) y se eluyó usando un gradiente de 45 min de acetonitrilo creciente (2-70 %) en ácido acético 50 mM. Los datos se adquirieron en el modo dependiente de datos, registrando un espectro de masas y tres espectros de disociación inducida por colisión (CID) en ciclo repetitivos (Kinter, M., y Sherman, N.E. (2000) Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry. John Wiley y Sons, New York). Se usó el programa Sequest para comparar todos los espectros CID registrados en la secuencia de apo-A-1 humana (número de acceso NCBI 229513) y considerando los cambios apropiados en las masas de residuos de tirosina de + 34 Da para cloración y + 45 Da para nitración.

Cuantificación específica del sitio de modificación de proteínas.

[0116] Se realizaron experimentos de cuantificación específicos del sitio en un sistema de espectrometría de masas QToFmicro (Waters, Milford, MA) equipado con un sistema HPLC CapLC (Waters) con autoinyector. La fuente de ionización de electropulverización se accionó en condiciones de micropulverización a una velocidad de flujo de 600 nL/min. Se analizaron las digestas mediante HPLC capilar de fase inversa usando una columna de 75 µm d.i. con un capilar de fuente de nanopulverización de 19 µm d.i. La columna se cargó con ~ 15 cm de material de carga C18 de 10 µm (Phenomenex, Torrence, CA) y se eluyó usando un gradiente de 45 min de acetonitrilo creciente (2-70 %) en ácido fórmico al 0,1 %. La cuantificación se obtuvo usando el procedimiento de Péptido de Referencia Nativo desarrollado para cuantificación específica del sitio de modificaciones postraduccionales (38, 39) en el modo de monitorización de iones seleccionados (SIM). Para los experimentos SIM, se adquirieron exploraciones completas de m/z 300 a m/z 1.600 con el analizador de masas de tiempo de vuelo del instrumento QToF y cromatogramas de masas construidos basándose en el valor m/z de los diferentes iones de interés de péptidos. Los péptidos de apoA-I ATEHLSTLSEK, SEQ ID NO. 9, y QGLLPVLESFK, SEQ ID NO. 10 se usaron como péptidos de referencia nativos. La cantidad relativa de cada péptido del analito se determinó dividiendo el área pico cromatográfica de ese péptido de analito por el área pico cromatográfica del péptido de referencia.

Estudios funcionales de apoA-I.

[0117] Flujo de colesterol. Los experimentos de flujo de colesterol se realizaron según procedimientos establecidos (Smith, J.D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E., y Plump, A.S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30647-30655, Takahashi, Y., y Smith, J.D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 11358-11363). Se cargaron con colesterol células RAW264.7 subconfluentes en placas de 24 pocillos y se marcaron durante toda la noche en 0,5 mL de DGGB (DMEM suplementado con glucosa 50 mM, glutamina 2 mM y BSA al 0,2 %), que contenían lipoproteína de baja densidad acetilada (AcLDL) marcada con [³H]-colesterol. La AcLDL marcada con [³H]-colesterol se preparó incubando [³H]-colesterol durante 30 min a 37 °C con la AcLDL y se diluyó en DGGB para producir una concentración final de 50 µg/mL de AcLDL con 0,33 µCi/mL de [³H]-colesterol. El día posterior al marcado, se lavaron las células tres veces en PBS, BSA al 0,2 % y se incubaron con 0,5 mL de DGGB con o sin 8-Br-cAMP 0,1 mM durante 16 h. Después de la incubación durante 16 h, se añadió a cada pocillo 50 µg/mL de HDL proteína en 0,5 mL DGGB con o sin 8-Br-cAMP. Después de una incubación de 4 h a 37 °C, se eliminaron 100 µL de medio, se centrifugó y se contó la radioactividad como una medida del colesterol efluído en el medio. Se extrajeron las células respectivas de cada pocillo con hexano/isopropanol (3: 2, v: v) y se determinó la radioactividad como una medida del colesterol retenido en la célula. Se calculó el porcentaje de colesterol efluído como la radioactividad en el medio dividida por la radioactividad total (radioactividad en el medio más radioactividad celular).

[0118] Unión a lípidos. Se usó un ensayo de agregación de LDL para probar la unión a lípidos a apoA-I, modificado a partir de un ensayo descrito anteriormente (Liu, H., Scraba, D.G., y Ryan, R.O. (1993) FEBS Lett. 316, 27-33). En una placa de ensayo de 96 pocillos, se mezclaron 75 µg de LDL con o sin 3 µg de control o apoA-I modificada en un volumen final de 200 µL de tampón de reacción (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, con NaCl 150 mM y CaCl₂ 2 mM). Cada reacción se realizó por triplicado. A continuación se incubó la placa en un lector de placas SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) a 37 °C durante 10 min. Se añadió una parte alícuota de 20 µL de fosfolipasa C diluida, obtenida de *Bacillus cereus* (Sigma P7147), suficiente para inducir agregación en 1 h, o un control de tampón, a cada pocillo para hidrolizar los grupos delanteros polares de fosfolípidos para preparar la superficie de LDL hidrófoba e iniciar la agregación. Se llevó un seguimiento de la agregación a 37 °C por absorbancia a 478 nm, leída cada 2 minutos durante un periodo de 1 h. La actividad de unión a lípidos de apoA-I da lugar a la inhibición de la agregación de LDL, y se calculó a partir de la velocidad de agregación (ΔD.O./min). durante la fase rápida que tuvo lugar después de un breve retardo de tiempo. La velocidad de agregación para la apoA-I modificada se normalizó según la velocidad de apoA-I nativa.

Detección de apoA-I modificada en ateroma humano.

[0119] Aislamiento de apoA-I. Se aisló tejido de ateroma humano de aortas obtenidas en autopsia en las primeras 10 h después de la muerte. Inmediatamente se lavó el tejido en suero salino con tampón de fosfato enfriado en hielo suplementado con DTPA 100 µM y se congeló inmediatamente en fosfato de sodio 65 mM, pH 7,4, con DTPA 100 µM e hidroxitolueno butilado 100 µM, en N₂ a -80 °C hasta el análisis.

[0120] Se potenciaron las estrías grasas y las lesiones intermedias de aorta torácica humana usando un mortero de acero inoxidable a temperaturas de nitrógeno líquido y se mezcló con PBS, que contenía DTPA 100 µM y un cóctel inhibidor de proteasa (Sigma n° catálogo P8340) durante 10 horas a 4 °C. La lesión suspendida se centrifugó y se usó el sobrenadante para purificación de apoA-I. Para la purificación, apoA-I se ligó a una resina IgY anti-HDL (GenWay Biotech, San Diego, CA), eluida en glicina 0,1 M (pH 2,5), y se neutralizó el eluato por adición de Tris 1 M (pH 8,0). Se disolvió la muestra neutralizada en tampón de carga de muestra sin calentar, pasada en un gel de SDS-PAGE al 12,5 % (Criterion, BioRad Laboratories), y se detectó por tinción con azul de Coomassie. El análisis de SDS-PAGE reveló que > 90 % de la proteína recuperada de la columna era apoA-I.

[0121] Análisis LC-MS en tándem. Se cortó la banda aislada de inmunofinidad de apoA-I del gel y se digirió con tripsina según se describe anteriormente. Los experimentos de LC-MS en tándem usaron un espectrómetro de masas de trampa iónica lineal ThermoFinnigan LTQ con una bomba de HPLC Surveyor y un sistema de muestreador automático. Las muestras se inyectaron en una columna capilar de 10 cm x 75 μm d.i. que se eluyó con un gradiente lineal de acetonitrilo en ácido acético 50 mM a aproximadamente 1 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se usaron experimentos de monitorización de reacción seleccionados (SRM) para registrar los espectros de iones de productos de ion molecular de péptidos que contenían cada uno residuo de tirosina modificado caracterizados en los experimentos de cartografiado. Se reconstruyeron los cromatogramas para esos péptidos dibujando la fragmentación de los iones moleculares para los iones de productos más abundantes en los espectros CID respectivos. La detección del péptido apropiado se verificó por el espectro CID que se registro para ese tiempo de retención.

