

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 344**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/573 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2005 E 05712595 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 1718967**

54 Título: **Métodos para determinar la actividad de Lp-PLA2.**

30 Prioridad:

03.02.2004 US 541583 P

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

31.07.2013

73 Titular/es:

**DIADEXUS, INC. (100.0%)
343 OYSTER POINT BOULEVARD
SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**WOLFERT, ROBERT L.;
KIM, NAM y
DUAN, XIAOZHU**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 416 344 T3

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

DESCRIPCIÓN**ÁMBITO DE LA INVENCION**

La presente invención se refiere a métodos para determinar la actividad de la Fosfolipasa A2 asociada a la Lipoproteína (Lp-PLA2). Concretamente, se refiere a determinar la actividad de Lp-PLA2 por el uso de aglutinadores específicos de Lp-PLA2 y/o sustratos con capacidad para convertirse en un producto detectable en varios formatos. Además, esta invención se refiere a un ensayo de actividad de inmunocaptura híbrida para determinar de forma específica la actividad de Lp-PLA2.

ORÍGENES DE LA INVENCION**Introducción**

La Fosfolipasa A2 asociada a la lipoproteína (Lp-PLA2) es una proteína 50 kD enzimáticamente activa. Lp-PLA2 es un miembro de la familia de las fosfolipasas A2 y, a diferencia de la mayoría de las fosfolipasas, es Ca^{2+} independiente. Lp-PLA2 ha sido identificada y descrita anteriormente en la bibliografía de Tew et al. (1996) *Arterioscler. Thromb. Vase. Biol.* 16:591-599, Tjoelker, et al. (1995) *Nature* 374(6522):549-53) y Caslake et al. (2000) *Atherosclerosis* 150(2): 413-9. Igualmente se han descrito la proteína y los inmunoensayos en la bibliografía sobre patentes WO 95/00649-A1, Patentes de EE.UU. 5.981.252; 5.968.818; y 6.177.257 (para SmithKline Beecham) y WO 00/24910-A1, Patentes de EE.UU. 5.532.152 ; 5.605.801; 5.641.669; 5.656.431; 5.698.403; 5.977.308; y 5.847.088 (para ICOS Corporation). Lp-PLA2 se expresa por macrófagos, con una expresión incrementada en las lesiones ateroscleróticas (Hakkinin (1999) *Arterioscler Thromb Vase Biol* 19(12): 2909-17). Lp-PLA2 circula ligada principalmente a LDL, copurifica con LDL, y es responsable del >95% de la actividad de la fosfolipasa asociada con LDL (Caslake 2000).

En estudios recientes, los niveles de fosfolipasa A2 asociada a la lipoproteína (Lp-PLA2) han demostrado estar significativamente correlacionados en hombres con enfermedad coronaria angiográficamente demostrada (CHD) (Caslake 2000) y asociada a hombres con hipercolesterolemia (Packard (2000) *N Engl J Med* 343(16): 1148-55).

La enfermedad coronaria del corazón (CHD) es la única enfermedad mortal más frecuente en los Estados Unidos. Para el año 2003, se estima que aproximadamente 1,1 millones estadounidenses tendrá un nuevo o recurrente ataque coronario (ver la página web de la American Heart Association, americanheart con la extensión .org de la World Wide Web). Aproximadamente el 60% de estos individuos no presentaron anteriormente factores de riesgo. Es evidente que existe una gran necesidad de diagnosticar a los individuos con riesgo de desarrollar enfermedades del corazón, seleccionando a pacientes adecuados para la terapia y hacer un seguimiento de la respuesta a las terapias aplicadas y reducir el riesgo del individuo.

Se han publicado varios métodos para detectar la proteína Lp-PLA2, los cuales incluyen inmunoensayos (Caslake, 2000), ensayos de actividad (Kit de ensayo PAF Acetylhydrolase, Cat#760901, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, 12/18/97 (caymanchem con la extensión . com de la World Wide Web); El kit Auto PAF-AH de Azwell disponible en Nesco Company, Azwell Inc., 2-24-3 Sho, Ibaraki, Osaka, Japón o Karlan Chemicals, Cottonwood, Arizona, ver también Kosaka (2000)), ensayos espectrofotométricos para la actividad en suero de la acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas (*Clin Chem Acta* 296: 151-161, WO 00/32808 (para Azwell)). Otros métodos publicados para detectar Lp-PLA2 incluyen WO 03/048172(para SIRS-LAB) y WO 2005/001416 (para Glaxo). Ninguno de esos documentos o solicitudes publicados ofrecen un método para medir la actividad y la masa de Lp-PLA2.

Recientemente, la United States Food and Drug Administration (FDA) ha dado la autorización para realizar una prueba ELISA para la determinación cuantitativa de Lp-PLA2 en plasma humano para su utilización como predictor de riesgo para enfermedades cardíacas coronarias (CHD) ((2003) Sep-Oct; La nueva prueba predice el riesgo cardiaco. FDA Consum. 37 (5): 6.

5 Estos formatos de ensayo tienen limitaciones. Por ejemplo, los ensayos que miden solo la actividad enzimática sufren la actividad competitiva para el sustrato por parte de otras enzimas o sustancias presentes en la muestra de prueba. Por ejemplo, muchos miembros de la familia de la fosfolipasa A2 muestran actividad enzimática hacia la fosfatidilcolina oxidada. Además, el ensayo de actividad Cayman sufre la señal de fondo debido a las sustancias en suero que convierten el sustrato independiente de la actividad de Lp-PLA2.
10 Concretamente, el kit Cayman se basa en la detección de tiol libre como parte de la metodología. Mientras que el ensayo Cayman puede funcionar bien en un entorno de laboratorio, la detección de tioles libres hace que el kit Cayman sea poco adecuado para medir Lp-PLA2 (o PAF-AH) en muestras humanas a causa de los numerosos tioles libres en las muestras de plasma, suero o tejido humano. Además, los ensayos existentes pueden detectar una actividad erróneamente elevada debido a la falta de especificidad. Las mediciones falsas de actividad en un
15 entorno clínico pueden conducir a un diagnóstico inadecuado de la enfermedad, o una respuesta de un paciente a un tratamiento concebido para reducir la actividad enzimática.

En cambio, los inmunoensayos convencionales basados en anticuerpos son altamente específicos y capaces de detectar y cuantificar la cantidad de un objetivo de interés entre otras proteínas estrechamente relacionadas. Sin embargo, no son capaces de determinar el nivel de actividad enzimática del objetivo. Mientras
20 que este formato de ensayo asegure que sólo se está midiendo la proteína de interés, esta limitación impide que tales ensayos sean herramientas útiles en el seguimiento de una respuesta a un inhibidor de la enzima. En consecuencia, existe una gran necesidad de un ensayo capaz de seleccionar específicamente la Lp-PLA2 de entre otros miembros de la familia PLA2 que sea más capaz de medir la actividad enzimática de Lp-PLA2.

25 **La enfermedad cardíaca coronaria**

La enfermedad coronaria vascular (ECV) abarca todas las enfermedades de la vasculatura, incluyendo presión arterial alta, la enfermedad cardíaca coronaria (CHD), accidente cerebrovascular, defectos cardiovasculares congénitos, e insuficiencia cardíaca congestiva. Los estudios han demostrado que la CHD es responsable de la mayoría de las ECV. La prevalencia de enfermedad coronaria aumenta notablemente en
30 función de la edad, los hombres tienen una mayor prevalencia sobre las mujeres dentro de la mayoría de los grupos de edad.

El estándar actual de cuidados para identificar individuos con riesgo sufrir una enfermedad cardíaca es la medición de un panel de lípidos, incluyendo triglicéridos, colesterol total, el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Panel de Tratamiento en Adultos III).
35 Resumen ejecutivo del Tercer Informe del Panel de Expertos en Detección, Evaluación y Tratamiento de la Hipercolesterolemia en Adultos del National Cholesterol Education Program (NCEP), (Panel de Tratamiento en Adultos III). JAMA (2001) 285 (19): 2486-97. De acuerdo con las recientes directrices (2001) del Panel de Tratamiento de Adultos III (ATP III), en función de la puntuación de los factores de riesgo, a los individuos con niveles de colesterol LDL de ≥ 100 a ≤ 130 mg /dL se les recomienda iniciar los cambios terapéuticos en su estilo
40 de vida. A los adultos con colesterol LDL >130 mg/dL se les recomienda la terapia intensiva en el estilo de vida y un tratamiento farmacológico reductor del colesterol LDL para alcanzar un objetivo de colesterol LDL de <100

mg /dL. Los pacientes con niveles de LDL > 160 mg /dL deben tenerse en cuenta para las terapias con fármacos hipolipemiantes. La American Heart Association ha estimado que más de 100 millones de adultos en los EE.UU. superan el nivel óptimo de colesterol total. Ver la página web de la americanheart.org de la World Wide Web.

5 Mientras que la investigación continúa vinculando elevados niveles de colesterol LDL con el riesgo de cardiopatía coronaria, es bien entendido que un número importante de individuos con niveles normales de colesterol LDL experimentan un evento cardíaco, lo que sugiere que otros factores no reconocidos actualmente pueden estar implicados (Eaton (1998) J Am Board Fam Pract 11 (3): 180-6). En la búsqueda de nuevos factores de riesgo, se ha prestado una atención significativa en los últimos años a los marcadores de inflamación, al tiempo que surge un cuerpo creciente de investigación básica y clínica en relación con el papel de la inflamación en la aterogénesis (Lusis (2000) Atherosclerosis. Nature 407 (6801): 233-41; Lindahl (2000) N Engl J Med 343 (16): 1139-1147). Algunos de los marcadores inflamatorios investigados incluyen moléculas de adhesión celular, ligando CD-40, interleucina 6 y la proteína C reactiva (CRP, medida por el método de alta sensibilidad, o hsCRP). CRP, un marcador no específico de la fase inflamatoria aguda, ha recibido recientemente una atención considerable como indicador de riesgo potencial para la CHD (Ridker (2002) N Engl J Med 347 (20): 1557-65; Blake (2002)); J Intern Med 252 (4):283-94). Sin embargo, CRP es bien conocida por ser sensible a muchas fuentes de inflamación, lo que justifica investigaciones adicionales para identificar los marcadores más específicos de la participación arterial.

20 La patogénesis de la aterosclerosis que conduce a la formación de la placa inestable se ha reconocido como una de las causas principales de la cardiopatía coronaria (Lusis 2000). Recientemente, un nuevo conocimiento de la patogénesis de la aterosclerosis ha hecho hincapié en el proceso inflamatorio como un elemento clave para la formación de la placa inestable. La inestabilidad de la placa aterosclerótica, más que el grado de la estenosis, se considera que es el principal culpable en la mayoría de los infartos de miocardio (MI). Esta evidencia ha llevado a la investigación de la biología de la placa y el reconocimiento de que los marcadores de inflamación pueden ser útiles como predictores de riesgo cardiovascular. Entre los diversos marcadores de candidatos de inflamación, CRP (medido por el método de alta sensibilidad, hs-CRP), un marcador no específico de fase inflamatoria aguda ha recibido la mayor atención como un predictor de enfermedad coronaria (Ridker 2002).

La base molecular de la enfermedad

30 La oxidación de LDL en el espacio endotelial de la arteria se considera una etapa crítica en el desarrollo de la aterosclerosis. Se ha demostrado que el LDL oxidado, a diferencia de LDL nativo, se asocia con una serie de actividades pro-inflamatorias y pro-aterogénicas, que finalmente pueden conducir a la formación de la placa aterosclerótica (Glass (2001) Cell 104 (4): 503-16; Witztum (1994) Lancet 344 (8925): 793-5). El aumento de la evidencia de la investigación básica sugiere que la aterosclerosis tiene un componente inflamatorio y representa mucho más que la simple acumulación de lípidos en la pared vascular. La manifestación más temprana de una lesión es la estría grasa, principalmente compuesta por macrófagos cargados de lípidos se conocen como células espumosas. Los precursores de estas células son monocitos circulantes. La respuesta inflamatoria subsiguiente puede estimular la migración y proliferación de células musculares lisas y los monocitos al lugar de la lesión, para formar una lesión intermedia. Al tiempo que las capas de macrófagos y células musculares lisas se acumulan, se forma una placa fibrosa que se caracteriza por un núcleo necrótico compuesto de restos celulares, lípidos, colesterol, sales de calcio y una capa fibrosa de músculo liso de colágeno y proteoglicanos. El crecimiento gradual de esta lesión avanzada eventualmente puede proyectarse en el lumen arterial, impidiendo el flujo de sangre. La progresión adicional de la aterosclerosis puede conducir a la ruptura de la placa y la

formación posterior de trombos, resultando en los síndromes coronarios agudos como la angina inestable, infarto de miocardio o muerte súbita isquémica (Davies (2000) *Heart* 83:361-366; Libby (1996) *Curr Opin Lipidol* 7 (5): 330-5).

5 Lp-PLA2 desempeña un papel clave en el proceso de aterogénesis por hidrólisis del ácido graso de posición sn-2 de LDL modificada por oxidación, lo que resulta en la formación de lisofosfatidilcolina y ácidos grasos libres oxidados (Macphee (1999) *Biochem J* 338 (Pt 2): 479 -87). Se cree que estos dos productos de fosfolípidos oxidados de acción Lp-PLA2 contribuyen al desarrollo y la progresión de la aterosclerosis, por su capacidad de atraer monocitos y contribuir a la formación de células espumosas, entre otras acciones pro-inflamatorias (Macphee (2001) *Curr Opin Pharmacol* 1 (2): 121-5; Macphee (2002) *Expert Opin Ther Targets* 6
10 (3): 309-14).

Estudios clínicos

Lp-PLA2 ha sido previamente documentada como un posible factor de riesgo de cardiopatía coronaria. El valor predictivo de los niveles plasmáticos de Lp-PLA2 para cardiopatías coronarias se ha publicado en un extenso estudio prospectivo de casos y controles de ensayo clínico que incluyó a 6.595 hombres con
15 hipercolesterolemia, conocido como el West of Scotland Coronary Prevention Study (Estudió sobre la Prevención Coronaria del Oeste de Escocia o WOSCOPS) (Packard, 2000). La Lp-PLA2 se midió en 580 casos de cardiopatía coronaria (definida por IM no mortal, muerte por enfermedad coronaria, o un procedimiento de revascularización) y 1.160 controles emparejados. Los resultados indicaron que los niveles plasmáticos de Lp-PLA2 se asociaron significativamente con el desarrollo de eventos cardiovasculares mediante análisis
20 univariados y multivariados, con casi el doble del riesgo relativo de eventos cardiovasculares para el quintil más alto de Lp-PLA2 en comparación con el quintil más bajo. La asociación de Lp-PLA2 con cardiopatías coronarias fue independiente de otros factores de riesgo tradicionales como colesterol LDL y otras variables. Este estudio proporcionó un indicio alentador preliminar de la utilidad clínica de Lp-PLA2 como factor de riesgo para cardiopatía coronaria.