Analizadores estadísticos

[0122] Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron por análisis unidireccional de varianza usando una prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer o una prueba T de Student. Se comunicaron diferencias estadísticas significativas cuando $p < 0,05$.

EJEMPLO 4 Cartografía de los sitios de nitración y cloración en apoA-I.

[0123] Los experimentos iniciales se centraron en la determinación de los sitios de nitración de tirosina en apoA-I producidos tratando HDL con un sistema de modificación enzimática ($\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$) con concentraciones variables de peróxido de hidrógeno, y un sistema no enzimático usando concentraciones variables de peroxinitrito. Después de cada tratamiento, se precipitaron las proteínas en HDL con acetona en frío, se separaron por SDS-PAGE, y se cortó la banda de apoA-I del gel para digestión en gel con tripsina. Se analizó la digesta mediante espectrometría de masas en tándem HPLC de columna capilar usando el modo dependiente de datos del sistema de espectrometría de masas de trampa iónica. Se registraron aproximadamente 2.000 espectros CID y en estos espectros se realizó una búsqueda de los espectros de péptidos modificados. La rutina de búsqueda se centró en la secuencia de aminoácidos de apoA-I y se usó una diferencia de masa de residuos de tirosina de + 45 Da para buscar los espectros de los péptidos nitrados. Estos análisis detectaron péptidos que cubrían el 95 % de los péptidos de proteínas, incluyendo péptidos que contenían los 7 residuos de tirosina en la secuencia de apoA-I madura. Se encontraron dos péptidos que contenían nitrorresiduos de tirosina (Y192 y Y166) en HDL tratados con $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$ a concentraciones de peróxido de hidrógeno $< 50 \mu\text{M}$. A concentraciones más elevadas de peróxido de hidrógeno ($> 100 \mu\text{M}$), podrían detectarse también péptidos adicionales que contuvieran nitrotirosina (Y29 y Y236). Los tres residuos de tirosina restantes están contenidos en péptidos que se detectaron y secuenciaron en estos análisis, pero no se encontró una forma nitrada correspondiente en ninguna condición de reacción que se sometiera a ensayo. Como comparación, una reacción similar de HDL con peroxinitrito $100 \mu\text{M}$ produjo modificaciones de nitrotirosina de la apoA-I en tres residuos de tirosina; Y166, Y18 y Y236. De nuevo, los residuos de tirosina restantes se detectaron en estos análisis exclusivamente en la forma no nitrada.

[0124] En la fig. 1 se muestran los espectros CID de los cinco péptidos nitrados. Para cada péptido, la identidad se establece mediante la serie de iones de producto registrados en el espectro CID respectivo. Un componente de estos espectros CID es la masa de residuo característica de la fracción de nitrotirosina (208 Da). En conjunto, la combinación de las medidas de peso molecular de péptido, la información de secuencia de péptido en los espectros CID, y la secuencia de aminoácidos conocida de apoA-I permite una asignación sin ambigüedades de las posiciones de nitrotirosina.

[0125] Los experimentos posteriores usaron sistemas de cloración complementaria de proteínas, con reacciones enzimáticas ($\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{Cl}^-$) y no enzimáticas (HOCl), para modificar la HDL. Se detectaron cuatro sitios de cloración en estas dos clases de reacciones, Y192, Y166, Y29, y Y236. Estos son los mismos residuos de tirosina que se nitraron mediante la reacción $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{NO}_2^-$. Según se observa para los sitios de nitración, la cloración de Y192 y Y166 se detectó a concentraciones de peróxido de hidrógeno $< 50 \mu\text{M}$ mientras que la cloración de Y29 y Y236 requirió peróxido de hidrógeno $> 100 \mu\text{M}$. El sitio de nitración Y18 observado con tratamiento con peroxinitrito no se cloró ni con reacción mediada por MPO^- ni mediada por HOCl . La fig. 2 contiene los espectros CID de los cuatro péptidos clorados. Estos espectros CID se caracterizan por un patrón de fragmentación que incluye la masa de residuos de la clorotirosina (197 Da para el isótopo ^{35}Cl más abundante). Según se observa anteriormente para los péptidos nitrados, la combinación del peso molecular del péptido, la información en el espectro CID y la secuencia de aminoácidos de apoA-I produce una asignación clara de las posiciones de clorotirosina.

EJEMPLO 5. Análisis cuantitativos que identifican los sitios de modificación preferidos.

[0126] En la fig. 3 se muestra un mapa extenso de los sitios de nitración y cloración en apoA-I. Una observación realizada durante los experimentos de cartografiado iniciales fue una jerarquía potencial en las diversas modificaciones, con dos de los sitios de nitración/cloración mediados por MPO modificados antes que los otros dos, un sitio de modificación mediado por MPO que no fue modificado por peroxinitrito, y un sitio de modificación de peroxinitrito que no fue modificado por MPO. En consecuencia, se diseñaron experimentos cuantitativos para

determinar específicamente el orden de los sitios de nitración y cloración.

[0127] Estos experimentos cuantitativos usaron el procedimiento de los autores de la invención descrito anteriormente de referencia de péptidos nativos para seguir la desaparición de las diferentes regiones de apoA-I, representadas como péptidos respectivos que contienen tirosina formados por la digestión de tripsina (Willard, B.B., Ruse, C.L., Keightley, J.A., Bond, M., y Kinter, M. (2003) Anal. Chem. 75, 2370-2376, Ruse, C.L., Willard, B., Jin, J.P., Haas, T., Kinter, M., y Bond M. (2002) Anal. Chem. 74, 1658-1664). HDL se trató en condiciones de nitración o cloración con cantidades crecientes de H_2O_2 en las reacciones mediadas por MPO, o cantidades crecientes de peroxinitrito y HOCl en las reacciones no enzimáticas. Las reacciones se detuvieron por precipitación de proteínas con acetona a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se separaron por SDS-PAGE. Las bandas de apoA-I se cortaron para digestión triptica y las digestas se analizaron por LC-ESI-MS de columna capilar. Se vigiló la progresión de la modificación mediada por MPO de los sitios individuales en apoA-I dibujando cromatogramas de masa para cada péptido que contenía tirosina y calculando las proporciones de áreas pico respectivas con respecto al péptido de referencia nativo sin modificar. Según se muestra en las fig. 4B y 5B, la progresión de modificación mediada por MPO, con concentraciones crecientes de H_2O_2 , en cada sitio en apoA-I produce una recuperación disminuida de los péptidos sin modificar respectivos en la digesta. Estos datos revelaron que Y192 sirve como sitio de nitración y cloración catalizado por MPO preferido, seguido por Y166 y Y29, y con sólo un grano menor de modificación de Y236 a niveles más elevados de oxidante. Se observó también un patrón comparable de modificación oxidativa en la reacción de HOCl. Notablemente, la eficacia relativa de la reacción de HOCl fue significativamente menor que la de la reacción de cloración catalizada por MPO. Específicamente, la reacción de oxidación catalizada por MPO produjo mayor modificación a cada concentración de H_2O_2 examinada con respecto a las cantidades equivalentes molares de HOCl. En cambio, las características de respuesta a la dosis de la reacción de peroxinitrito diferían en la eficacia de la reacción de modificación y en la clara preferencia para nitración de Y18 y la ausencia de nitración en Y192.

EJEMPLO 6. La apoA-I modificada oxidativamente está funcionalmente degradada.

[0128] Las fig. 4A y 5A muestran también los efectos de respuesta a la dosis de modificación de HDL en las propiedades de flujo de colesterol mediadas por ABCA1. Se trató HDL con el sistema MPO/ H_2O_2/NO_2^- , peroxinitrito, el sistema MPO/ H_2O_2/Cl^- o HOCl. A continuación se midió el flujo de colesterol por incubación de las muestras tratadas con células RAW264.7 de macrófago murino cargado de colesterol en presencia y ausencia de pretratamiento con 8Br-cAMP. En ausencia de tratamiento con 8Br-cAMP, las células RAW264.7 no expresan un nivel apreciable de ABCA1 y soportan un flujo de colesterol independiente de ABCA1 para HDL pero no flujo de colesterol a apoA-I (Smith, J.D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E., y Plump, A.S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30647-30655, Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S., y Brewer, H.B., Jr. (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. 280, 818-823, Takahashi, Y., Miyata, M., Zheng, P., Imazato, T., Horwitz, A., y Smith, J.D. (2000) Biochim. Biophys. Acta. 1492, 385-394, Chen, W., Sun, Y., Welch, C., Gorelik, A., Leventhal, A.R., Tabas, I., y Tall, A.R. (2001) J. Biol. Chem. 276, 43564-43569). El tratamiento con 8Br-cAMP de células RAW264.7 induce que ARNm y proteína de ABCA1 permitan un flujo de colesterol multiplicado por ~ 2 superior para HDL y niveles importantes de flujo de colesterol para apoA-I libre de lípidos (Smith, J.D., Miyata, M., Ginsberg, M., Grigaux, C., Shmookler, E., y Plump, A.S. (1996) J. Biol. Chem. 271, 30647-30655, Takahashi, Y., y Smith, J.D. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96, 11358-11363, Remaley, A.T., Stonik, J.A., Demosky, S.J., Neufeld, E.B., Bocharov, A.V., Vishnyakova, T.G., Eggerman, T.L., Patterson, A.P., Duverger, N.J., Santamarina-Fojo, S., y Brewer, H.B., Jr. (2001) Biochem. Biophys. Res. Comm. 280, 818-823, Takahashi, Y., Miyata, M., Zheng, P., Imazato, T., Horwitz, A., y Smith, J.D. (2000) Biochim. Biophys. Acta. 1492, 385-394). Por tanto, la presencia o ausencia de pretratamiento con 8Br-cAMP permite medir el flujo de colesterol dependiente e independiente de ABCA1. Según se observa en las fig. 7A y 8A, las reacciones de nitración y cloración mediadas por MPO, y el tratamiento de HOCl, produjeron pérdidas dependientes de las dosis del flujo de colesterol dependiente de ABCA1 para HDL sin afectar al flujo independiente de ABCA1 para HDL. En conjunto, el orden de rango de eficacia para degradación funcional por diversas reacciones de modificación fue cloración mediada por MPO > cloración con HOCl > nitración mediada por MPO > nitración con peroxinitrito.

[0129] Las reacciones de control de HDL tratada con H_2O_2 en solitario no mostraron disminución en flujo de colesterol dependiente de ABCA1, lo que mostraba la naturaleza crítica de la reacción de peroxidasa catalizada por MPO. También se modificaron los mismos residuos de tirosina y se observó un patrón similar de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 disminuido en experimentos de control usando apoA-I libre de lípidos tratada con los sistemas completos de modificación mediados por MPO (datos no mostrados). Estos resultados son consistentes con modificación de proteínas, en oposición a modificación de lípidos, al ser responsables de la pérdida de actividad de flujo.

[0130] También se sometió a ensayo el efecto de la modificación mediada por MPO en las características de la unión a lípidos de apoA-I. Estos experimentos miden la actividad de unión a lípidos de apoA-I vigilando la capacidad de la apoA-I de inhibir la agregación de LDL que se trata con fosfolipasa C (PLC). La inhibición de apoA-I se debe a su capacidad para cubrir LDL hidrófobas modificadas a través de un procedimiento de unión a lípidos que es una etapa inicial en flujo de colesterol mediado por apoA-I. Según se muestra en la fig. 6, LDL tratadas con PLC producen una agregación dependiente del tiempo que se reduce significativamente por la actividad de unión a

lípidos de apoA-I no modificadas o apoA-I que fueron pretratadas con peróxido de hidrógeno en solitario (fig. 9A). El pretratamiento de las apoA-I con los sistemas de nitración y cloración mediados por MPO (MPO/H₂O₂/NO₂⁻ y MPO/H₂O₂/Cl⁻, respectivamente) inhibieron significativamente esta reducción con la reacción de nitración dando una inhibición del 10 % y la reacción de cloración dando una inhibición del 35 %. Las preparaciones de apoA-I de control o modificadas idénticas se sometieron a prueba en cuanto a actividad de aceptor de flujo de lípidos dependiente de ABCA1 y las disminuciones en la actividad de unión a lípidos de apoA-I se correlacionaron directamente con las pérdidas observadas de actividad de aceptor de flujo de dependiente de ABCA1 (fig. 9B).

EJEMPLO 7. Los sitios de modificación de apoA-I específicos se encuentran *in vivo*.

[0131] Los estudios de MS en tándem con LC de apoA-I modificadas *in vitro* por MPO, descritos anteriormente, produjeron una lista de sitios de modificación para evaluación *in vivo*. La fig. 7 muestra una serie de cromatogramas SRM a partir del análisis MS en tándem con LC de apoA-I que se aislaron a partir de tejidos de atheroma humano. La elución de péptidos que contienen nitración en los dos sitios de nitración primarios, Y192 y Y166, se observa en los cromatogramas mostrados en las fig. 7A y 7C, respectivamente. Los espectros CID (fig. 10B y 10D, respectivamente) registrados para estos tiempos de retención proporcionaron una prueba concluyente de la identidad correcta de estos péptidos nitrados. Las cantidades de los péptidos nitrados, con respecto a los péptidos no modificados respectivos, pueden estimarse en el 9 % para el péptido que contiene Y192 y en el 0,2 % para el péptido que contiene Y166 integrando el área de cada pico cromatográfico. Estos valores deben considerarse estimaciones, ya que las respuestas relativas de LC-MS de los péptidos nitrados frente a los no nitrados no se han determinado. Experimentos similares dirigidos a sitios de nitración secundarios identificados a través de los experimentos *in vitro* no pudieron detectar los péptidos que contienen Y29 y Y236 en las formas nitradas (datos no mostrados). Esta incapacidad de detectar estos péptidos nitrados es coherente con la eficacia relativamente baja de la nitración mediada por MPO de estos sitios.

[0132] Los autores de la invención intentaron también verificar la presencia de péptidos clorados específicos del sitio. Una cloración que contuviera péptidos en la posición Y192 no podría detectarse (datos no mostrados) a pesar de la identificación de este sitio como el sitio de cloración preferido en modelos *in vitro*. La cloración que contuviera péptidos en la posición Y166 podría detectarse (panel inferior, fig. 7B), aunque el espectro CID (panel inferior, fig. 7D) mostrara un espectro superpuesto de iones de péptidos que contuvieran cloración de Y166 y oxidación de Y166 para producir trihidroxifenilalanina. Este péptido oxidado tiene un peso molecular que es 2 Da menor que la especie clorada correspondiente. Sin embargo, como un ion doblemente cargado, los péptidos clorados y oxidados difieren en 1 Da en la escala m/z del espectrómetro de masas. Esta diferencia m/z no puede distinguirse en la ventana de aceptación de 2 Da de la primera fase del análisis de masa en el detector de trampa iónica. Los iones del fragmento cargado una sola vez resultantes difieren en 2 Da y pueden distinguirse en el espectro CID.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar si un sujeto presenta un riesgo de tener enfermedad cardiovascular, que comprende:

determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apolipoproteína A-I (apoA-I) en una muestra biológica del sujeto,
 en el que la muestra biológica es sangre, plasma o suero;
 en el que la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I se seleccionan entre apoA-I oxidada y un fragmento peptídico de apoA-I oxidada,
 en el que la apoA-I oxidada y el fragmento peptídico de apoA-I oxidada tienen actividad de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 reducida o actividad de unión a lípidos reducida, o ambas, en comparación con apoA-I no oxidada; y
 en el que los niveles elevados de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra biológica en comparación con un valor de control o un patrón interno indican que el sujeto presenta un riesgo de tener enfermedad cardiovascular.

2. Un procedimiento para caracterizar el riesgo a corto plazo de sufrir un episodio cardíaco adverso importante en un sujeto que presenta dolor torácico, que comprende:

determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apolipoproteína A-I (apoA-I) en una muestra biológica del sujeto,
 en el que la muestra biológica es sangre, plasma o suero;
 en el que la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I se selecciona entre apoA-I oxidada y un fragmento peptídico de apoA-I oxidada,
 en el que la apoA-I oxidada y el fragmento peptídico de apoA-I oxidada tienen actividad de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 reducida o actividad de unión a lípidos reducida, o ambas, en comparación con apoA-I no oxidada; y
 en el que los niveles elevados de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra biológica en comparación con un valor de control o un patrón interno indica que el sujeto presenta un riesgo de sufrir un episodio cardíaco adverso importante.