25 Por otra parte, en un estudio de la cardiopatía coronaria angiográficamente demostrada, Lp-PLA2 demostró estar significativamente asociada con el grado de estenosis coronaria (Caslake 2000).

En otro estudio, en el que sólo fueron examinadas mujeres (n = 246, 123 casos y 123 controles), los niveles basales de Lp-PLA2 fueron mayores entre los casos que en los controles (p = 0,016), pero no se asoció significativamente con las enfermedades del corazón cuando se ajustaron para otros factores de riesgo
30 cardiovasculares. En este estudio, los casos incluyeron un 40% de las mujeres con accidente cerebrovascular, 51% infarto de miocardio no mortal y 9% de CHD mortal (Blake (2001) *J Am Coll Cardiol* 38 (5): 1302-6).

Recientemente, varios estudios a gran escala se han sumado a la evidencia clínica. Por ejemplo, el estudio del Riesgo de Arteriosclerosis en Comunidades (Atherosclerosis Risk in Communities Study, ARIC) fue diseñado para estudiar, durante un período de diez años, la etiología, factores de riesgo, las secuelas clínicas y
35 las alternativas de tratamiento para la aterosclerosis. Fue patrocinado por los National Institutes of Health (NIH) y participaron 15.792 hombres y mujeres aparentemente sanos, de 45 a 64 años, en cuatro comunidades de los Estados Unidos. En un estudio retrospectivo de las muestras conservadas en bancos, los individuos con LDL <130 mg /dLI, pero con niveles elevados de Lp-PLA2 (tercil superior) tenían un riesgo 2,08 veces mayor de un evento coronario en comparación con los individuos con bajos niveles de Lp-PLA2 (Ballantyne (2004) *Circulation*.
40 109 (7) :837-42).

Recientemente, el Estudio sobre el Seguimiento de las Tendencias y Determinantes en Enfermedades Cardiovasculares (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Diseases Study, MONICA) fue un proyecto de la Organización Mundial de la Salud en el que se recopilaron datos de 282.279 hombres aparentemente sanos de áreas urbanas y rurales en veintidós países. En un estudio posterior utilizando muestras de suero de una sub-población de los sujetos de MONICA se investigó la asociación entre Lp-PLA2 y eventos coronarios. En este subestudio, 934 hombres, de comprendidas entre los 45 y 64 años, fueron estudiados durante 14 años. Los niveles medios basales de Lp-PLA2 fueron significativamente mayores en los casos en comparación con los no casos ($p = 0,01$). Un aumento de una desviación estándar en la concentración de Lp-PLA2 medida mediante un ELISA se asoció en el análisis univariado con un riesgo relativo de 1,37 ($p = 0,0002$), y la asociación de riesgo siguió siendo estadísticamente significativa incluso después de ajustar para otros factores como la edad, la diabetes, el tabaquismo, la presión arterial, los niveles de lípidos, el IMC y el nivel de CRP (riesgo relativo: 1,21, $p < 0,04$). En este estudio, los individuos con los más altos niveles tanto de Lp-PLA2 y CRP tenían un riesgo 1,9 veces mayor que los individuos con niveles bajos de ambos marcadores.

Enfermedad vascular periférica y accidente cerebrovascular

El accidente cerebrovascular es una causa principal de muerte y discapacidad en el mundo industrializado. Hay aproximadamente 700.000 accidentes cerebrovasculares en los Estados Unidos por año, de los cuales 500.000 son accidentes cerebrovasculares que se producen por primera vez en los pacientes. Estos ataques son la causa de una de cada quince muertes en los Estados Unidos y dejan un gran número de supervivientes con discapacidades (1,1 millones en los EE.UU. en 1999). El costo total anual del ictus se estima en 53,6 mil millones dólares en 2004 en los Estados Unidos. Los datos presentados en el Estudio Rotterdam - Oei et al (Sociedad Europea de Cardiología en agosto de 2004) y del estudio ARIC - Ballantyne et al. (Sesiones Científicas de la American Heart Association (AHA) en noviembre de 2004) indican que Lp-PLA2 es un factor de riesgo independiente para el accidente cerebrovascular. Además, el estudio ARIC sobre los accidentes cerebrovasculares indicó que la medición tanto de hsCRP y Lp-PLA2 resultó especialmente útil para la evaluación del riesgo de accidente cerebrovascular.

La enfermedad vascular periférica (EVP) es una condición casi pandémica que tiene el potencial de causar la pérdida de una extremidad, o incluso la pérdida de la vida. La EVP se manifiesta como irrigación insuficiente de los tejidos causada por la aterosclerosis existente que puede ser aguda agravada o bien por embolias o por trombos. Debido a la conexión entre la Lp-PLA2, la aterosclerosis y la inflamación vascular, la medición de los niveles de Lp-PLA2 puede ser útil para detectar, diagnosticar o monitorear la EVP. Recientemente Santos et al. publicaron estudios de Lp-PLA2 y el índice tobillo-brazo (ITB), una medida de la enfermedad vascular periférica. Hallaron que Lp-PLA2 es un predictor significativo limítrofe del ITB inferior ($p = 0,05$), mientras que los otros marcadores que estudiaron CRP y el recuento de leucocitos (CMB) no fueron significativos (Santos (2004) *Vase Med* 9 (3):171-6).

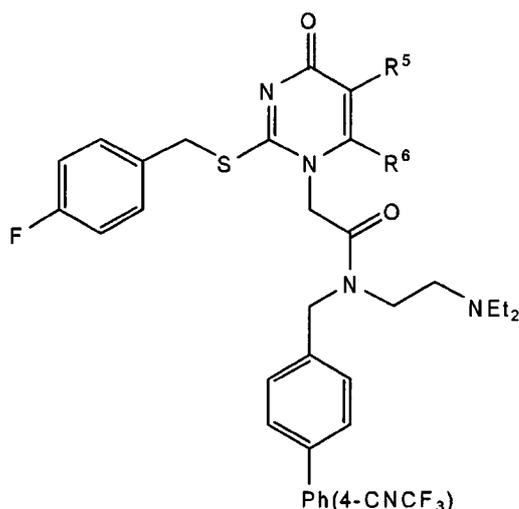
Otras enfermedades

La Lp-PLA2 se ha implicado en otras enfermedades incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria (Grissom (2003) *Crit Care Med*. 31 (3):770-5), la nefropatía por inmunoglobulina A (Yoon (2002) *Clin Genet* 62 (2):128-34), la permeabilidad del injerto de derivación femoropoplítea (Unno (2002) *Surgery* 132 (1):66-71), inflamación oral (McManus y Pinckard (2000) *Crit Rev Oral Biol. Med* 11 (2):240-5 8), inflamación de las vías aéreas y la hiperreactividad (Henderson (2000) *J. Immunol* 15:1 64(6):3360-7), VIH y SIDA (Khovidhunkit (1999) *Metabolismo* 48 (12):1524-1531), el asma (Satoh (1999) *Am J Respir Crit Care Med* 159(3):974-9), la artritis reumatoide juvenil (Tselepis (1999) *Arthritis Rheum* 42(2):373-83), efusiones del oído medio humano (Tsuji

(1998) ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.60 (1) :25-9), esquizofrenia (Bell (1997) Biochem Biophys Res Commun 29;. 241 (3):630-9 5), desarrollo de enterocolitis necrotizante (Muguruma, (1997) Adv Exp Med Biol. 407:379-82), y necrosis intestinal isquémica (Furukawa (1993) Pediatr Res. 34 (2) :237-41).

Inhibidores de Lp-PLA2

5 Además, se han publicado varios estudios citando el potencial de Lp-PLA2 como un objetivo terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de la arteria coronaria y la aterosclerosis (Caslake 2000; Macphee 2001; Carpenter (2001) FEBS Lett 505(3):357-63.; Leach (2001) Farmaco 56(1-2):45-50). La evidencia de que la Lp-PLA2 es un objetivo terapéutico para el tratamiento de cardiopatías coronarias se ha publicado en numerosos artículos que describen varios géneros de inhibidores de Lp-PLA2 y su uso. Estos géneros incluyen
 10 pero no se limitan a: inhibidores de la azetidinona, SB-222657, SB-223777 (MacPhee 1999); 2-(alkylthio)-pyrimidin-4-ones reversibles (Boyd et al (2000) Bioorg Med Chem Lett. 10(4):395-8); inhibidores derivados de productos naturales, SB-253514 y análogos (Pinto (2000); Bioorg Med. Chem. Lett. 10(17):2015-7); inhibidores producidos por *Pseudomonas fluorescens* DSM 11579, SB-253514 y análogos (Thirkettle (2000) et al J. Antibiot (Tokio) 53(7):664-9; Busby (2000) J Antibiot (Tokio). 53(7):670-6; Thirkettle (2000) J Antibiot (Tokio). 53(7):733-
 15 5); 2-(alkylthio)-pyrimidones, activo por vía oral 1-((amidolinked)-alkyl)-pyrimidonas (Boyd et al (2000) Bioorg Med Chem Lett. 10(22):2557-61); la pirimidona modificada 5-sustituyente en 1-((amidolinked)-alkyl)-pirimidonas es altamente soluble en agua (Boyd, et al (2001). Bioorg Med. Chem. Lett 2001 20 11(5):701-4); derivado phenylpiperazineacetamide de lipófilo 1-sustituyente en 1-((amidolinked)-alkyl)-pyrimidonas (Bloomer (2001) Bioorg Med Chem Lett. 11(14):1925-9); derivado de 5-(Pyrazolylmethyl) y derivado de 5-
 20 (methoxyprymidinylmethyl) de L-(biphenylmethylamidoalkyl)-pirimidones (Boyd et al (2002) Bioorg Med Chem Lett 12 (1):51-5); derivado fusionado de ciclopentilo, SB-480848, de la pirimidona 5-sustituyente en candidato clínico SB-435495 (Blackie (2003) Bioorg Med. Chem. Lett. 2003 Mar 24;13(6):1067-1070). Hasta la fecha, GlaxoSmithKline (GSK) ha anunciado los datos clínicos positivos de un nuevo compuesto, que se muestra a continuación, el cual reduce drásticamente la actividad de Lp-PLA2. Este inhibidor de Lp-PLA2 puede
 25 representar una nueva generación de fármacos que reducen la enfermedad cardiovascular y las muertes.



R⁵= por ejemplo alkil, R⁵=H
 O
 R⁶, R⁶= cicloalkil

Lp-PLA2 y las estatinas

Winkler publicó recientemente un estudio multicéntrico, doble ciego, aleatorizado que evalúa los efectos de la fluvastatina XL frente al placebo en el nivel de Lp-PLA2 en 89 pacientes con diabetes tipo 2 (fluvastatina 42

y placebo 47) (Winkler (2004) J Clin Endocrinol Metab. 89(3)1153 a 1159). Entre estos individuos, el aumento de la actividad Lp-PLA2 se asoció significativamente con una historia de CAD. El cuartil más alto en términos de Lp-PLA2 fue un riesgo significativamente mayor que el cuartil más bajo (riesgo relativo: 2,09, IC 95%: 1,02 - 4,29; p = 0,043). El tratamiento de fluvastatina redujo la actividad de Lp-PLA2 en un 22,8%. Blankenberg también informó de que la toma de estatinas redujo la actividad Lp-PLA2 medible (Blankenberg (2003) J de Lipid Research 44: 1381-1386).

RESUMEN DE LA INVENCION

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para determinar la actividad enzimática de la fosfolipasa A2 asociada a la lipoproteína (Lp-PLA2) en una muestra que comprende las etapas de poner en contacto un aglutinante inmovilizado, que une específicamente Lp-PLA2 con una muestra; lavado del aglutinante inmovilizado para eliminar el material activo no ligado enzimáticamente o una sustancia interferente(s); poner en contacto el enlace de la Lp-PLA2 con un sustrato convertido en un producto detectable en presencia de Lp-PLA2, y medir el producto detectable indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit para determinar la actividad enzimática de Lp-PLA2 en una muestra que comprende un aglutinante inmovilizado a un soporte sólido que une específicamente Lp-PLA2, una solución de lavado y un sustrato convertido en un producto detectable en la presencia de Lp-PLA2.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para la determinación de la actividad enzimática de Lp-PLA2 en una muestra que comprende las etapas de poner en contacto un aglutinante, que une específicamente Lp-PLA2, con una muestra para formar un complejo aglutinante-Lp-PLA2; inmovilizar el complejo aglutinante-Lp-PLA2; lavar el complejo del aglutinante-Lp-PLA2 inmovilizado para eliminar el material no unido enzimáticamente activo o una sustancia interferente (s); poner en contacto el enlace inmovilizado Lp-PLA2 con un sustrato convertido en un producto detectable en la presencia de Lp-PLA2, y medir el producto detectable indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un kit para determinar la actividad enzimática de Lp-PLA2 en una muestra que comprende un aglutinante que une específicamente Lp-PLA2, un agente de inmovilización inmovilizado a un soporte sólido, una solución de lavado y un sustrato convertido a un producto detectable en presencia de Lp-PLA2.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método para determinar la actividad enzimática de la fosfolipasa A2 asociada a la lipoproteína (Lp-PLA2) en una muestra que comprende las etapas de incubar la muestra con un compuesto que reduce tioles activos en la muestra; poner en contacto la muestra incubada con un sustrato convertido a un producto de tiol libre en la presencia de Lp-PLA2 enzimáticamente activa y medir el producto de tiol libre indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra.

También se describe un kit para determinar de la actividad enzimática de Lp-PLA2 en una muestra que comprende un compuesto que reduce el tiol activo en una muestra y un sustrato convertido a un producto de tiol libre en la presencia de Lp-PLA2 enzimáticamente activa.

Otros aspectos/realizaciones de la invención son los que se describen en las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

La Figura 1A y la Figura 1B muestran esquemas del Ensayo de Inmunocaptura Híbrida.

La Figura 2 muestra la actividad Lp-PLA2 plasmática en el Ensayo HIC-ThioPAF con 2c10 como mAb de captura.

5 La Figura 3 muestra la actividad Lp-PLA2 plasmática en el Ensayo HIC-ThioPAF con B200.1 como mAb de captura.

La Figura 4 muestra la actividad Lp-PLA2 plasmática en el Ensayo HIC-ThioPAF con B501.1 como mAb de captura.

La Figura 5 muestra la actividad Lp-PLA2 plasmática en el Ensayo HIC-MNP con 2c10 como mAb de captura.

10 La Figura 6 muestra la actividad de Lp-PLA2 plasmática en un ensayo comercial ThioPAF.

La Figura 7 muestra el fondo de la muestra plasmática en un ensayo ThioPAF mejorado, con DTNB pero sin sustrato añadido.

La Figura 8 muestra la actividad Lp-PLA2 plasmática tras la etapa de la incubación en el Ensayo ThioPAF mejorado.