3. Un procedimiento para evaluar la terapia en un sujeto en el que se sospecha o al que se ha diagnosticado una enfermedad cardiovascular, que comprende:

determinación de niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apolipoproteína A-I (apoA-I) en una muestra biológica tomada del sujeto antes de la terapia;
 en el que la muestra biológica es sangre, plasma o suero;
 en el que la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I se seleccionan entre apoA-I oxidada y un fragmento peptídico de apoA-I oxidada;
 en el que la apoA-I oxidada y el fragmento peptídico de apoA-I oxidada tienen actividad de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 reducida o actividad de unión a lípidos reducida, o ambas, en comparación con apoA-I no oxidada; y
 determinación de niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en una muestra biológica correspondiente tomada del sujeto durante o después de una terapia,
 en el que una disminución en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra tomadas después de o durante una terapia en comparación con niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra tomadas antes de la terapia es indicativa de un efecto positivo de la terapia en la enfermedad cardiovascular en el sujeto tratado.

4. Un procedimiento para seguimiento con el tiempo del estado de la enfermedad cardiovascular en un sujeto con enfermedad cardiovascular, que comprende:

determinación de los niveles de una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apolipoproteína A-I (apoA-I) en una muestra biológica tomada del sujeto en un instante inicial, en el que la muestra biológica es sangre, plasma o suero, y en una muestra biológica correspondiente tomada del sujeto en un instante posterior;
 en el que la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I se seleccionan entre apoA-I oxidada y un fragmento peptídico de apoA-I oxidada;
 en el que la apoA-I oxidada y el fragmento peptídico de apoA-I oxidada tienen actividad de flujo de colesterol dependiente de ABCA1 reducida o actividad de unión a lípidos reducida, o ambas, en comparación con apoA-I no oxidada;
 en el que un aumento en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra biológica tomada en el instante posterior en comparación con el instante inicial indica que la enfermedad cardiovascular de un sujeto ha empeorado.

5. Un procedimiento según la reivindicación 4, en el que

el sujeto ha experimentado uno o más episodios cardiovasculares adversos agudos en el pasado, y en el que un aumento en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en la muestra biológica tomada en el instante posterior en comparación con el instante inicial indica que el riesgo de un sujeto de sufrir un episodio cardiovascular adverso posterior ha aumentado.

6. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la apoA-I oxidada es apoA-I que se ha oxidado por exposición a HOCl, ONOO- o radical tirosilo.

7. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho fragmento peptídico de apoA-I oxidada comprende tirosina oxidada.

8. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho fragmento peptídico de apoA-I oxidada comprende uno o más entre: clorotirosina, nitrotirosina, ditirosina, oxohistidina, trihidroxifenilalanina, dihidroxifenilalanina y peróxido de tirosina.

9. Un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento emplea un procedimiento para detectar apoA-I oxidada o un fragmento peptídico de apoA-I oxidada que comprende un residuo de aminoácidos oxidado en una cualquiera de las posiciones 18, 29, 166, 192, 236 o cualquier combinación de dichas posiciones, en SEQ ID NO. 1.

10. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, en el que los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I se comparan con un valor de control o un intervalo de valores de control basándose en los niveles de la una o más biomoléculas oxidadas ligadas a apoA-I en muestras biológicas comparables de una población de sujetos de control humanos.

11. Un procedimiento según la reivindicación 1 ó 5, en el que el episodio cardiaco adverso importante es infarto de miocardio, un nuevo infarto, la necesidad de revascularización o la muerte.