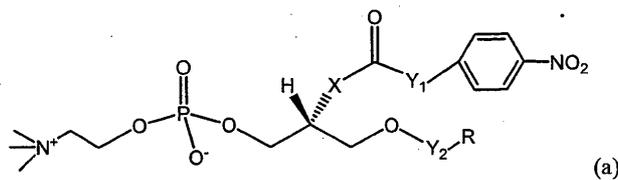
15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esta invención está dirigida a un método para medir la fosfolipasa A2 enzimáticamente activa asociada a la lipoproteína (Lp-PLA2) en una muestra que incluye poner en contacto un aglutinante inmovilizado, que une específicamente Lp-PLA2 con la muestra; lavar el aglutinante inmovilizado para eliminar el material no unido activo enzimáticamente o una sustancia interferente(s); poner en contacto Lp-PLA2 unida con un sustrato convertido en un producto detectable en presencia de Lp-PLA2; y medir el producto detectable indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra. En un aspecto de la invención, la muestra es una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de plasma tratada con EDTA. En otro aspecto de la invención, el aglutinante inmovilizado es un anticuerpo. En un aspecto preferido de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de expresión en fago, o un anticuerpo policlonal. Ejemplos de anticuerpos monoclonales son 2C10, 4B4, B200, B501, 90D1E, 90E3A, 90E6C, 90G11D y 90F2D. El anticuerpo monoclonal puede ser producido por la línea celular de hibridoma 90G11D (ATCC HB 11724), 90F2D (ATCC HB 11725), o 143A (ATCC HB 11900), véase la patente de EE.UU. 5.847.088. Los anticuerpos que unen Lp-PLA2 (o PAF-AH) están disponibles comercialmente de fuentes como el Abcam, Inc. (Cambridge, MA) y AXXORA, LLC (San Diego, CA).

30

En otro aspecto de la invención, el material no unido enzimáticamente activo es una fosfolipasa. En un aspecto adicional de la invención, la sustancia interferente(s) es un compuesto de tiol libre. En otro aspecto más de la invención, el sustrato se selecciona del grupo que formado por



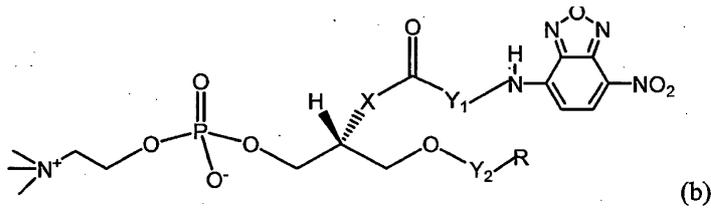
donde,

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

5 Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



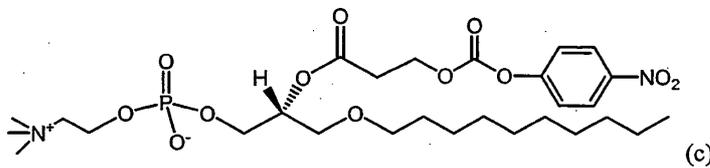
donde,

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

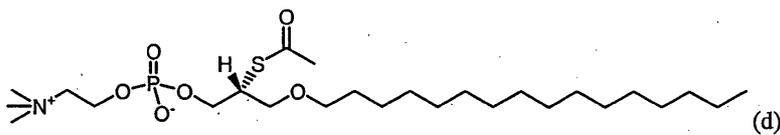
10 R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

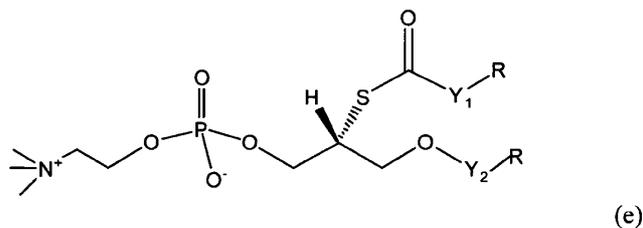
Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



15 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine (MNP);



2-tio-PAF; y



En donde

20 X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

R se selecciona del grupo formado por $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ y $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$;

Y_1 se selecciona del grupo formado por $(\text{CO})_{1-2}$ y $(\text{CH}_2)_{2-7}$; y

Y_2 se selecciona del grupo formado por CO y CH_2 ;

5

En un aspecto adicional de la invención, el sustrato es un derivado oxidado de (a), (b), (c), (d) o (e) anterior.

10 En otro aspecto de la presente invención, el producto detectable tiene una etiqueta radioactiva, colorimétrica, paramagnética o fluorescente. Además, el producto detectable se puede medir fluorimétricamente, colorimétricamente, paramagnéticamente o mediante radiación.

15 Un aspecto adicional de la invención comprende comparar el producto detectable medido con un producto detectable en un control que comprende un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa. En un aspecto adicional de la invención, el estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa es una proteína Lp-PLA2 recombinante o una proteína Lp-PLA2 nativa. En otro aspecto adicional de la invención, la proteína Lp-PLA2 recombinante se expresa en un sistema de expresión de baculovirus o un sistema de expresión de mamífero. En otro aspecto de la presente invención, el aglutinante inmovilizado se une a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética, o una perla de látex.

20 Esta invención también está dirigida a un método para medir Lp-PLA2 enzimáticamente activa en una muestra que incluye: poner en contacto un aglutinante que une específicamente Lp-PLA2 con la muestra para formar un complejo aglutinante-Lp-PLA2; inmovilizar el complejo aglutinante-Lp-PLA2; lavar el complejo aglutinante-Lp-PLA2 inmovilizado para eliminar cualquier material no unido enzimáticamente activo o cualquier sustancia interferente; poner en contacto Lp-PLA2 inmovilizada unida con un sustrato convertido a un producto detectable en presencia de Lp-PLA2; y medir el producto detectable indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra. En otro aspecto de la invención, la muestra es una muestra de suero, de plasma o una muestra de plasma tratada con EDTA. En otro aspecto de la invención, el aglutinante es un anticuerpo. Un aspecto preferido de la invención el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de expresión en fago o un anticuerpo o policlonal. Ejemplos de anticuerpos monoclonales son 2C10, 4B4, B200, B501, 90D1E, 90E3A, 90E6C, 90G1 ID o 90F2D. El anticuerpo monoclonal puede producirse por la línea celular hibridoma 90G11D (ATCC HB 11724), 90F2D (ATCC HB 11725) o 143A (ATCC HB 11900), ver Patente de EE.UU. 5.847.088. Anticuerpos que unen Lp-PLA2 (o PAF-AH) están comercialmente disponibles de fuentes como Abeam, Inc. (Cambridge, MA) y AXXORA, LLC (San Diego, CA).

25 En otro aspecto de la invención, el complejo aglutinante de Lp-PLA2 se moviliza para unirse a un compuesto inmovilizado. En un aspecto adicional, el compuesto inmovilizado es un anticuerpo. En un aspecto preferente de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de expresión en fago o un anticuerpo policlonal. En un aspecto altamente preferente de la invención, el anticuerpo monoclonal, el anticuerpo de expresión en fago o el anticuerpo policlonal es un anticuerpo anti-Ig de rata, un ratón o de cabra.

30 En otro aspecto de la presente invención, el compuesto inmovilizado se une a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética, o una perla de látex.

40 En otro aspecto de la invención el aglutinante se conjuga con un agente inmovilizador. En aspecto adicional de la invención el aglutinante conjugado con agente inmovilizador es un anticuerpo. En un aspecto

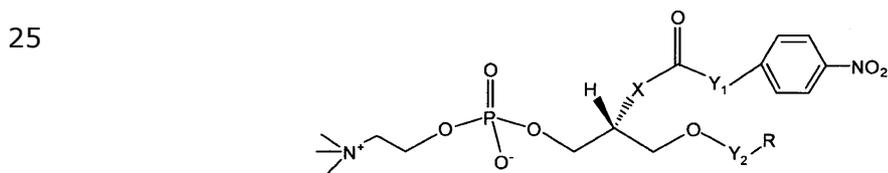
preferido de la presente invención el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de expresión en fago o un anticuerpo policlonal. Ejemplos de anticuerpos monoclonales son 2C10, 4B4, B200, B501, 90D1E, 90E3A, 90E6C, 90G11D, o 90F2D. El anticuerpo monoclonal puede producirse por la línea celular hibridoma 90G11D (ATCC HB 11724), 90F2D (ATCC HB 11725), o 143A (ATCC HB 11900), ver Patente de EE.UU.

5 5.847.088. Los anticuerpos que unen Lp-PLA2 (o PAF-AH) son comercialmente disponibles de fuentes como Abcam, Inc. (Cambridge, MA) y AXXORA, LLC (San Diego, CA).

En otro aspecto de la invención el agente inmovilizador es un anticuerpo, proteína o compuesto capaz de unir un compuesto inmovilizado. En un aspecto preferido de la invención el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de expresión en fago o un anticuerpo policlonal. En un aspecto muy preferido de la invención el anticuerpo monoclonal, el anticuerpo de expresión en fago o el anticuerpo policlonal es un anticuerpo anti-Ig de una rata, un ratón o una cabra. En otro aspecto altamente preferido el agente inmovilizador es biotina.

En un aspecto adicional de la invención, el agente inmovilizador, conjugado con el complejo aglutinante de Lp-PLA2, se une a un compuesto inmovilizado. En un aspecto preferido, el compuesto inmovilizado se une a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética, o una perla de látex. En otro aspecto de la invención, el compuesto unido es un anticuerpo, proteína o compuesto capaz de unirse al agente inmovilizador conjugado. En un aspecto preferido de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de expresión en fago, o un anticuerpo policlonal. En un aspecto muy preferido de la invención, el anticuerpo monoclonal, el anticuerpo de expresión en fago, o el anticuerpo policlonal es un anticuerpo anti-Ig de rata, ratón o de cabra. En otro aspecto muy preferido el agente inmovilizador es estreptavidina.

En otro aspecto de la invención, el material no unido enzimáticamente activo es una fosfolipasa. En otro aspecto de la invención, la sustancia interferente (s) es un compuesto de tiol libre. En otro aspecto más de la invención, el sustrato se selecciona del grupo formado por



(a)

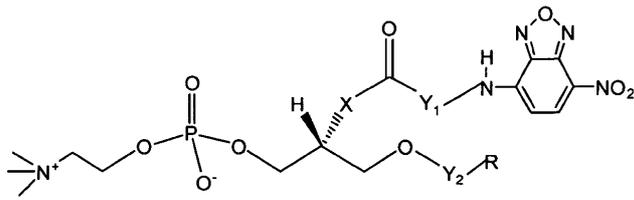
Donde,

30 X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



(b)

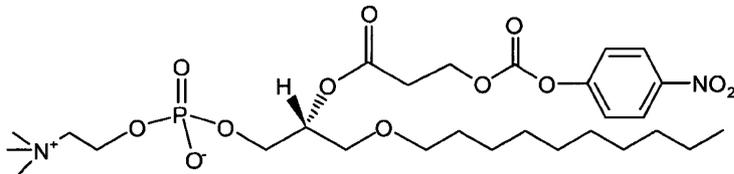
En donde

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

5 R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

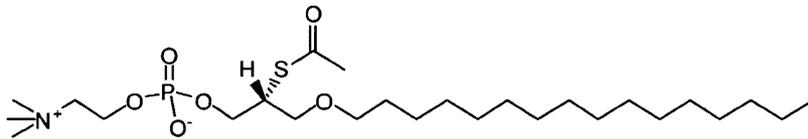
Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



(c)

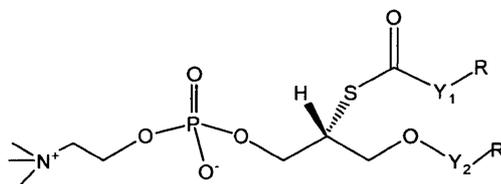
l-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine (MNP);



(d)

10

2-tio-PAF;



(e)

En donde

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

15 R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

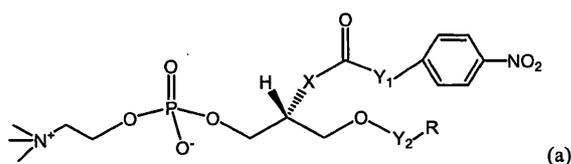
Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;

En otro aspecto de la invención el sustrato es un derivado oxidado de (a), (b), (c), (d) o (e) anterior.

En otro aspecto de la presente invención, el producto detectable tiene una etiqueta radiactiva, colorimétrica, paramagnética o fluorescente. Además, el producto detectable se puede medir fluorimétricamente, colorimétricamente, paramagnéticamente o mediante radiación.

Un aspecto adicional de la invención incluye comparar el producto detectable medido con un producto detectable en un control que comprende un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa. En un aspecto adicional de la invención, el estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa es una proteína Lp-PLA2 recombinante o una proteína Lp-PLA2 nativa. En otro aspecto más de la invención, la proteína Lp-PLA2 recombinante se expresa en un sistema de expresión de baculovirus o un sistema de expresión de mamífero. En otro aspecto de la presente invención, el aglutinante inmovilizado se une a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética, o una perla de látex.

La invención también se refiere a un kit para medir la Lp-PLA2 enzimáticamente activa en una muestra que comprende un anticuerpo que une específicamente Lp-PLA2 y un sustrato seleccionado del grupo formado por



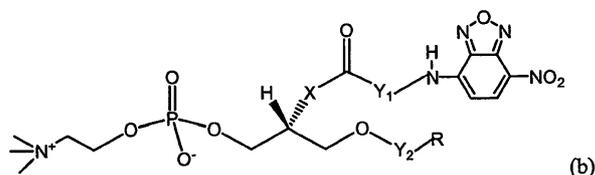
Donde;

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



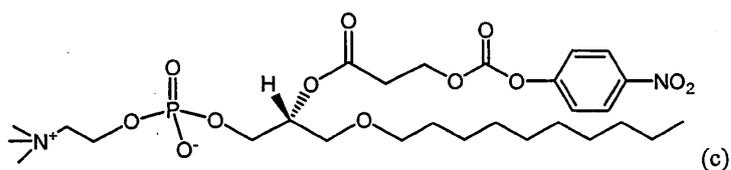
En donde;

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

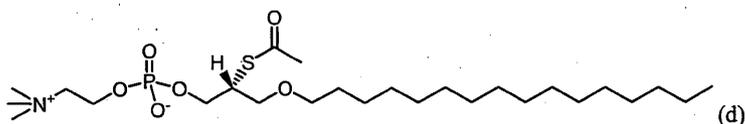
R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

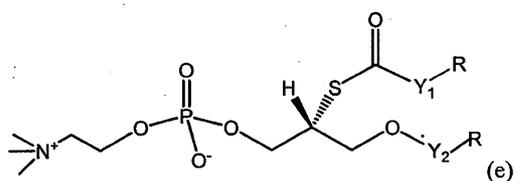
Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine (MNP);



2-thio PAF y



5

En donde;

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

10 Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;

En un aspecto adicional de la invención, el sustrato es un derivado oxidado de (a), (b), (c), (d) o (e) anterior.