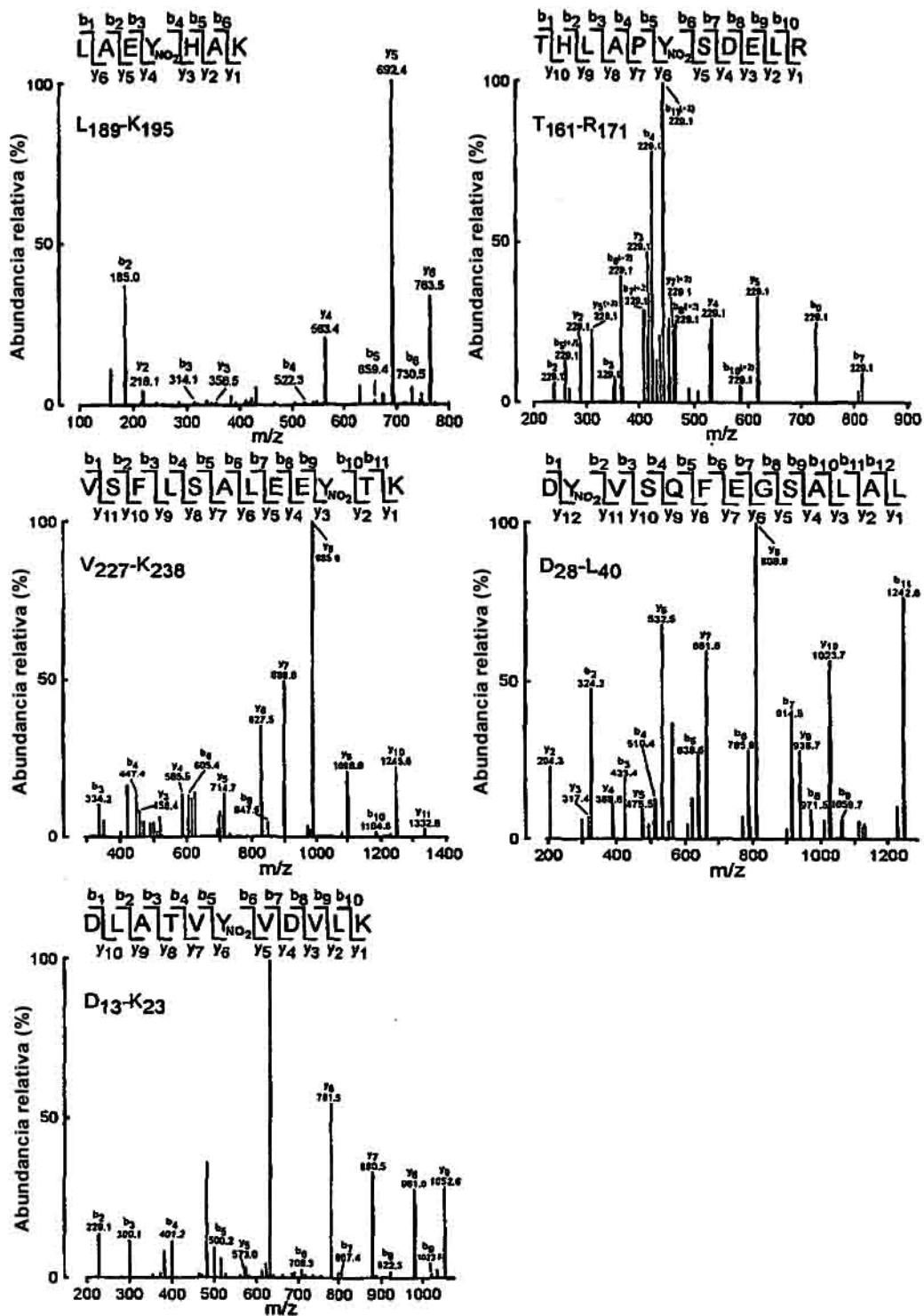


Figura 1

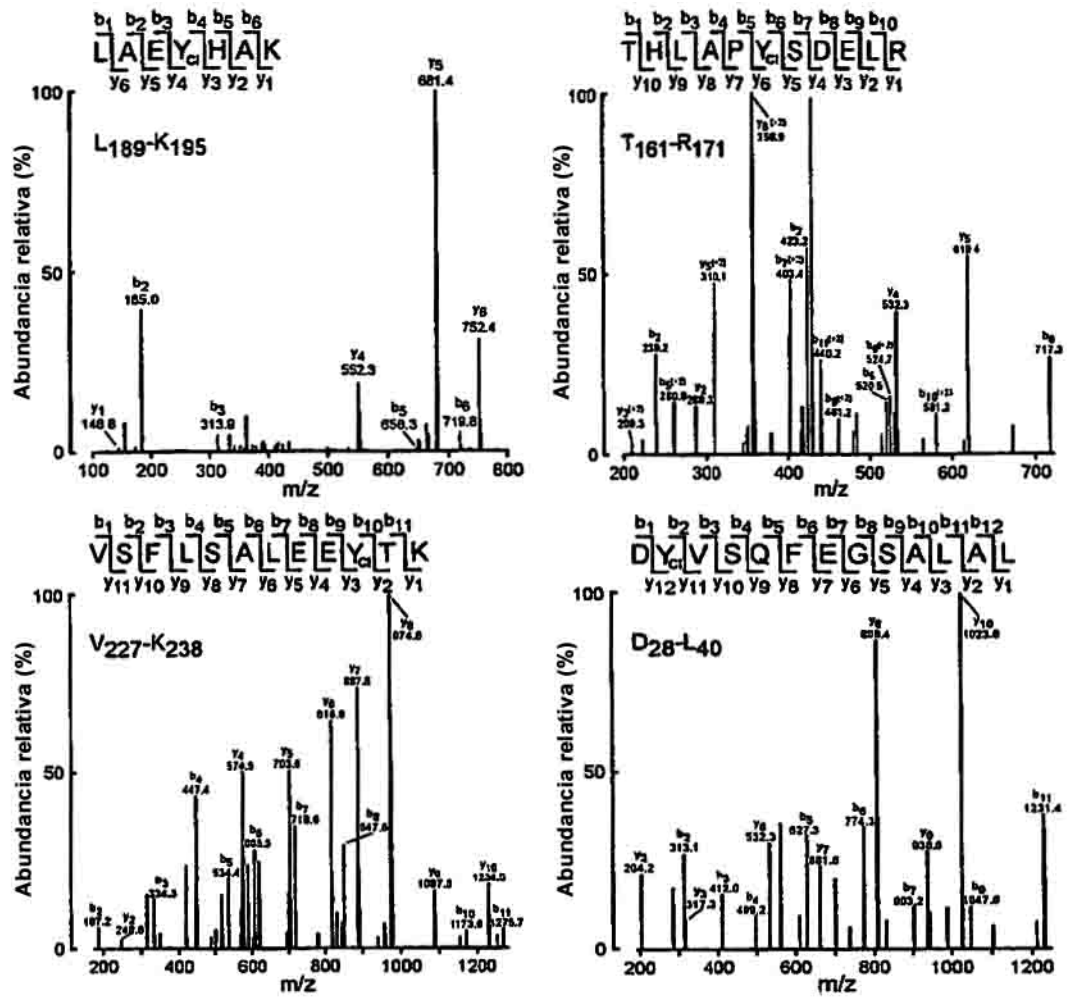


Figura 2

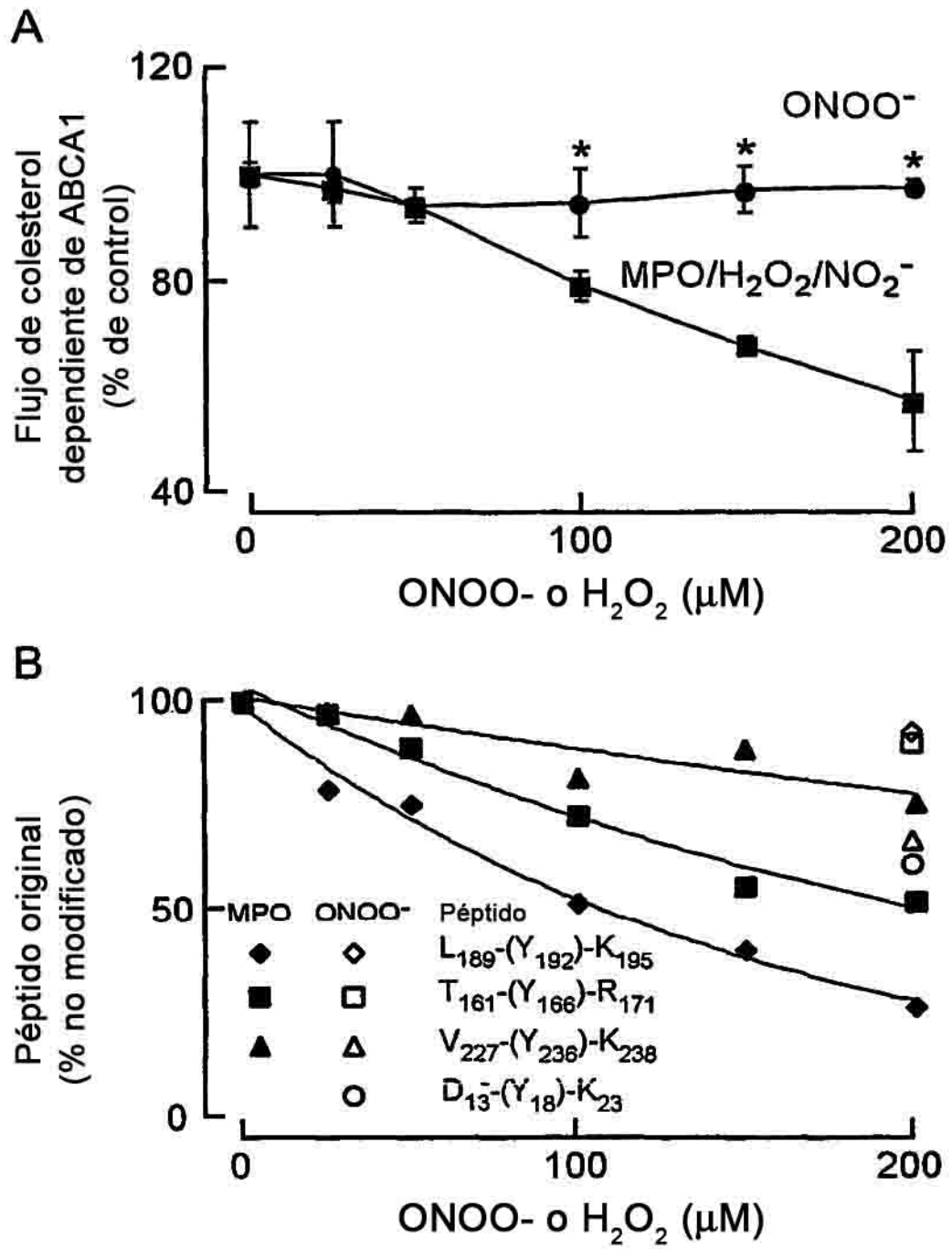


Figura 4

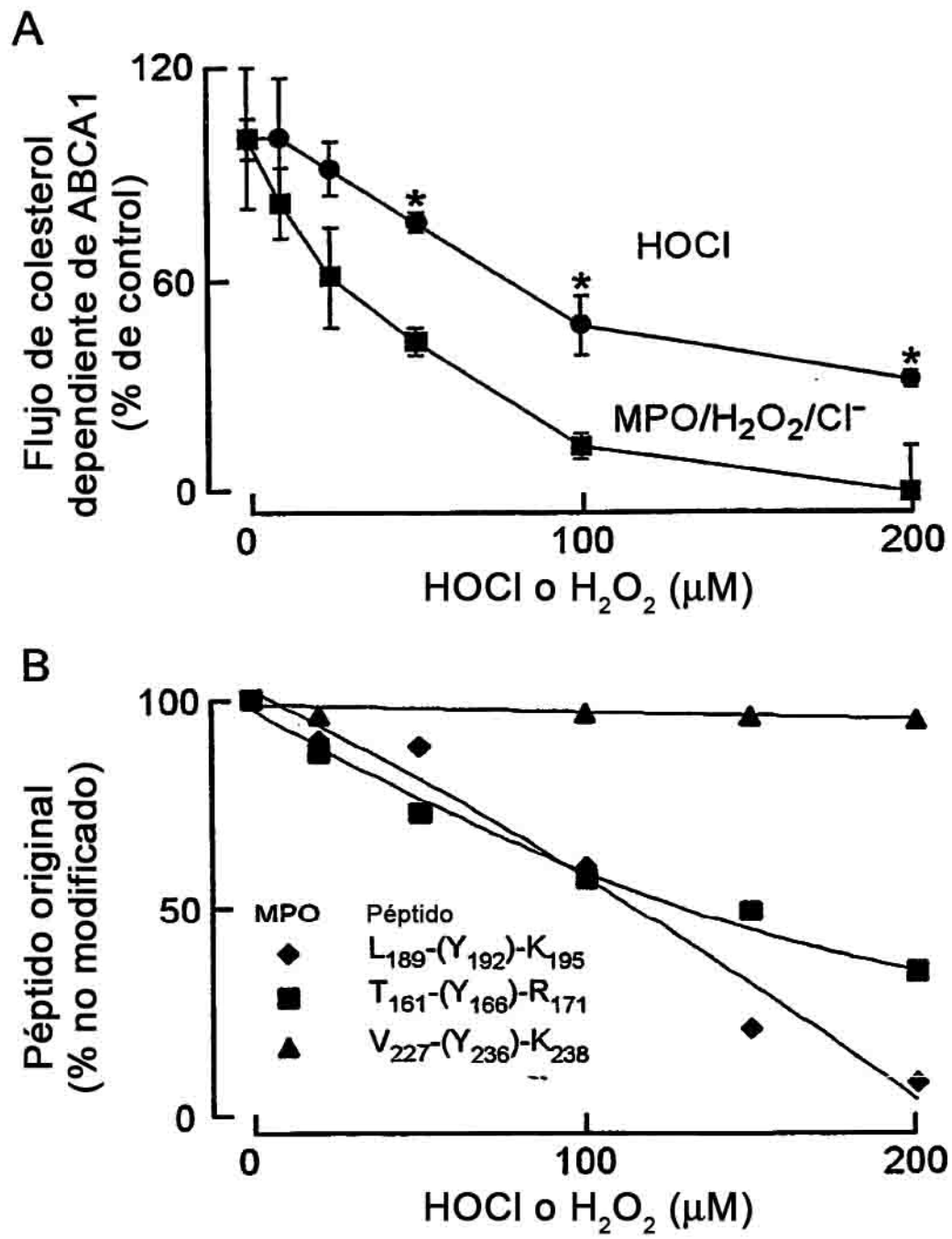


Figura 5

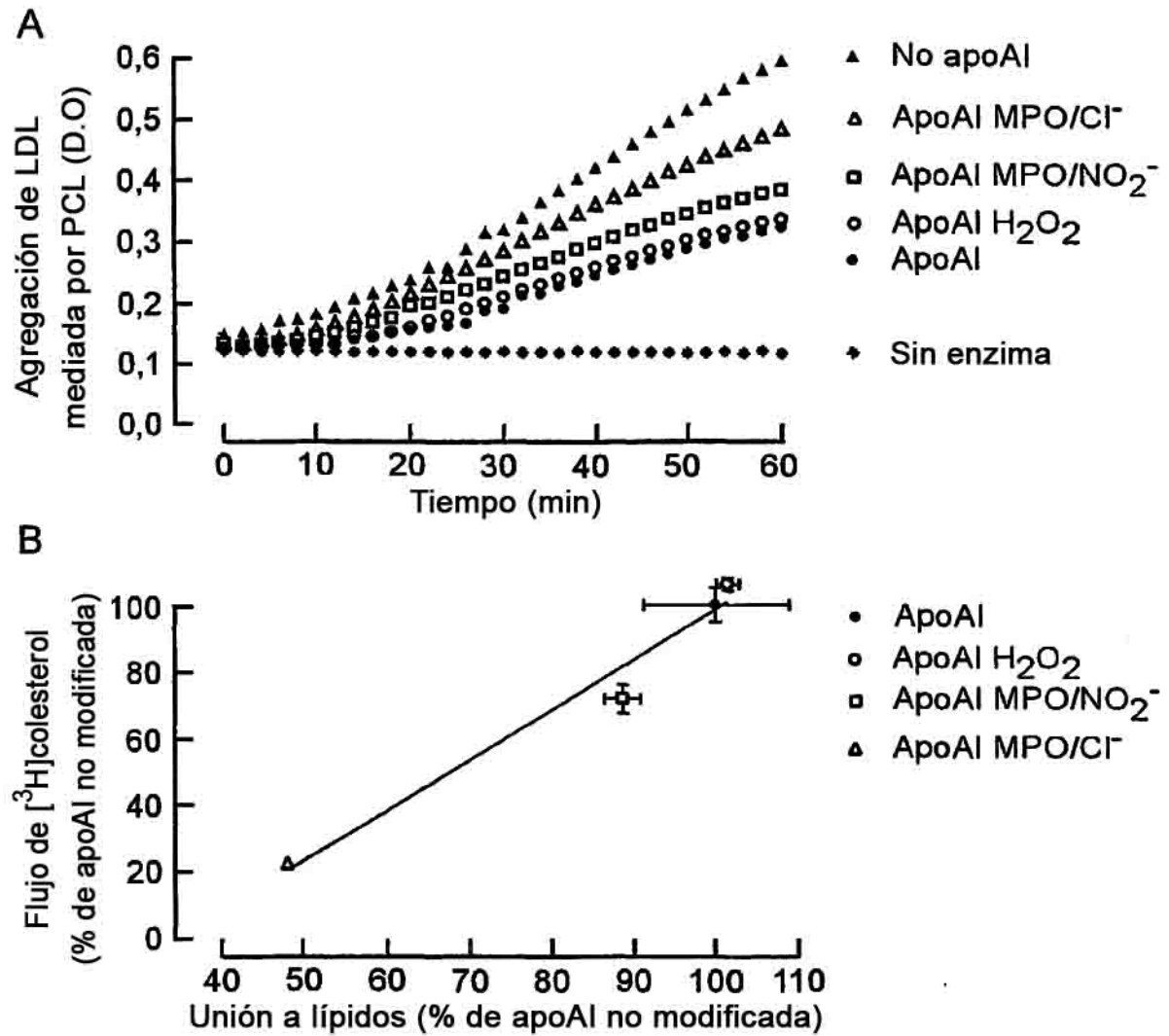


Figura 6

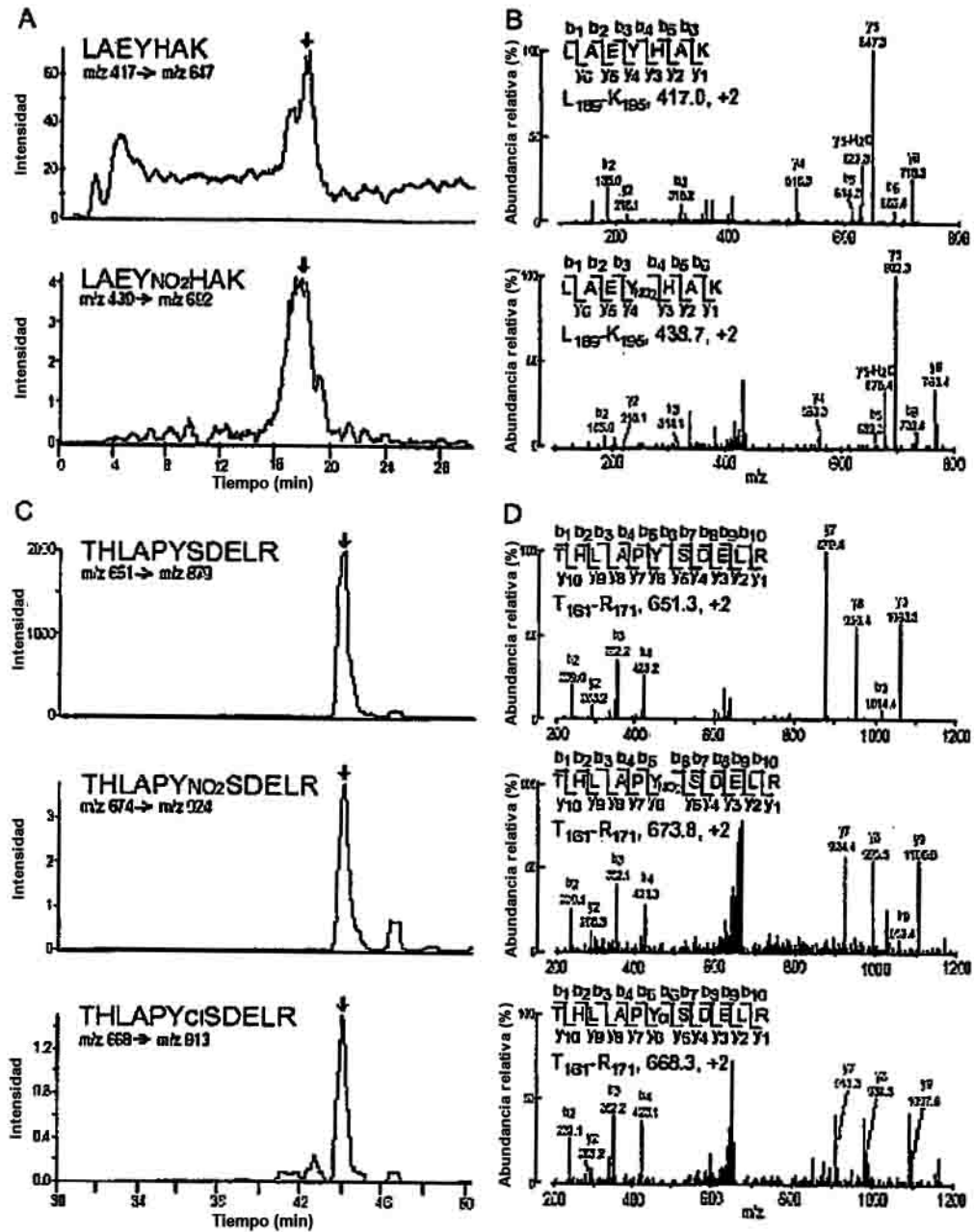