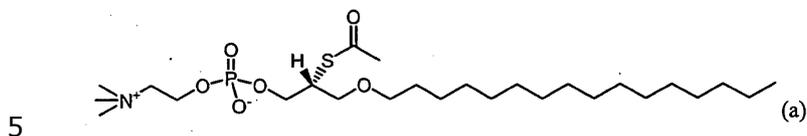
15 Otro aspecto de la invención es un kit que comprende un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa. En un aspecto adicional de la invención, el estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa es una proteína Lp-PLA2 recombinante o una proteína Lp-PLA2 nativa. En otro aspecto adicional de la invención, la proteína Lp-PLA2 recombinante se expresa en un sistema de expresión de baculovirus o un sistema de expresión de mamífero.

20 La invención también está dirigida a un método para medir Lp-PLA2 enzimáticamente activa en una muestra que comprende: la incubación de la muestra con un compuesto que reduce tioles activos en la muestra; poner en contacto la muestra incubada con un sustrato convertido a un producto de tiol libre en presencia de una Lp-PLA2 enzimáticamente activa, y medir el producto de tiol libre indicativo de la Lp-PLA2 enzimáticamente activo en la muestra.

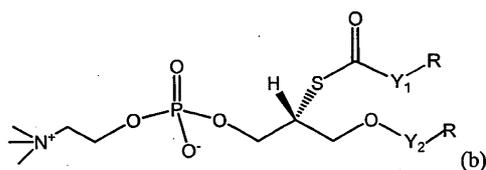
25 En otro aspecto de la invención, la muestra es una muestra de suero, o una muestra de plasma o una muestra de plasma tratada con EDTA. En otro aspecto de la invención, el compuesto que reduce los tioles activos en la muestra es DTNB.

En un aspecto más de la invención, la muestra se incuba a temperatura ambiente. En otro aspecto más de la invención la muestra se incuba a 37°C. En otro aspecto, la muestra se incuba aproximadamente de 2 a unos 120 minutos. En otro aspecto, la muestra se incuba aproximadamente de 5 a unos 30 minutos.

En otro aspecto más, el sustrato se selecciona del grupo formado por:



2-tio-PAF; y



Donde;

10 R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

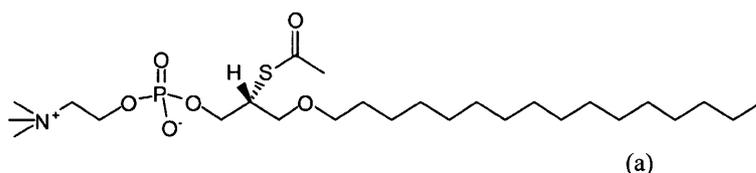
Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;

En otro aspecto de la invención, el sustrato es un derivado oxidado de (a) o (b).

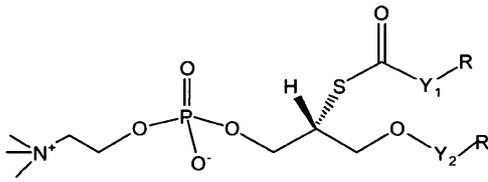
15 La invención comprende, además, comparar el producto medido de tiol libre de la etapa (c) con el producto de tiol libre en un control que comprende un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa. En un aspecto adicional de la invención, el estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa es una proteína Lp-PLA2 recombinante o una proteína Lp-PLA2 nativa. En otro aspecto más de la invención, la proteína Lp-PLA2 recombinante se expresa en un sistema de expresión de baculovirus o un sistema de expresión de mamífero. En

20 un aspecto preferido de la invención, el método anterior se lleva a cabo en una placa de múltiples pocillos.

También se describe un kit para medir la Lp-PLA2 enzimáticamente activa en una muestra que comprende un compuesto que reduce los tioles activos y un sustrato convertido a un producto detectable en presencia de Lp-PLA2. El sustrato puede seleccionarse del grupo formado por



25 2-tio-PAF; y



(b)

Donde

R se selecciona del grupo formado por $(CH_2)_4CH_3$, $(CH_2)_6CH_3$, $(CH_2)_8CH_3$, $(CH_2)_{10}CH_3$, $(CH_2)_{12}CH_3$, $(CH_2)_{14}CH_3$ y $(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_2CH_3$;

5 Y_1 se selecciona del grupo formado por $(CO)_{1-2}$ y $(CH_2)_{2-7}$; y

Y_2 se selecciona del grupo formado por CO y CH_2 ;

10 El sustrato puede ser un derivado oxidado (a) o (b). El kit puede contener un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa. El estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa puede ser una proteína Lp-PLA2 recombinante o una proteína Lp-PLA2 nativa. La proteína Lp-PLA2 recombinante se puede expresar en un sistema de expresión de baculovirus o un sistema de expresión de mamífero.

La diferencia en el producto detectable en una muestra en comparación con el estándar puede deberse a una diferencia en la actividad de Lp-PLA2 en la muestra en comparación con el estándar.

15 Un aspecto adicional de la invención incluye un método para detectar la enfermedad vascular en un individuo que comprende la utilización de los métodos descritos anteriormente para determinar la actividad de Lp-PLA2 del individuo en una muestra donde la actividad incrementada de Lp-PLA2 en la muestra es indicativa de enfermedad vascular. En una realización preferida, la enfermedad vascular se selecciona del grupo que consiste en enfermedad coronaria vascular (ECV), enfermedad cardíaca coronaria (CHD), enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, presión arterial alta, accidente cerebrovascular, defectos cardiovasculares congénitos y la insuficiencia cardíaca congestiva.

20 Otro aspecto de la invención comprende un método para seleccionar a un individuo para terapia a fin de tratar la enfermedad vascular que comprende la utilización de los métodos descritos anteriormente para determinar la actividad de Lp-PLA2 del individuo en una muestra en donde la actividad incrementada de Lp-PLA2 en la muestra es indicativa de un individuo que se beneficiará de la terapia para tratar la enfermedad vascular. En una realización preferida, la enfermedad vascular se selecciona del grupo que consiste en enfermedad coronaria vascular (ECV), enfermedad cardíaca coronaria (CHD), enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, presión arterial alta, accidente cerebrovascular, defectos cardiovasculares congénitos y la insuficiencia cardíaca congestiva. La terapia puede seleccionarse del grupo formado por las estatinas y los inhibidores de Lp-PLA2.

30 Un aspecto adicional de la invención comprende un método para hacer un seguimiento de la respuesta de un individuo a la terapia para tratar la enfermedad vascular incluyendo la utilización de los métodos descritos anteriormente para determinar la actividad de Lp-PLA2 del individuo en una muestra donde la actividad disminuida de Lp-PLA2 en la muestra indica que un individuo está respondiendo favorablemente a la terapia para tratar la enfermedad vascular. En una realización preferida, la enfermedad vascular se selecciona del grupo formado por la enfermedad coronaria vascular (ECV), enfermedad cardíaca coronaria (CHD), enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, presión arterial alta, accidente cerebrovascular, defectos cardiovasculares congénitos y la insuficiencia cardíaca congestiva.

cardiovasculares congénitos y la insuficiencia cardíaca congestiva. La terapia puede seleccionarse del grupo formado por las estatinas y los inhibidores de Lp-PLA2.

Un experto en la técnica reconocerá fácilmente fuentes adicionales de anticuerpos existentes para la práctica de la presente invención. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo monoclonal producido por la línea celular de hibridoma 90G11D (ATCC HB 11724), 90F2D (ATCC HB 11725), o 143A (ATCC HB 11900), ver la patente de EE.UU. 5.847.088. También están disponibles comercialmente de fuentes tales como el Abcam, Inc. (Cambridge, MA) y AXXORA, LLC (San Diego, CA) los anticuerpos que unen Lp-PLA2 (o PAF-AH).

A menos que se defina lo contrario en la presente memoria, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tendrán los significados que son comúnmente entendidos por los expertos habituales en la técnica. Además, a menos que el contexto exija otra cosa, los términos en singular incluirán los plurales y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con, y técnicas de, cultivo de células y tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos de hibridación descritos en este documento son aquellos bien conocidos y utilizados comúnmente en la técnica. Los métodos y técnicas de la presente invención generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria a menos que se indique lo contrario. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2^a ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) y Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3^a ed, Cold Spring Harbor Press (2001); Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates (1992 y suplementos hasta 2000); Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology – 4^a Ed., Wiley & Sons (1999), Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990), y Harlow y Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999).

Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan según las especificaciones del fabricante, tal y como se consigue comúnmente en la técnica o como se describe en la presente memoria. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética, química médica y farmacéutica descritos en este documento son aquellos bien conocidos y utilizados comúnmente en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro y tratamiento de pacientes.

Un "anticuerpo" tal y como aquí se emplea, se refiere a una inmunoglobulina intacta, o a una porción del mismo de unión al antígeno que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica a una especie molecular, por ejemplo, un polipéptido de la presente invención. Las porciones de unión a antígeno se pueden producir por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos. Las porciones de unión a antígeno incluyen, entre otros, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, dAb y fragmentos de la región determinante de complementariedad (CDR), anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos quiméricos, dímeros y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión a antígeno específico al polipéptido. Un fragmento Fab es un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y dominios CH1; un F(ab')₂ es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo y un fragmento dAb consta de un dominio VH. Véase, por ejemplo, Ward et al, *Nature* 341: 544-546 (1989).

Por "se une específicamente" y "unión específica", tal y como se usa en la presente memoria, se entiende la capacidad del anticuerpo de unirse a una especie molecular en preferencia a la unión a otras especies moleculares que se mezclan con el anticuerpo y la primera especie molecular. Se dice que "reconoce" específicamente una primera especie molecular cuando puede unirse específicamente a esas primeras especies moleculares.

5

Un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) es un anticuerpo en el que las regiones VL y VH se emparejan para formar una molécula monovalente mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una cadena sencilla proteica. Véase, por ejemplo, Bird et al, *Science* 242: 423-426 (1988); Huston et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988). Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, anticuerpos biespecíficos donde los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, pero usando un enlazador demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando así a los dominios a emparejarse con dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, Holliger et al, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 90: 6.444-6.448 (1993); Poljak et al, *Structure* 2: 1121-1123 (1994). Uno o más CDR se pueden incorporar a una molécula de forma covalente o no covalentemente para hacerla una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar CDR como parte de una cadena polipeptídica más grande, puede enlazar covalentemente CDR a otra cadena polipeptídica, o puede incorporar CDR de forma no covalente. Las CDR permiten a la inmunoadhesina unirse específicamente a un antígeno concreto de interés. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o más otros anticuerpos.

10

15

20

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si hay más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina de origen natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo de cadena sencilla o un fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes.

25

Un "anticuerpo aislado" es un anticuerpo que (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados, incluyendo otros anticuerpos asociados naturalmente, que lo acompañan en su estado nativo, (2) está libre de otras proteínas de la misma especie, (3) se expresa por una célula de una especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza. Se sabe que las proteínas purificadas, incluyendo los anticuerpos purificados, se pueden estabilizar con componentes asociados de forma no natural. El componente no natural asociado puede ser una proteína, tal como albúmina (por ejemplo, BSA) o un producto químico tal como polietilenglicol (PEG).

30

Un "anticuerpo neutralizante" o "un anticuerpo inhibidor" es un anticuerpo que inhibe la actividad de un polipéptido o bloquea la unión de un polipéptido a un ligando que normalmente se une a ella. Un "anticuerpo activador" es un anticuerpo que aumenta la actividad de un polipéptido.

35

El término "epítipo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características específicas características estructurales, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une específicamente a un antígeno cuando la constante de disociación es inferior a $1\mu\text{M}$, preferentemente menos de 100 nM y más preferentemente menos de 10 nM.

40

Como es bien conocido en la técnica, el grado en el que un anticuerpo puede discriminarse entre las especies moleculares en la mezcla dependerá, en parte, de la relación conformacional de las especies en la mezcla. Normalmente, los anticuerpos discriminarán sobre la unión accidental a polipéptidos Lp-PLA2 por lo

menos dos veces, más habitualmente por lo menos 5 veces, típicamente más de 10 veces, 25 veces, 50 veces, 75 veces y, con frecuencia, más de 100 veces y, en ocasiones, más de 500-veces o 1000 veces.

Normalmente, la afinidad o aidez de un anticuerpo (o multímero de anticuerpos, como en el caso de un pentámero de IgM) utilizado en la presente invención para una proteína o fragmento de proteína será al menos aproximadamente 1×10^{-6} molar (M), normalmente al menos aproximadamente 5×10^{-7} M, 1×10^{-7} M, 25 con afinidades y aideces de al menos 1×10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 1×10^{-10} M y hasta 1×10^{-13} M resultando especialmente útiles.

Los anticuerpos pueden ser formas naturales, tales como IgG, IgM, IgD, IgE, IgY, e IgA, desde cualquier especie de ave, reptil o mamífera.

Los anticuerpos IgG, IgM, IgD, IgE, IgY e IgA también se obtienen de forma útil a partir de otras especies, incluyendo mamíferos tales como roedores (normalmente ratón, pero también rata, cobaya y hámster) lagomorfos (típicamente conejos) y también mamíferos más grandes, como ovejas, cabras, vacas y caballos, o aves ponedoras o reptiles como pollos o caimanes. En tales casos, como no es necesaria la inmunización fortuita con mamíferos no humanos productores de anticuerpos humanos transgénicos y el mamífero no humano normalmente se inmuniza afirmativamente con el polipéptido, según protocolos de inmunización estándar. Una forma de anticuerpo aviar puede generarse utilizando las técnicas descritas en el documento WO 00/29444, publicado el 25 de mayo de 2000.

Como se discutió anteriormente, prácticamente todos los fragmentos de 8 o más aminoácidos contiguos de un polipéptido pueden utilizarse efectivamente como inmunógeno cuando se conjuga con un portador, normalmente una proteína tal como tiroglobulina bovina, hemocianina de lapa californiana, o albúmina de suero bovino, usando convenientemente un enlazador bifuncional como los descritos en otra parte anteriormente, cuya discusión se incorpora aquí por referencia.

La inmunogenicidad también puede conferirse por fusión de un polipéptido aquí descrito a otras fracciones. Por ejemplo, los polipéptidos pueden ser producidos por síntesis en fase sólida en una matriz de núcleo de polilisina ramificado; estos péptidos antigénicos múltiples (MAP) proporcionan alta pureza, mayor aidez, definición química precisa y una mayor seguridad en el desarrollo de vacunas. Tam et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 5409-5413 (1988); Posnett et al, *J. Biol. Chem.* 263: 1719-1725 (1988).

Los protocolos para inmunizar mamíferos no humanos o de especies aviares están bien establecidos en la técnica. Ver Harlow et al (eds.), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); Coligan et al (eds.), Current Protocols in Immunology. John Wiley & Sons, Inc. (2001); Zola, Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives (Basics: From Background a Bench) Springer Verlag (2000); Gross M, Speck *J.Dtsck Tierarzth Wochenschr.* 103:417-422 (1996). Los Protocolos de inmunización a menudo incluyen múltiples inmunizaciones, ya sea con o sin adyuvantes tales como el adyuvante completo de Freund y adyuvante incompleto de Freund, y puede incluir la inmunización con ADN desnudo (Moss, *Semin Immunol* 2: 317-327 (1990).

Los anticuerpos de los mamíferos no humanos y especies aviares pueden ser policlonales o monoclonales, con anticuerpos policlonales que tienen ciertas ventajas en la detección inmunohistoquímica de los polipéptidos y anticuerpos monoclonales con ventajas a la hora de identificar y distinguir los epítomos particulares de los polipéptidos de la presente invención. Los anticuerpos de especies de aves pueden tener una ventaja concreta en la detección de los polipéptidos en suero o tejidos humanos (Vikinget al, *Biosens Bioelectron* 13:1257-1262 (1998). Después de la inmunización, los anticuerpos se pueden obtener usando

cualquier técnica aceptada en la técnica. Tales técnicas son bien conocidas en la técnica y se describen en detalle en referencias tales como Coligan, *supra*; Zola, *supra*; Howard *et al* (eds.), Basic Methods in Antibody Production and Characterization CRC Press (2000); Harlow, *supra*; Davis (ed.), Monoclonal Antibody Protocols Vol. 45, Humana Press (1995); Delves (ed.), Antibody Production: Essential Techniques, John Wiley & Son Ltd (1997), y Kenney, Antibody Solution: An Antibody Methods Manual Chapman & Hall (1997).

Brevemente, estas técnicas incluyen, entre otras cosas, la producción de anticuerpos monoclonales por hibridomas y la expresión de anticuerpos o fragmentos o derivados de los mismos a partir de células huésped modificadas genéticamente para expresar genes de inmunoglobulina o fragmentos de los mismos. Estos dos métodos de producción no son mutuamente excluyentes: los genes que codifican los anticuerpos específicos para los polipéptidos de la presente invención pueden clonarse a partir de hibridomas y posteriormente se expresan en otras células huésped. Tampoco es necesario que los dos se realicen juntos: por ejemplo, los genes que codifican los anticuerpos específicos para los polipéptidos pueden ser clonados directamente a partir de células B, las cuales se sabe que son específicas para la proteína deseada, como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5,627.052 o de expresión en fago de anticuerpo.

La expresión recombinante en células huésped es particularmente útil cuando se desean los fragmentos o derivados de los anticuerpos de la presente invención.

Las células huésped para la producción de anticuerpo recombinante de anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpos o derivados de anticuerpos pueden ser procariontes o eucariotas.

Los huéspedes procariontes son particularmente útiles para la producción de anticuerpos de expresión en fago de la presente invención.

Ahora está bien establecida la tecnología de anticuerpos de expresión en fago, en el que los fragmentos de anticuerpo de región variable están condensados, por ejemplo, a gen III proteína (pIII) o el gen VIII proteína (pVIII) para su visualización en la superficie de fagos filamentosos, tales como M13,. Véase, por ejemplo, Sidhu, *Curr. Opin. Biotechnol* 11(6):610-6 (2000); Griffiths *et al*, *Curr. Opin. Biotechnol* 9(1):102-8 (1998); Hoogenboom *et al*, *Immunotechnology*, 4(1):1-20(1998); Rader *et al*, *Current Opinion in Biotechnology* 8: 503-508 (1997); Aujame *et al.*, *Human Antibodies* 8: 155-168 (1997); Hoogenboom, *Trends in Biotechnol* 15: 62-70 (1997), de Kruif *et al*, 17: 453-455 (1996); Barbas *et al*, *Trends in Biotechnol* 14: 230 -234 (1996); Winter *et al*, *Ann. Rev. Immuno.l* 433-455 (1994). Recientemente se han compilado las técnicas y los protocolos necesarios para generar, propagar, transmitir (panear) y utilizar los fragmentos de anticuerpos de esas bibliotecas. Véase, por ejemplo, Barbas (2001), *supra*; Kay, *supra*, y Abelson, *supra*.

Normalmente, los fragmentos de anticuerpos de expresión en fago son fragmentos scFv o fragmentos Fab; cuando se desee, los anticuerpos de longitud completa se pueden producir clonando las regiones variables de la expresión en fago en un anticuerpo completo y que expresa el anticuerpo de longitud completa en otra célula huésped procarionte o eucariótica.

Las células eucarióticas son también útiles para la expresión de los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos para su utilización en la presente invención. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpos pueden ser producidos en *Pichia pastoris* y en *Saccharomyces cerevisiae*. Véase, por ejemplo, Takahashi *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(10):2138-44 (2000); Freyre *et al*, *J. Biotechnol.* 76(2-3):1 57-63 (2000); Fischer *et al*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 (Pt 2): 117-20 (1999); Pennell *et al*, *Res. Immunol.* 149(6): 599-603 (1998); Eldin *et al*, *J. Immunol. Methods.* 201(1): 67-75 (1997); Frenken *et al*, *Res. Immunol.* 149 (6): 589-99 (1998), y Shusta *et al*, *Nature Biotechnol* 16 (8): 773-7 (1998).

Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos y derivados, también se pueden producir en células de insecto. Véase, por ejemplo, Li et al, *Protein Expr. Purif.* 21 (1): 121-8 (2001); Ailor et al, *Biotechnol Bioeng* 58(2-3): 196-203 (1998); Hsu et al, *Biotechnol Prog.* 13(1):96-104 (1997); Edelman y otros, *Immunology* 91(1):13-9 (1997), y Nesbit et al, *J. Immunol. Methods* 151 (1-2): 201-8 (1992).

5 Los anticuerpos y fragmentos y derivados de los mismos también pueden ser producidos en células de plantas, particularmente el maíz o el tabaco, Giddings et al, *Nature Biotechnol.* 18 (11): 1151-5 (2000); Gavilondo et al, *Biotechniques* 29(1): 128-38 (2000); Fischer et al, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 14(2):83-92 (2000); Fischer et al, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30 (Pt 2):113-6 (1999); Fischer et al, *Biol. Chem.* 380 (7-8): 825-39 (1999); Russell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240: 119-38 (1999) y Ma et al, *Plant Physiol* 109 (2): 341-6 (1995).

10 Los anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpos y derivados, también se pueden producir en leche de mamífero transgénica, no humana. Véase, por ejemplo Pollock et al., *J. Immunol Methods.* 231: 147-57 (1999); Young et al, *Res. Immunol.* 149: 609-10 (1998), y al Limonta et, *Immunotechnology* 1: 107-13 (1995).

15 Las células de mamífero útiles para la expresión recombinante de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y derivados de anticuerpos de la presente invención incluyen células CHO, células COS, células 293, y células de mieloma. Verma et al, *J. Immunol. Methods* 216(1-2):165-81 (1998) examinar y comparar sistemas de expresión en bacterias, levaduras, insectos y mamíferos para la expresión de anticuerpos. Los anticuerpos también se pueden preparar por traducción libre de células, como se describe adicionalmente en Merk et al, *J. Biochem. (Tokyo)* 125(2): 328-33 (1999) y Ryabova et al, *Nature Biotechnol* 15(1): 79-84 (1997), y en la leche de animales transgénicos, como se describe adicionalmente en Pollock et al, *J Immunol. Methods* 231 (1-2): 147-57
20 (1999).

Además se describen fragmentos de anticuerpos que se unen específicamente a uno o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria, a uno o más de los polipéptidos codificados por moléculas aisladas de ácido nucleico descritos en la presente memoria, o la unión que puede inhibirse competitivamente por uno o más de los polipéptidos aquí descritos o uno o más de los polipéptidos codificados por las moléculas
25 de ácidos nucleicos aisladas descritos en este documento. Entre tales fragmentos útiles se encuentran Fab, Fab', Fv, F (ab)₂, y los fragmentos de una cadena sencilla Fv (scFv). Otros fragmentos útiles se describen en Hudson, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):395-402 (1998).

También se describen derivados de anticuerpos que se unen específicamente a uno o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria, a uno o más de los polipéptidos codificados por moléculas
30 aisladas de ácido nucleico descritos en la presente memoria, o la unión que pueda inhibirse competitivamente por uno o más de los polipéptidos aquí descritos o uno o más de los polipéptidos codificados por las moléculas de ácidos nucleicos aisladas descritas en este documento.

Entre tales derivados útiles están los anticuerpos quiméricos, primatizados y humanizados; tales derivados son menos inmunogénicos en seres humanos, y por lo tanto son más adecuados para la
35 administración *in vivo*, que son anticuerpos no modificados de especies mamíferas no humanas. Otro método útil es la PEGylación para la aumentar media vida del suero de los anticuerpos.

Los anticuerpos quiméricos incluyen normalmente regiones variables con cadena ligera y/o pesada (incluyendo residuos de CDR y de estructura) de inmunoglobulinas de una especie, normalmente el ratón, fusionadas a regiones constantes de otras especies, normalmente humanas. Ver, por ejemplo, Morrison et al,
40 *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 81(21): 6851-5 (1984); Sharon et al, *Nature* 309(5966):364-7 (1984); Takeda et al, *Nature* 314(6010):452-4 (1985); y la Patente de EE.UU. Número 5.807.715. Los anticuerpos primatizados y

humanizados normalmente incluyen CDR de cadena ligera y/o pesada de un anticuerpo murino injertado en una estructura de la región V de un anticuerpo humano o primate no humano, que habitualmente incluye además una región constante humana, Riechmann *et al. Nature* 332(6162):323-7(1988); Co et al, *Nature* 351(6326): 501-2 (1991); y las Patentes de Estados Unidos 6.054.297; 5.821.337; 5.770.196; 5.766.886; 5.821.123; 5.869.619; 5 6.180.377; 6.013.256; 5.693.761; y 6.180.370. Otros derivados de anticuerpos útiles incluyen complejos heteroméricos de anticuerpos y fusiones de anticuerpos, tales como diacuerpos (anticuerpos biespecíficos), diacuerpos de cadena sencilla e intracuerpos.

Los sustratos típicos para la producción y deposición de productos visualmente detectables incluyen o-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (ONPG); o-phenylenediamine dihydrochloride (OPD); p-nitrophenyl phosphate (PNPP); p-nitrophenyl-beta-D-galactopyranoside (PNPG); 3',3' -diaminobenzidine (DAB); 3 -amino-9-ethylcarbazole (AEC); 4-chloro-1-naphthol (CN); 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP); ABTS®; BluoGal; iodonitrotetrazolium (INT); nitroblue tetrazolium chloride (NBT); phenazine methosulfate (PMS); phenolphthalein monophosphate (PMP); tetramethyl benzidine (TMB); tetranitroblue tetrazolium (TNBT); X-Gal; X-Gluc; y X-Glucoside.

Se pueden usar otros sustratos para producir productos para la deposición local que sean luminiscentes. Por ejemplo, en presencia de peróxido de hidrógeno (H₂O₂), la peroxidasa de rábano picante (HRP) puede catalizar la oxidación de diacylhydrazides cíclicos, como el luminol. Inmediatamente después de la oxidación, el luminol está en un estado excitado (producto de reacción intermedia), el cual decae al estado fundamental emitiendo luz. Se produce un fuerte aumento de la emisión de luz por medio de los potenciadores, 20 tales como compuestos fenólicos. Las ventajas incluyen la alta sensibilidad, alta resolución y detección rápida sin radiactividad y que requieren sólo pequeñas cantidades de anticuerpo. Véase, *por ejemplo*, Thorpe *et al, Methods Enzymol.* 133:331-53 (1986); Kricka *et al, J. Immunoassay* 17(1):67-83 (1996), y Lundqvist *et al, J. Biolumin. Chemilumin.* 10(6):353-9(1995). Los kits para tal detección de quimioluminiscente intensificado (ECL) están disponibles comercialmente. Los anticuerpos también pueden etiquetarse usando oro coloidal.

Como otro ejemplo, cuando se utilizan los anticuerpos descritos aquí, por ejemplo, para la detección de citometría de flujo, para la detección citométrica con escáner laser, o para el inmunoensayo fluorescente, éstas puedan ser etiquetadas con fluoróforos. Hay una amplia variedad de etiquetas de fluoróforo que pueden unirse a los anticuerpos. Para aplicaciones de citometría de flujo, tanto para la detección extracelular y para la detección intracelular, los fluoróforos comunes útiles pueden ser isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofocianina (APC), 30 R-ficoeritrina (PE), proteína clorofila peridina (PerCP), Texas Red, Cy3, Cy5, fluoróforos del tándem de energía de resonancia de fluorescencia como PerCP-Cy5.5, PE-Cy5, Cy5.5-PE, PE-Cy7, PE-Texas Red, y APC Cy7.

Otros fluoróforos incluyen, entre otras cosas, Alexa Fluor® 350, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Alexa Fluor® 546, Alexa Fluor® 568, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 647 (kits de etiquetado de anticuerpos monoclonales disponibles en Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EE.UU.), colorantes BODIPY, como BODIPY 493/503, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY 530/550, BODIPY TMR, BODIPY 558/568, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY TR, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, Cascade Blue, Cascade Yellow, Dansyl, lissamine rhodamine B, Marine Blue, Oregon Green 488, Oregon Green 514, Pacific Blue, rhodamine 6G, rhodamine green, rhodamine red, tetrametilrodamina, Texas Red (disponible en Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, EE.UU.) y Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, todos ellos también son útiles para el etiquetado fluorescente de los anticuerpos de la presente invención. Para la

detección secundaria usando avidina, estreptavidina, captavidina o neutravidina etiquetada, los anticuerpos pueden marcarse útilmente con biotina.

5 Cuando se utilizan los anticuerpos, por ejemplo, para aplicaciones con la técnica de *Western-blotting*, éstas puedan ser etiquetarse con radioisótopos, tales como ^{33}P , ^{32}P , ^{35}S , ^3H y ^{125}I . Cuando los anticuerpos se utilizan para la radioinmunoterapia, la etiqueta puede ser útilmente ^3H , ^{228}Th , ^{227}Ac , ^{225}Ac , ^{223}Ra , ^{213}Bi , ^{212}Pb , ^{212}Bi , ^{211}At , ^{203}Pb , ^{194}Os , ^{188}Re , ^{186}Re , ^{153}Sm , ^{149}Tb , ^{131}I , ^{125}I , ^{111}In , ^{105}Rh , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{97}Ru , ^{90}Y , ^{90}Sr , ^{88}Y , ^{72}Se , ^{67}Cu , o ^{47}Sc .

Los anticuerpos y los compuestos descritos anteriormente son útiles en ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de Lp-PLA2 en una muestra.

10 Como ejemplo, se utiliza un radioinmunoensayo (RIA) o un ELISA. Se prepara un anticuerpo específico para Lp-PLA2 en caso de que no haya uno ya disponible. En un ejemplo preferido, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo anti-Lp-PLA2 está unido a un soporte sólido y cualquier sitio libre de unión de proteínas sobre el soporte sólido se bloquea con una proteína tal como albúmina de suero bovino. Una muestra de interés se incubaba con el anticuerpo sobre el soporte sólido en condiciones en que Lp-PLA2 se unirá al anticuerpo anti-Lp-PLA2. La muestra se retira, el soporte sólido se lava para eliminar el material no unido y un anticuerpo anti-Lp-PLA2 unido a un reactivo detectable (una sustancia radiactiva para RIA y una enzima para ELISA) se añade al soporte sólido y se incubaba bajo condiciones en las que se producirá la unión de la Lp-PLA2 al anticuerpo etiquetado. Después de la unión, el anticuerpo marcado no unido se elimina mediante lavado. Para un ELISA, uno o más sustratos se añaden para producir un producto coloreado por coloreado que se basa en la cantidad de una Lp-PLA2 en la muestra. Para un RIA, el soporte sólido se cuenta para señales de desintegración radiactivas mediante cualquier método conocido en la técnica. Los resultados cuantitativos para RIA y ELISA normalmente se obtienen por referencia a una curva estándar.