Figura 7

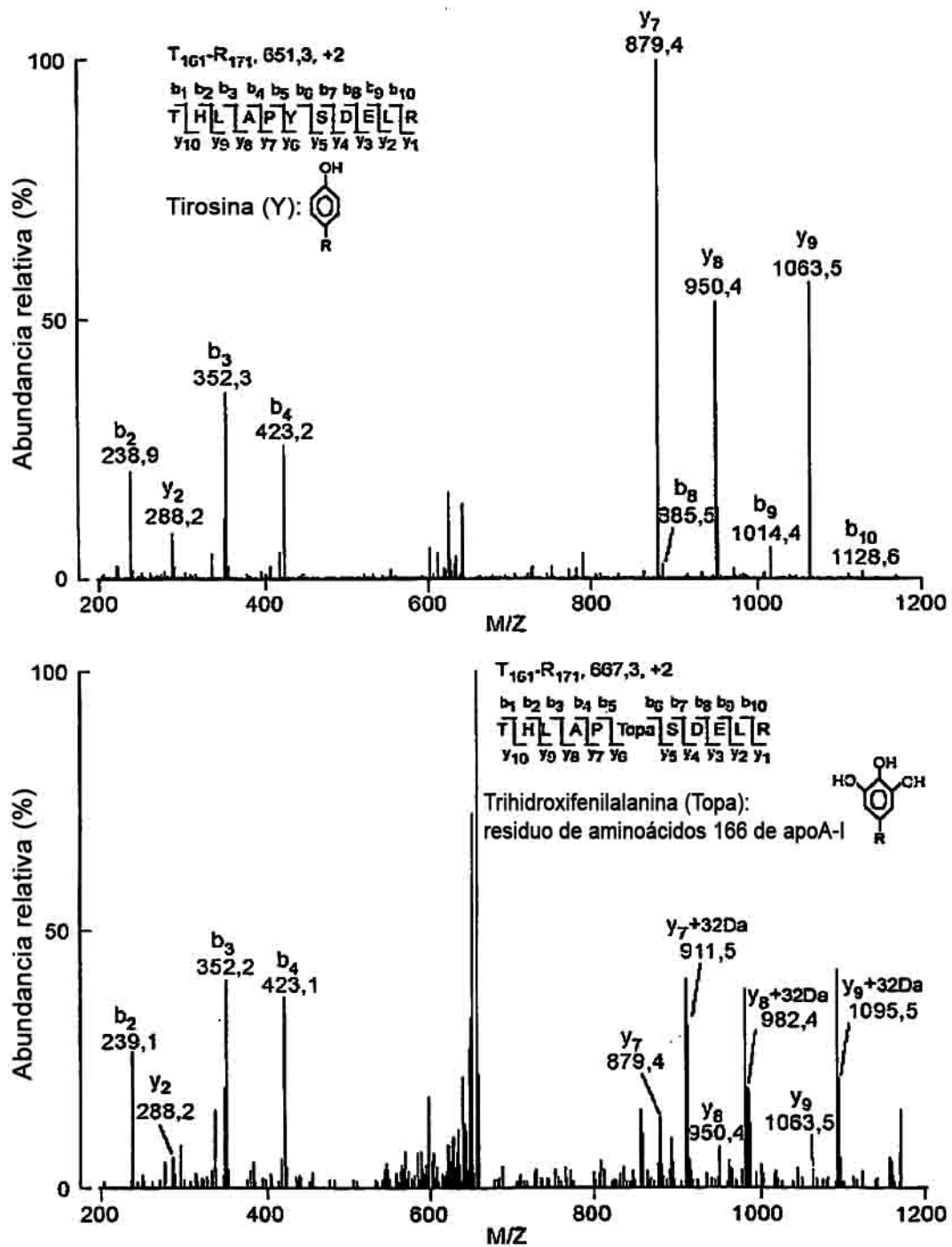


Figura 8A

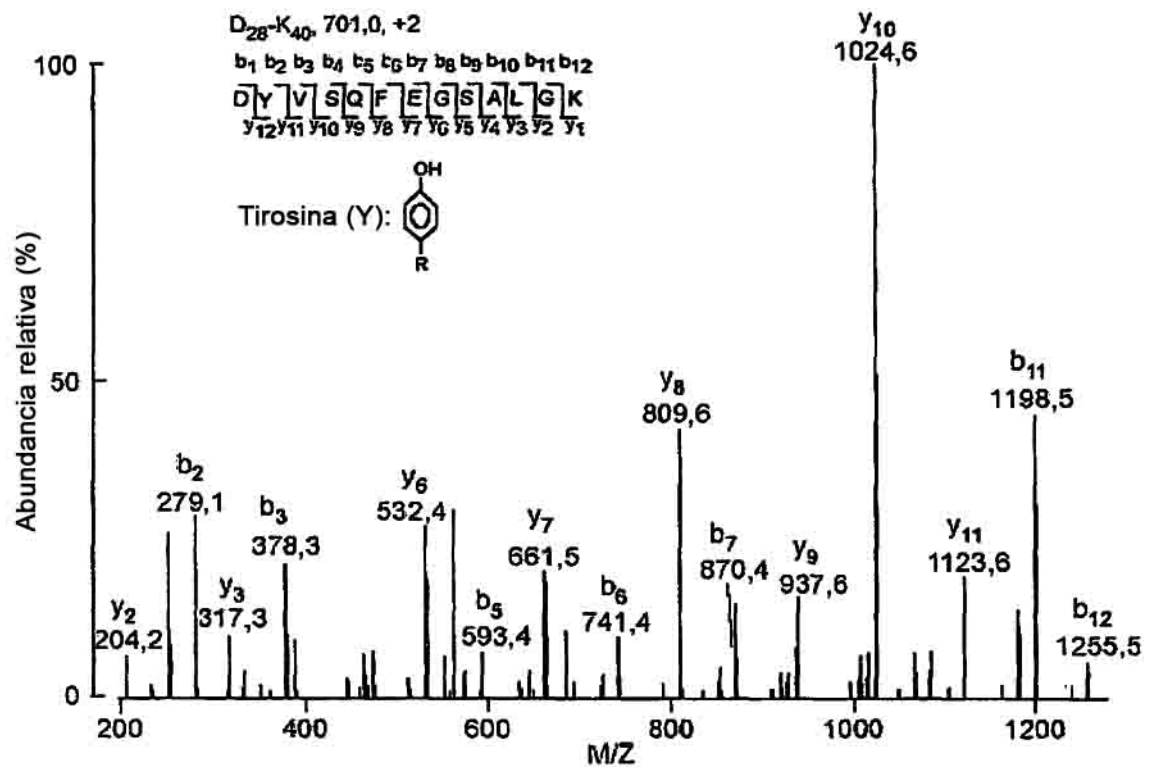
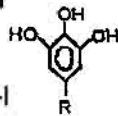