25 Otros métodos para medir los niveles de Lp-PLA2 son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede emplear un ensayo de competencia en el que un anticuerpo anti-Lp-PLA2 está unido a un soporte sólido y una cantidad asignada de una Lp-PLA2 etiquetada y una muestra de interés se incuban con el soporte sólido. La cantidad de Lp-PLA2 etiquetada unida al soporte sólido puede correlacionarse con la cantidad de Lp-PLA2 en la muestra. Por tanto, estos ensayos y variaciones comprenden una realización adicional de la presente invención.

30 Los métodos aquí descritos pueden utilizarse además como ensayos de pronóstico para identificar sujetos que tienen o están en riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con niveles de expresión aumentados o disminuidos de Lp-PLA2. La presencia de niveles más altos (o más bajos) de Lp-PLA2 en comparación con los controles normales humanos es diagnóstico para el paciente humano con riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares. La eficacia de los agentes terapéuticos para disminuir (o aumentar) la expresión o actividad de Lp-PLA2 de la invención también se puede controlar mediante el análisis de los niveles de expresión de Lp-PLA2 en un paciente humano en ensayos clínicos o en ensayos de cribado in vitro como en células humanas. De esta manera, el patrón de expresión génica puede servir como marcador indicativo de la respuesta fisiológica del paciente humano o células, según sea el caso, para el agente sometido a ensayo.

40 Las pruebas anteriores se pueden realizar sobre muestras derivadas de una variedad de células, fluidos corporales y/o extractos de tejidos, tales como los tejidos solubilizados u homogeneizados obtenidos de un paciente. Los extractos de tejidos se obtienen de forma rutinaria a partir de biopsia de tejido y material de autopsia. Los fluidos corporales útiles en la presente invención incluyen sangre, orina, saliva o cualquier otra

secreción corporal o derivada de ellas. Tal y como aquí se emplea, "sangre" incluye sangre completa, plasma, suero, células epiteliales circulantes, constituyentes, o cualquier derivado de la sangre.

Además de la detección en los fluidos corporales, las proteínas y los ácidos nucleicos de la invención son adecuados para la detección mediante la tecnología de captura celular. Las células enteras pueden ser capturadas por una variedad de métodos, por ejemplo, separación magnética, ver las patentes de EE.UU. 5.200.084; 5.186.827; 5.108.933; 4.925.788. Las células epiteliales pueden ser capturadas usando productos tales como Dynabeads® o CELLlection™ (DynaL Biotech, Oslo, Noruega). Alternativamente, pueden capturarse fracciones de sangre, por ejemplo, la fracción de capa leucocitaria (50mm células aisladas a partir de 5 ml de sangre) que contengan células epiteliales. Las células también pueden ser capturadas usando las técnicas descritas in WO 00/47998. Una vez que las células se capturan o se concentran, las proteínas o los ácidos nucleicos se detectan por los medios descritos en la presente solicitud. Alternativamente, los ácidos nucleicos pueden ser capturados directamente de muestras de sangre, ver las patentes de EE.UU. 6.156.504, 5.501.963, o WO 01/42504

15 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Ensayos de inmunocaptura híbrida (HIC) de Lp-PLA2

EGTA, NaCl, HEPES, el reactivo de Ellman, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), Tris-HCL se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). La albúmina de suero bovino se obtuvo de Gibco-Invitrogen (Carlsbad, CA). Las placas de microtitulación se obtuvieron de VWR (West Chester, PA). TBS y la solución de Bloqueo Superblock/TBS se obtuvieron en Pierce (Rockford, IL). El tampón monohidrato de ácido cítrico se obtuvo en Teknova (Half Moon Bay, CA). 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine (MNP) se obtuvo en KARLAN (Santa Rosa, CA) y 2-tio-PAF se obtuvo en Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). La Lp-PLA2 de mamíferos recombinante enzimáticamente activa (rmLp-PLA2) se generó en diaDexus (South San Francisco, CA). Se utilizaron 200 muestras de plasma normales de sangre para el análisis.

Ensayos de Inmunocaptura Híbrida de actividad Lp-PLA2

En las FIG. 1A y FIG. 1B se muestra un esquema del Ensayo de Inmunocaptura Híbrida (HIC). La Figura 1A muestra una realización con una lectura directa del sustrato que se convierte en el producto. La Figura 1B muestra una lectura secundaria, donde el producto de la primera reacción reacciona para formar un segundo producto. El ensayo HIC-ThioPAF es un ejemplo de la realización de la FIG 1B.

Ensayo HIC de Lp-PLA2 utilizando el sustrato de 2-tio-PAF

Antes del ensayo, solución etanólica de 2-tio-PAF se evaporó a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno y se reconstituyó en 1x tampón de ensayo (0,1 M Tris-HCl, pH 7,2, 1mM EGTA) a una concentración final de 400uM. Se preparó una solución DTNB de 10 mM con 0,4 M de Tri-HCl, pH 7,2. El tampón R2 que contiene 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)phosphatidylcholine se consiguió mezclando 20 mM de tampón monohidrato de ácido cítrico, pH 4,5 y 90 mM de 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)phosphatidylcholine en la proporción de 79: 1 antes del ensayo.

En primer lugar, la placa de microtitulación se recubrió con 200 uL de anti-Lp-PLA₂ mAb 2C10 (5 µg/ml) en 1XTBS y se incubó a 4°C, durante la noche. A continuación, la placa se bloqueó con 250 µL de Solución

de Bloqueo SuperBlock TBS, incubado con agitación a 180rpm a temperatura ambiente durante 20 min. La placa se lavó antes de su uso.

En primer lugar, 170µL de tampón 1xTBSpH 7,4 se añadió a un pocillo seguido por 30µL de muestra o estándar (Lp-PLA₂ recombinante de mamífero) lotes de 0, 25, 50, 100, 200, 400 ng/ml) y se incubaron con agitación a temperatura ambiente durante 1 hr. Después de la incubación, la placa se lavó una vez con 360µL de tampón de lavado (1xTBS, 0,05% de Tween 20). Luego 160µL de 1x Tampón de Ensayo (0,1M Tris-HCl, pH 7,2, EGTA mM), 10µL de solución DTNB (10mM en 0,4 M Tris-HCl, pH 7,2) y 55µL de solución de sustrato 400 µM 2-tio-PAF se añadieron a cada pocillo, y se leyó a 414 nm en un lector de placas (Molecular Device, Sunnyvale, CA) ejecutado en modo cinético (una lectura por min), con mezcla automática a 37°C, durante 5 min. La pendiente de la curva correspondiente a AOD⁴¹⁴ / min se calculó para todos los estándares y muestras. El nivel de actividad Lp-PLA₂ en ng/mL se calculó a partir de una curva estándar de la pendiente de estándares rLP-PLA₂. Los resultados se muestran en la Figura. 2. La Figura 3 muestra los resultados del ensayo HIC-ThioPAF con el anticuerpo B200.1 como anticuerpo de captura. La Figura 4 muestra los resultados del ensayo HIC-ThioPAF con el anticuerpo B501.1 como anticuerpo de captura.

15 Ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA₂

Un segundo ensayo HIC para analizar la actividad Lp-PLA₂ fue desarrollado usando 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)phosphatidylcholine (MNP) como sustrato. Este ensayo se denomina aquí como ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA₂.

Curva estándar de p-nitrofenol

Para preparar soluciones madre de metanol de 100, 75, 50,25, 10 y 5 µL de 1 M p-nitrofenol (Sigma, cat. # 1048-25 g) se mezcló con 900, 925, 950, 975 y 990 µL de metanol para preparar soluciones de metanol de 100, 75, 50, 25, 10 y 5 nmol/, respectivamente. Las soluciones de trabajo para cada patrón se prepararon diluyendo 40 µL de solución madre en 960 µL de metanol (1:25 dilución). Las soluciones madre y la solución de trabajo se almacenaron a 4°C en oscuridad. 25µL de la solución patrón de trabajo p-nitrofenol se añadió a 8 pocillos replicados, y 25 µL de PBS se añadió a 8 pocillos de control en blanco antes de la adición de 110 µL de R2 (descrito anteriormente) a cada pocillo. La placa se mezcló y se leyó a absorbencia a 405 nm como se describió anteriormente.

Se generó una curva estándar por el trazado de los valores OD medios (8 réplicas) para los 7 patrones vs cantidad de p-nitrofenol (0, 5, 10,25, 50, 75, y nmol 100). La pendiente ($\Delta OD_{405}/nmol$) de las curvas estándar de p-nitrofenol se calculó entonces para determinar la actividad Lp-PLA₂ en nmol/min/ml, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad Lp-PLA}_2 \text{ (nmol/min/mL)} = \text{pendiente de la muestra } (\Delta OD_{405}/\text{min}) \div \text{pendiente de la curva estándar } (\Delta OD_{405}/\text{nmol}) \div 0,025\text{mL.}$$

Las curvas estándar de p-nitrofenol podían ejecutarse a intervalos regulares como la calibración QC del lector de placas

35 *Ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA₂*

Se recubrió una placa de microtitulación de media área para 96 pocillos (VWR, cat. # 3690) con el anticuerpo primario (anti-Lp-PLA₂ mAb 2C10) a 25 µL/pocillo (1 µg/25 µL) en 1xTBS (Pierce, Cat. # 28372) a 4°C, durante la noche. El tampón de recubrimiento se aspiró sin lavar antes de la adición de 150 µL/pocillo de la solución de bloqueo de SuperBlock TBS de Pierce (Rockford, IL) (Cat. # 37535). La placa se cubrió y se incubó

ES 2 416 344 T3

con una agitación a 180 rpm a temperatura ambiente dos veces durante 10 minutos. La solución de bloqueo se desechó por aspiración y la placa se utilizó en las 24 horas siguientes.

5 El tampón R2 fresco se preparó mezclando R1 (200 mM de HEPES, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM de CHAPS, 10 mM de sodium 1-nonanesulfonate, pH 7,6) y R2B (90 mM L-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine) en la proporción de 20 uL: 0,12 uL (por pocillo) antes del ensayo. Una vez que R1 y R2B se mezclaron, y la solución se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad y la mezcla R2 se utilizó dentro de las 2 horas siguientes.

10 20 µL de muestra, o patrón, o el control se añadió a cada pocillo de una placa revestida y se incubó con agitación a 180 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. (Los patrones utilizados fueron 0, 100, 250, 500, 1000 ng/mL de rLp-PLA2 diluido en gamma-globulina/lxPBS 1% a pH 7,4. Las muestras de control incluían 6 muestras de plasma normal con una adulterada con proteína rLp-PLA2). Las placas se lavaron dos veces con 75 uL 1xTBS UL con 0,05% de Tween-20. Después del lavado, 20 uL del tampón R2 de reacción (descrito anteriormente) se añadió por pocillo. Inmediatamente poner la placa en el lector de placa y comenzar la lectura. La adición de R2 a una placa entera debe terminarse dentro de 40 segundos (en nuestro ensayo se utilizaron la pipeta multicanal y el robot).

15 Después de la adición de R2, el cambio en la absorción se midió inmediatamente usando un lector de placas en modo cinético a 405 nm durante 5 minutos. El lector de placas se fijó a temperatura ambiente, con ajuste de mezcla automática para mezclar una vez antes de la lectura y los puntos de datos e obtuvieron a intervalos de 15 segundos. La pendiente de la curva, correspondiente a $\Delta\text{mOD}_{405}/\text{min}$, se calculó para todos los patrones y las muestras de 15 segundos a 60 segundos. El nivel de actividad de Lp-PLA2 en ng/mL se calculó a partir de una curva estándar de la pendiente de estándares de rLp-PLA2 y el nivel de la actividad Lp-PLA2 en nmol/min/ml se calculó a partir de la pendiente:

$$\text{nmol/min/mL} = \text{pendiente } (\Delta\text{mOD}^{405}/\text{min}) \times 1,136.$$

Resultados de los ensayos HIC-DAZ de Lp-PLA2

25 El Límite Inferior de Cuantificación (LLOQ) para el ensayo se determinó calculando la media y desviación estándar (STDEV) de las señales de fondo de 22 réplicas de blancos, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Límite Inferior de Cuantificación (LLOQ)} = \text{Fondo} + (6 \times \text{Fondo STDEV})$$

	nmol/min/mL
Intervalo de señal de fondo	0 – 0.432
Media de señal de fondo	0.151
Señal de fondo STDEV	0.107
6 x STDEV	0.642

Límite Inferior de Cuantificación: 0,793 nmol/min/mL

30 El Límite Superior de Cuantificación se estimó para la concentración más elevada del rLp-PLA2 Estándar que pueda medirse con fiabilidad. Se evaluaron las múltiples réplicas de estándares para confirmar que el estándar más elevado puede reproducirse de forma cuantificable.

rLp-PLA2 (ng/mL)	Pendiente ($\Delta\text{OD}^{405}/\text{nmol}$)	nmol/min/mL
0	0.0	0.0
0.5	0.0	0.0
1	0.0	0.0
5	0.7	0.8
10	1.3	1.6
25	2.7	3.3

ES 2 416 344 T3

50	5.3	6.5
100	10.7	13.2
250	26.0	32.0
500	41.9	51.6
1000	65.1	80.1

Los cuantiles para los niveles de actividad en las muestras comercialmente disponibles se muestran en las tablas de más abajo.

		nmol/min/mL
100.0%	Máximo	49.052
99.5%		48.966
97.5%		26.345
90.0%		18.839
75.0%	Cuartil	15.418
50.0%	Mediano	13.136
25.0%	Cuartil	10.184
10.0%		8.143
2.5%		5.616
0.5%		3.231
0.0%	Mínimo	3.223

- 5 La siguiente tabla muestra los LLOQ y ULOQ objetivos (o esperados) en comparación con los LLOQ y ULOQ actuales para el percentil y cuartil correspondiente de las muestras analizadas. Los LLOQ y ULOQ objetivos se generaron usando los métodos descritos anteriormente y los LLOQ y ULOQ reales se determinaron mediante la evaluación de las muestras.