Figura 8B

D₂₈-K₄₀, 717,0, +2

b₁ b₂ b₃ b₄ b₅ b₆ b₇ b₈ b₉ b₁₀ b₁₁ b₁₂
D T o p a V S Q F E G S A L G K
y₁₂ y₁₁ y₁₀ y₉ y₈ y₇ y₆ y₅ y₄ y₃ y₂ y₁

Trihidroxifenilalanina (Topa):
residuo de aminoácidos 29 de apoA-I



b₁ b₂ b₃ b₄ b₅ b₆ b₇ b₈ b₉ b₁₀ b₁₁ b₁₂
D Y V S Q D o p a E G S A L G K
y₁₂ y₁₁ y₁₀ y₉ y₈ y₇ y₆ y₅ y₄ y₃ y₂ y₁

Dihidroxifenilalanina (Dopa):
residuo de aminoácidos 33 de apoA-I

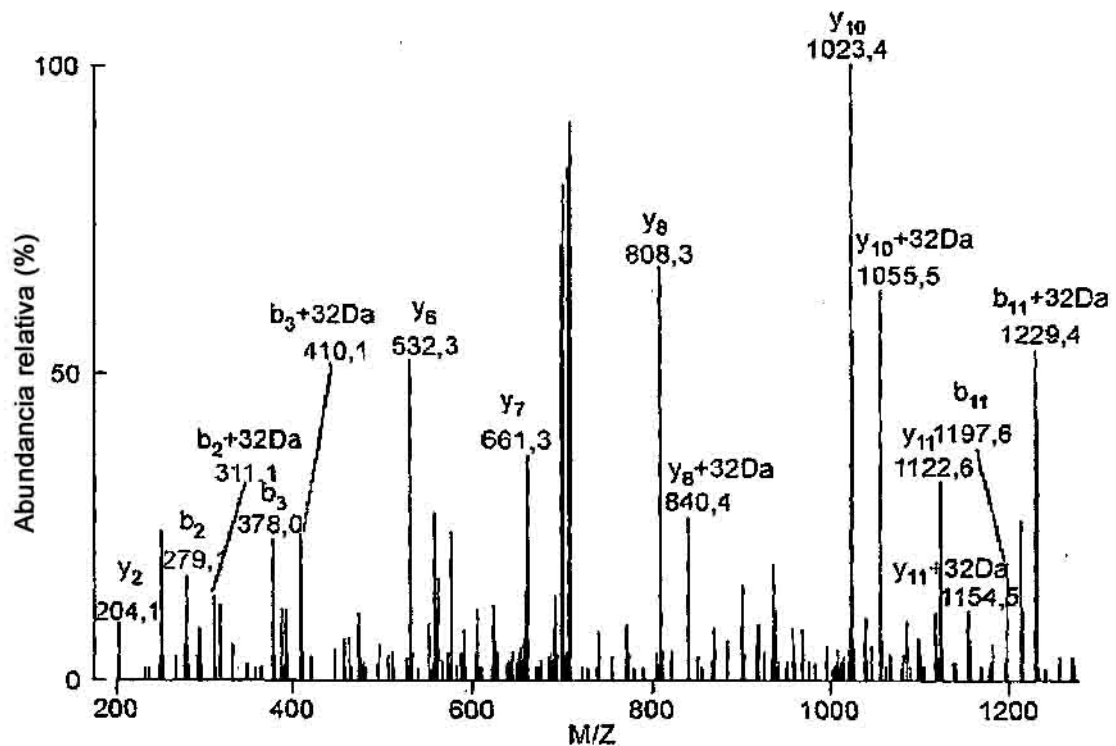
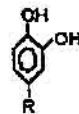


Figura 8C

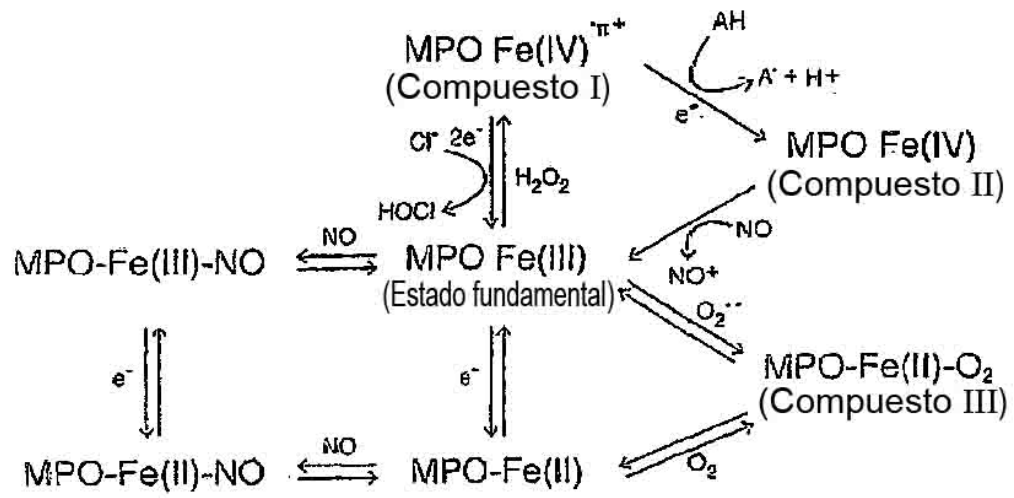


Figura 9

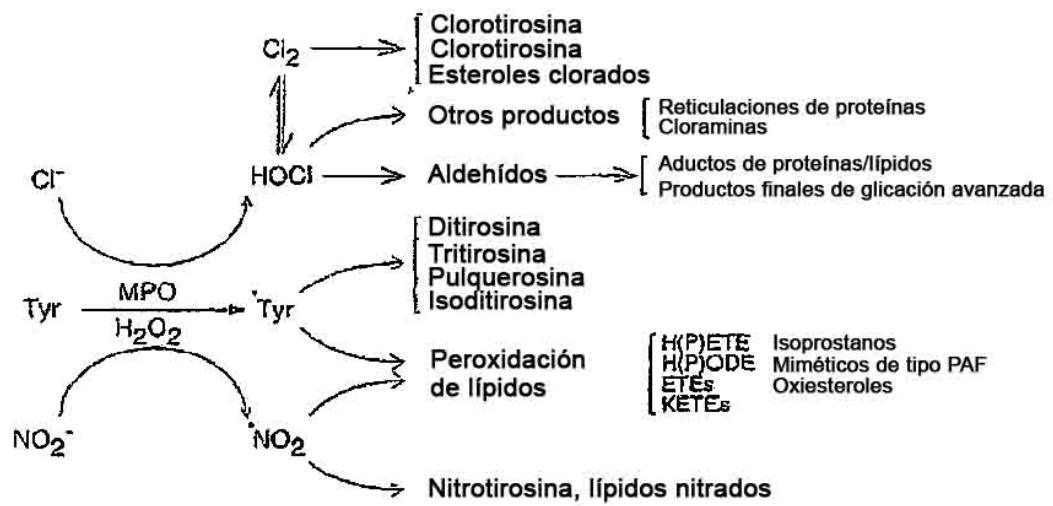


Figura 10