Percentil	Cuartil (nmol/min/mL)	Objetivo (nmol/min/mL)	Real (nmol/min/mL)
0.0500	7.0	*LLOQ : 0.7	LLOQ : 0.8
0.9500	22.9	**ULOQ: 68.7	ULOQ: 80.1

- 10 *LLOQ=5º percentil ÷ 10
 ** ULOQ = 95º percentil x 3

- El LLOQ real alcanzado estaba muy cerca del LLOQ objetivo (1/10 x 5º percentil de los valores de las muestras de intervalo normal) para este ensayo HIC de Lp-PLA2. La sensibilidad objetiva se alcanzará con modificaciones menores. El ULOQ (3 x 95º percentil de los valores de las muestras de intervalo normal) se alcanzaron con éxito para el ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2. Además, se obtuvieron CVs muy ajustados para el intervalo superior del ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2 utilizando el sustrato MNP. Estos datos demuestran que el ensayo de HIC-DAZ Lp-PLA2 resulta útil para medir con precisión la actividad Lp-PLA2.

Ejemplo 2: Ensayo mejorado ThioPAF de Lp-PLA2

- 20 La Figura 6 muestra los resultados del ensayo ThioPAF disponible comercialmente en Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI) siguiendo el protocolo del fabricante. En concreto, en ese protocolo, el DTNB se añade simultáneamente con 2-tio-PAF.

- 25 Antes de realizar el ensayo mejorado, una solución etanólica de 2-tio PAF se evaporó a sequedad bajo una corriente suave de nitrógeno, y se reconstituyó en 1x tampón de ensayo (0,1 M Tris-HCl, pH 7,2, EGTA mM) a una concentración final de 400µM. La solución de DTNB se preparó con 0,4M de Tri-HCl, pH 7,2 para alcanzar una concentración final de 10mM (4 mg DTNB en 1 ml de tampón).

Ensayo de la actividad de Lp-PLA2 utilizando el sustrato 2-tio-PAF

ES 2 416 344 T3

En el ensayo, 83 μL de 1x Tampón de Ensayo se mezcló con 20 μL de muestra o estándar (Lp-PLA2 recombinante de mamífero a 800, 400, 200, 100, 50, 25 y 0 ng/mL), y 10 μL de la solución de 10mM de DTNB (en 0,4M Tris-HCl, pH 7,2), y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min. La Figura 7 muestra los resultados. Después de la preincubación con DTNB para eliminar la señal de fondo de tior libre, 112 μL de la solución de 400 μM de 2- tio-PAF se añadió y la placa se leyó a 414 nm en un lector de placas (Molecular Device, Sunnyvale, CA) funcionando en modo cinético (una lectura por minuto), con mezcla automática a temperatura ambiente, durante 5 min. La pendiente de la curva correspondiente a $\Delta\text{OD}^{414}/\text{min}$ se calculó para todos los estándares y muestras. El nivel de actividad de Lp-PLA2 en ng/ml se calculó a partir de una curva estándar de la pendiente de estándares de rLp-PLA2. Los resultados se muestran en la FIGURA 8.

La tabla de más abajo muestra el nivel de la actividad Lp-PLA2 en ng/mL para un conjunto de 24 muestras diversas de plasmas, determinadas dos veces por ensayo (Thio-PAF Comercial y 2-tio-PAF mejorado). Además de los valores de la actividad, el coeficiente de variación (CV) se indica para cada muestra por ensayo y una media global para cada ensayo. Utilizando en ensayo mejorado de 2-tio-PAF se mejoró el CV de una media del 10,7% a 4,5%.

ID de la muestra	Resultado 1 del Thio-PAF comercial	Resultado 2 del Thio-PAF comercial	CV del Ensayo de Thio-PAF comercial	Resultado 1 del Thio-PAF mejorado	Resultado 2 del Thio-PAF mejorado	CV del Thio-PAF mejorado
1	387.807	544.836	16.8%	212.993	229.352	3.7%
2	326.023	471.18	18.2%	18 0.75	192.002	3.0%
3	269.221	283 .475	2.6%	174.951	189.252	3.9%
4	251.099	250.848	0.1%	133.483	136.896	1.3%
5	341.257	236.061	18.2%	186.841	215.285	7.1%
6	374.072	346.048	3.9%	174.088	182.849	2.5%
7	468.923	429.38-	4.4%	209.196	231.258	5.0%
8	447.66	324.269	16.0%	169.298	193.695	6.7%
9	209.819	287.641	15.6%	144.495	165.483	6.8%
10	373.44	385.316	1.6%	180.249	216.328	9.1%
11	337.737	335.674	0.3%	189.426	200.751	2.9%
12	265.701	204.651	13.0%	128.509	144.265	5.8%
13	317.323	349.698	4.9%	166.692	187.637	5.9%
14	216.858	243.403	5.8%	119.438	148.434	10.8%
15	406.76	410.396	0.4%	184.451	205.195	5.3%
16	213.429	232.885	4.4%	138.28	136.004	0.8%
17	237.182	318.948	14.7%	145.778	148.521	0.9%
18	198.898	262.459	13.8%	135.28	150.828	5.4%
19	254.131	383.769	20.3%	153.296	176.586	7.1%
20	213.483	329.673	21.4%	109.556	119.442	4.3%
21	238.446	342.15	17.9%	150.295	172.425	6.9%
22	225.685	275.164	9.9%	158.967	164.756	1.8%
23	246.947	357.185	18.2%	137.172	136.212	0.4%
24	228.32	300.263	13.6%	153.578	155.559	0.6%
CV Medio			10.7%			4.5%

Ejemplo 3: Ensayo DAZ de Lp-PLA2

Se desarrolló un ensayo de actividad colorimétrica para determinar la actividad Lp-PLA2 utilizando 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine (MNP) como un sustrato, el cual se indica en la presente memoria como ensayo DAZ de Lp-PLA2. Este sustrato se ha utilizado en ensayos comercialmente disponibles, tales como el ensayo de Auto-PAF-AH de Karlan Research Products Corporation (Santa Rosa, CA). El ensayo DAZ de Lp-PLA2 descrito a continuación es útil para detectar la actividad Lp-PLA2 en la muestra, además de los cambios en la actividad Lp-PLA2 en una muestra tratada con un inhibidor de Lp-PLA2. La dilución de muestras

para realizar análisis puede aumentar la disociación del inhibidor de Lp-PLA2 de Lp-PLA2 en la muestra erróneamente resultante con altos niveles de actividad Lp-PLA2 o bajos niveles de inhibición. El ensayo DAZ de Lp-PLA2 reduce la dilución de la muestra y muestra la actividad o inhibición de Lp-PLA2 o de forma más precisa, que es útil en el control de la capacidad o eficacia de un compuesto para inhibir la actividad Lp-PLA2 en una muestra o un paciente.

Curva Estándar de p-nitrofenol

Para preparar soluciones madre de metanol 100, 75, 50, 25, 10 y 5 uL de 1 M p-nitrofenol (Sigma, cat. # 1048-25 g) se mezclaron con 900, 925, 950, 975 y 990 ul de metanol para preparar soluciones de metanol de 100, 75, 50,25, 10 y 5 nmol /uL respectivamente. Las soluciones de trabajo para cada estándar se prepararon diluyendo de 40 uL de solución madre en 960 uL de metanol (dilución 1:25). Las soluciones madre y la solución de trabajo se almacenaron a 4°C en oscuridad. 25 uL de la solución de trabajo p-nitrofenol estándar se añadió a 8 pocillos de réplicas, y 25 uL de PBS se añadieron a 8 pocillos de control en blanco antes de la adición de 110 uL de R2 (descrito anteriormente) a cada pocillo. La placa se mezcló y se leyó a absorbencia a 405 nm como se ha descrito anteriormente.

Se generó una curva estándar por el trazado de los valores medios de OD (8 réplicas) para los 7 estándares frente a la cantidad de p-nitrofenol (0, 5, 10,25, 50, 75, y 100 nmol). La pendiente ($\Delta OD^{405}/nmol$) de las curvas estándar de p-nitrofenol se calculó entonces para determinar la actividad de Lp-PLA2 en nmol/min/ml, usando la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad de Lp-PLA2 (nmol/min/mL)} = \text{pendiente de la muestra} (\Delta OD^{405}/\text{min}) \div \text{pendiente de la curva estándar} (\Delta OD^{405}/\text{nmol}) \div 0.025\text{mL}$$

Las curvas estándar de p-Nitrofenol se pueden ejecutar a intervalos regulares a la calibración QC del lector de placas.

Protocolo DAZ

Se prepara un tampón fresco R2 mezclando R1 (200 mM HEPES, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA, 10 mM CHAPS, 10 mM sodium 1-nonanesulfonate, pH 7,6) y R2B (90 mM l-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine) en la proporción de 110 uL:0,66 uL (por pocillo) antes del ensayo. Una vez mezclados R1 y R2B; la solución se almacenó a temperatura ambiente en la oscuridad y la mezcla R2 se utilizó en las 2 siguientes horas.

25ul de la muestra, o estándares y controles, se añadieron una placa NBS de 96 pocillos (Corning, cat. # 3641), seguidos por 110 uL de R2 (mezcla de R1 y R2B). La adición de R2 a una placa entera se completó dentro de los 40 segundos posteriores para un rendimiento óptimo. Las muestras estándares en el ensayo incluyeron 0, 100, 250, 500,1000, 2000 ng/ml de Lp-PLA2 recombinante de mamífero (rLp-PLA2) diluido en 1% gamma-globulin/lxPBS, pH 7,4. Las muestras de control en el ensayo incluía 6 muestras de plasma normal, una de las cuales se adulteró con Lp-PLA2 recombinante de mamífero (rmLp-PLA2).

Después de la adición de R2, el cambio en la absorción se midió inmediatamente usando un lector de placas en modo cinético a 405 nm durante 5 minutos. El lector de placas se fijó a temperatura ambiente, con mezcla automática establecida para mezclar durante 20 segundos una vez antes de leer, y los puntos de datos se obtuvieron a intervalos de 15 segundos. La pendiente de la curva, correspondiente a $\Delta mOD^{405}/\text{min}$, se calculó para todos los estándares y las muestras de 60 segundos a 180 segundos. El nivel de actividad Lp-PLA2 en ng/mL se calculó a partir de una curva estándar de la pendiente de rLp-PLA2 estándares y la actividad del nivel de Lp-PLA2 en nmol/min/mL se calculó a partir de la pendiente:

nmol/min/ml = pendiente ($\Delta\text{mOD}^{405}/\text{min}$) x 1,429.

Ejemplo 4: supervisión de la actividad Lp-PLA2 mediante ensayos HIC, ThioPAF mejorado y DAZ

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de voluntarios sanos en la línea base y puntos de tiempo programado después de la dosificación, ya sea con un inhibidor de Lp-PLA2 o un placebo. Las muestras de plasma se evaluaron para la actividad Lp-PLA2 con los ensayos anteriores.

La inhibición significativa de actividad Lp-PLA2 en voluntarios tratados con el inhibidor de Lp-PLA2 se observa poco después de la administración de un inhibidor durante varias horas después de la administración del inhibidor. En cambio, no se detecta ninguna disminución significativa en la actividad Lp-PLA2 en los voluntarios que recibieron placebo.

La inhibición relativa de la actividad de Lp-PLA2 se compara entre los formatos de ensayo descritos anteriormente y en otros lugares incluyendo el documento WO 2005/001416.

La inhibición relativa de la actividad Lp-PLA2 en muestras se comparó entre formatos de ensayo. Cada ensayo se utilizó para determinar el porcentaje de la actividad total de Lp-PLA2 en cada punto de tiempo posterior a la administración del inhibidor de Lp-PLA2 en comparación con el valor basal. La variabilidad entre ensayos se determina calculando la diferencia aritmética de los porcentajes de inhibición de una muestra dada (punto de tiempo), medido en un ensayo de referencia y un formato de ensayo alternativo. Los formatos de ensayo DAZ, HIC, HIC-DAZ y ThioPAF mejorado de Lp-PLA2 son útiles para monitorizar el cambio en la actividad Lp-PLA2 en un voluntario con paso del tiempo. Además, estos ensayos son útiles para monitorizar la respuesta de un voluntario a una terapia que altera la actividad de Lp-PLA2 como las estatinas y los inhibidores de Lp-PLA2. Haciendo un seguimiento de la respuesta a las terapias moduladoras de la actividad Lp-PLA2, estos ensayos son útiles además para la determinación del beneficio de una terapia en un voluntario.

Ejemplo 5: Correlaciones y distribuciones en muestras poblacionales

Hemos definido correlaciones entre los ensayos de masa y actividad de Lp-PLA2 y la combinación masa/ensayos de actividad incluyendo el ensayo Auto PAF-AH (APAF) comercialmente disponible en Karlan (Santa Rosa, CA), el ensayo de prueba PLAC™ disponible comercialmente para la medición de la masa de Lp-PLA2 (PLAC), el ensayo de DAZ (DAZ) descrito anteriormente y el ensayo HIC-DAZ (HIC) descrito anteriormente. Los valores R se calcularon para la muestra poblacional normal de 60 PromexDx (Norton, MA). Nota: todos los valores R > 0,75 se han resaltado en **negrita** para facilitar la comparación.

Valores R entre ensayos analizando 60 muestras de PromedDX*

	PLAC	DAZ	HIC
APAF	0.6933	0.9274	0.4679
PLAC		0.6534	0.5807
DAZ			0.4122

*Datos de 5 muestras extraídas debido a valores perdidos.

En función de la muestra poblacional del paciente (intervalo de valores de Lp-PLA2 y el tipo de muestra, las correlaciones pueden variar drásticamente entre los formatos de ensayo basados en actividad, basados en masa y los híbridos basados en actividad/masa:

Para las muestras normales de PromedDx el ensayo de prueba PLAC™ se correlacionó bien con los ensayos APAF, DAZ y HIC (R = 0,5 – 0,6). Como era de esperar, ya que el intervalo dinámico de los valores de Lp-PLA2 era limitado, los valores R se atenuaron.

La separación entre muestras clínicas y las muestras normales de PromedDx se obtuvo con la prueba PLAC™, seguida por el ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2. Los ensayos DAZ y APAF no separan la población con alto riesgo de enfermedad coronaria de los normales al igual que la prueba PLAC™ o los formatos HIC. Los formatos directos enzimáticos, DAZ y APAF, funcionaron de manera equivalente comparados entre ellos (R = 0,92).

Los ensayos que son capaces de separar a los individuos con riesgo de enfermedad de aquéllos que no están en riesgo en una población son los más adecuados para la valoración del riesgo del paciente en estudios epidemiológicos y en el diagnóstico clínico del paciente. Los ensayos descritos DAZ y HIC-DAZ (HIC) demostraron la correlación más elevada con el test PLAC™ autorizado por la FDA que valoraba el riesgo de aterosclerosis. Por tanto, los ensayos DAZ y HIC-DAZ son adecuados para la valorar el riesgo de aterosclerosis y otros tipos de enfermedad vascular coronaria.

Ejemplo 6: Ensayo de Rendimiento

Para evaluar la variabilidad intra-ensayo, inter-ensayo e inter-operador de los ensayos DAZ y HIC-DAZ de Lp-PLA2 descritos anteriormente se analizaron 8 muestras plasmáticas normales por cuadruplicado en 3 placas separadas, por 3 operadores.

Variabilidad intra-ensayo

El Coeficiente de variación (%CV) medio se calculó a partir del % CV de 8 muestras de plasma ejecutadas por cuadruplicado. Las siguientes tablas muestran %CV Medio de 3 ejecuciones, y el %CV medio intra-ensayo a partir de 3 ejecuciones para cada operador. La precisión para el ensayo HIC se calculó para valores nmol/min/ml y ng/mL calculados a partir de la curva estándar de rLp-PLA2.

Ensayo DAZ

Operador	Ejecución 1 %CV promedio	Ejecución 2 %CV promedio	Ejecución 3 %CV promedio	%CV promedio intra-ensayo
1	2.4	3.0	2.8	2.7
2	3.8	1.8	4.1	3.2
3	1.8	1.5	1.8	1.7

HIC-DAZ (nmol/mil/mL)

Operador	Ejecución 1 %CV promedio	Ejecución 2 %CV promedio	Ejecución 3 %CV promedio	%CV promedio intra-ensayo
1	4.6	5.2	5.8	5.2
2	5.6	5.2	5.7	5.5
3	8.4	6.2	5.5	6.7

HIC-DAZ (ng/mL)

Operador	Ejecución 1 %CV promedio	Ejecución 2 %CV promedio	Ejecución 3 %CV promedio	%CV promedio intra-ensayo
1	4.8	6.0	6.8	5.9
2	5.8	5.8	5.8	5.8
3	8.4	6.3	5.6	6.8

Variabilidad inter-ensayo

ES 2 416 344 T3

Las siguientes tablas muestran %CV promedio inter-ensayo a partir de los valores de 8 muestras de plasma (P1-P8) analizadas en 3 ensayos independientes. El %CV promedio inter-ensayo para cada operador se calcula a partir de los %CV inter-ensayo de las 8 muestras. La precisión para el ensayo HIC se calculó para los valores nmol /min/ mL y ng/ml calculados a partir de la curva estándar de rLp-PLA2.

5 Ensayo DAZ

Operador	PI	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	%CV promedio inter-ensayo
1	1.9%	2.1%	2.0%	0.8%	2.6%	1.3%	2.2%	0.4%	1.7
2	3.8%	2.2%	3.9%	1.0%	2.8%	1.6%	3.8%	0.3%	2.4
3	1.0%	1.3%	1.3%	2.5%	1.8%	2.8%	2.0%	2.0%	1.8

HIC-DAZ (nmol/min/mL)

Operador	PI	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	%CV promedio inter-ensayo
1	13.0%	5.8%	6.5%	6.0%	12.1%	2.8%	5.5%	3.5%	6.9
2	4.7%	8.6%	6.3%	5.4%	9.9%	9.2%	6.4%	7.6%	7.3
3	6.8%	11.8%	10.6%	9.8%	5.5%	5.0%	5.7%	7.1%	7.8

HIC-DAZ (ng/mL)

Operador	PI	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	%CV promedio inter-ensayo
1	13.8%	6.0%	6.8%	6.5%	13.9%	3.7%	5.4%	5.0%	7.6
2	4.6%	8.8%	6.6%	7.4%	10.2%	9.4%	5.7%	8.3%	7.6
3	8.6%	13.6%	12.6%	11.5%	6.1%	6.4%	7.2%	8.7%	9.3

Variabilidad inter-operador

10 El %CV inter-operador para 3 operadores se calculó para cada ensayo basado en datos obtenidos de 8 muestras de plasma normales PromedDx analizadas por cuadruplicado, en 3 placas separadas. La precisión para el ensayo HIC-DAZ se calculó para los valores nmol/min ml y ng/ml calculados a partir de la curva estándar de rLp-PLA2.

Ensayo DAZ

Muestra	Operador 1			Operador 2			Operador 3			Media	SD	%CV
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3			
P1	36.95	37.31	35.94	39.76	37.77	40.66	32.47	31.87	31.97	36.08	3.3	9%
P2	53.73	56.04	54.86	57.17	55.23	57.49	46.86	47.73	46.51	52.85	4.5	9%
P3	59.44	60.06	57.81	65.08	60.46	61.33	50.68	51.99	51.28	57.57	5.1	9%
P4	59.60	58.67	59.18	59.92	59.98	61.03	48.49	50.93	49.26	56.34	5.2	9%
P8	70.60	70.67	67.50	73.71	69.71	72.21	58.17	60.25	58.68	66.83	6.1	9%
P9	67.43	69.23	68.54	72.73	70.46	71.09	56.28	59.52	57.61	65.88	6.3	10%
P10	67.19	70.15	68.35	74.60	69.82	74.66	58.00	60.31	58.80	66.88	6.4	10%
P7	67.56	67.17	67.03	72.20	71.89	72.32	56.64	58.88	57.40	65.68	6.4	10%

15 **9%**

HIC-DAZ (nmol/min/mL)

Muestra	Operador 1			Operador 2			Operador 3			Media	SD	%CV
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3			
P1	14.10	15.58	18.20	14.85	13.75	13.67	10.10	10.92	11.56	13.64	2.5	18%
P2	14.97	15.66	16.78	16.29	14.76	13.74	9.76	11.18	12.39	13.95	2.4	17%
P3	20.91	21.46	23.62	19.86	18.40	17.53	13.39	15.04	16.58	18.53	3.5	16%

ES 2 416 344 T3

P4	23.03	25.04	25.88	23.36	23.00	21.08	16.54	16.12	19.26	21.48	3.5	16%
P8	25.61	25.94	31.56	26.73	23.95	21.94	18.91	17.33	19.21	23.46	4.6	19%
P9	27.24	28.20	28.81	28.44	25.45	23.74	17.28	18.84	18.92	24.10	4.6	19%
P10	28.11	27.58	30.53	27.48	24.72	24.58	19.37	21.01	21.68	25.01	3.7	15%
P7	26.70	28.51	28.29	28.41	26.26	24.40	17.49	18.78	20.16	24.33	4.4	18%

18%

HID-DAZ (ng/mL)

Muestra	Operador 1			Operador 2			Operador 3			Media	SD	%CV
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 1	Placa 2	Placa 3			
P1	96.246	100.15	123.51	110.24	102.83	101.16	94.544	104.16	112.43	105.0	9.0	9%
P2	102.22	100.74	112.24	121.43	111.39	101.78	91.799	106.16	120.61	107.6	9.7	9%
P3	146.66	149.68	166.25	149.27	143.19	131.09	125.76	144.15	162.19	146.4	12.9	9%
P4	162.59	180.25	184.13	176.44	183.38	158.73	156.73	154.75	188.78	171.7	13.4	8%
P8	182.03	187.92	233.08	202.65	191.65	165.43	179.96	166.65	188.29	188.6	20.4	11%
P9	194.35	207.24	207.25	215.94	204.76	179.40	163.99	181.53	185.36	193.3	16.9	9%
P10	200.83	201.89	220.85	208.48	198.42	185.90	184.55	202.82	212.80	201.8	11.7	6%
P7	190.27	209.87	203.17	215.75	211.85	184.56	166.04	180.92	197.68	195.5	16.5	8%

9%

- 5 Estos estudios de precisión demostraron la reproducibilidad aceptable para los formatos de ensayo DAZ y HIC-DAZ de Lp-PLA2 para el %CV de intra-ensayo e inter-ensayo. La precisión inter-operador para el ensayo DAZ fue aceptable. Para el formato HIC-DAZ, el CV del inter-operador fue alto (18%), pero se puede reducir mediante una competencia incrementada del operador o aplicando una curva estándar.

Linealidad de dilución

- 10 Para determinar la linealidad de dilución, 10 muestras de plasma de PromedDx se diluyeron en una concentración al 50% con 1% de gamma-globulina, luego se realizó un test de las mismas en los ensayos DAZ y HIC-DAZ de Lp-PLA2. Además, 5 pares de muestras de plasma de PromedDx se mezclaron en una proporción de 1:1, y se testaron en los ensayos DAZ y HIC.

Dilución al 50%

- 15 %recuperación de DAZ (real/esperada)

ID de muestra	muestra al 100%	muestra al 50%
1	100%	119%
2	100%	127%
3	100%	127%
4	100%	121%
5	100%	123%
6	100%	135%
7	100%	134%
8	100%	135%
9	100%	120%
10	100%	129%
Promedio		127%

Relación de mezcla 1:1

%recuperación de HIC-DAZ (real/esperada)

ID de muestra	muestra al 100%	muestra al 50%
1	100%	135%
2	100%	107%
3	100%	121%
4	100%	91%
5	100%	119%
6	100%	100%
7	100%	107%
8	100%	108%
9	100%	118%
10	100%	120%
Promedio		113%

Relación de mezcla 1:1

%recuperación DAZ (real/esperada)

Muestra	Esperada nmol /min/mL	Real nmol/min/mL	% de recuperación a esperada
2&7	72 .64	73 .73	101%
3&8	79.04	79.51	101%
4&9	74.65	76.22	102%
5&10	80.36	80.85	101%
6&11	86.01	86.28	100%
Promedio			101%

5 % de recuperación HIC-DAZ (real/esperada)

Muestra	Esperada nmol /min/mL	Real nmol/min/mL	% de recuperación a esperada
2&7	26.08	25.68	98%
3&8	26.25	25.44	97%
4&9	32.46	28.93	89%
5&10	27.21	32.50	119%
6&11	27.60	30.87	112%
Promedio			103%

10 En el ensayo de DAZ, la actividad Lp-PLA2 recuperable en muestras de plasma diluidas al 50% (en 1% de gamma-globulina) que oscilaban de 119% a 135% con una recuperación media del 127%. Cuando 5 pares de muestras de plasma se mezclaron en una relación de 1:1, la actividad Lp-PLA2 se recuperó muy cerca del valor esperado, oscilando de 100% a 102%. En el ensayo HIC-DAZ, la actividad Lp-PLA2 recuperable en muestras de plasma diluidas al 50% (en 1% de gamma-globulina) osciló de 91% a 135%, la recuperación media fue de 113%. Cuando 5 pares de muestras de plasma se mezclaron en una relación de 1:1, la actividad recuperada de Lp-PLA2 osciló entre 89% a 119%, el promedio fue de 103%. La sobre-recuperación observada de las muestras diluidas al 50% en los ensayos de HIC-DAZ y DAZ está siendo evaluadas.

15 En resumen, estos formatos de ensayo, el ensayo DAZ de Lp-PLA2 (usando el sustrato MNP), la ensayo ThioPAF mejorado de Lp-PLA2 (usando el sustrato 2-Tiol-PAF), y el ensayo de inmunocaptura híbrida (HIC) de Lp-PLA2 (utilizando los sustratos MNP o 2-TiolPAF para la detección), han sido desarrollados para detectar la actividad de Lp-PLA2 en una muestra. Todos estos ensayos se han optimizado para asegurar disociación mínima de un inhibidor a partir de la enzima Lp-PLA2 durante el curso del ensayo. Esto se logra en
20 parte mediante la maximización de volúmenes de muestra, minimizando diluciones y minimizando los tiempos de

incubación. Por lo tanto, los ensayos son útiles para estudios epidemiológicos, evaluación del riesgo y el diagnóstico de enfermedades como las cardiopatías coronarias.

Ejemplo 7: Automatización de formatos de ensayo DAZ y HIC de Lp-PLA2

5 Como se muestra anteriormente, hemos desarrollado varios formatos de ensayo basados en la actividad para Lp-PLA2: una versión modificada del ensayo de actividad del sustrato MNP (DAZ), una versión modificada del ensayo de actividad del sustrato 2-tio-PAF (ThioPAF mejorado), y un formato de inmunocaptura híbrido (HIC) que utiliza el anticuerpo de caputra anti Lp-LAC2 2C10 a partir del test PLAC y el sustrato MNP para la detección (HIC-DAZ). Los dos formatos de ensayo HIC-DAZ y DAZ han demostrado la correlación con el método radiométrico de ³H-PAF a la hora de determinar los niveles de Lp-PLA2 en plasma de los sujetos.
 10 Adicionalmente, hemos desarrollado ensayos automatizados de alto rendimiento DAZ y HIC-DAZ que se pueden utilizar para generar de manera fiable más de 1000 puntos de datos por día, por operador. Además, hemos probado la actividad de Lp-PLA2 en plasma emparejado y se ha demostrado una buena correlación de los valores recuperados entre estos dos tipos de muestras.

Descripciones de plataformas de automatización

15 MultiPROBE

Multiprobe II HT es una estación robótica de tratamiento de líquidos fabricada por Perkin Elmer / Packard (Torrance, CA). El instrumento se compone de ocho sondas de pipeta que pueden funcionar simultáneamente o independientemente una de otra, una sonda específica con mecanismo de enjuague/lavado y una gran cubierta que puede acomodar 28 placas estándar de microtitulación de 96 pocillos o cajas de punta de pipeta. La cubierta puede estar equipada con un brazo robótico tornado extra y un apilador de placas u hotel para incrementar su capacidad de rendimiento (no disponible en la unidad que se utiliza en la presente memoria).
 20 Debido a las opciones flexibles de pipeteado y capacidad integrada de detección de líquido que puede detectar volúmenes inexactos de líquido aspirado o puntas obstruidas, resulta ventajoso para transferir o distribuir en alícuotas muestras de plasma o suero. Esta estación robótica puede transferir muestras de los tubos a placas de 96 pocillos. Sin embargo, debido a que las sondas dispensan muestras y reactiva 8 canales a la vez, lleva más tiempo que Multiprobe dispense un reactivo a la placa entera de 96-pocillos, en comparación con estaciones robóticas equipadas con un cabezal dispensador de 96 pocillos (por ejemplo, MiniTrak). Se pueden encontrar una descripción adicional de la estación robótica MultiPROBE en la siguiente página web:

Dirección de Internet: las.perkinelmer.com/catalog/Product.aspx?ProductId=AMP8B00

30 MiniTrak

MiniTrak es una estación robótica de tratamiento de líquidos fabricada por Perkin Elmer/Packard (Torrance, CA). El instrumento se compone de un cabezal de pipeteado de 96 pocillos que puede dispensar reactivos y muestras a todos los 96 pocillos a la vez, 4 apiladores que pueden acomodar 12 cajas de punta de pipeta o 50 placas estándar de microtitulación de 96 pocillos, una cinta transportadora que transporta las placas a y desde diferentes estaciones, y una cubierta pequeña que tiene 9 posiciones para placas estándar de microtitulación de 96 pocillos o cajas de puntas de pipeta. Sin embargo, la cabeza de pipeteado de 96 pocillos no tienen una capacidad de detección de líquido que pueda detectar volúmenes inexactos de fluidos aspirados o puntas obstruidas, y por lo tanto, es menos ventajoso para la transferencia de muestras de plasma o suero. Además, el robot puede transferir y/o dispensar muestras y reactivos hacia y desde los formatos de 96 pocillos, pero no puede transferir las muestras hacia y desde los tubos. Sin embargo, debido a que MiniTrak puede dispensar muestras y reactivos para toda la placa de 96 pocillos de una sola vez, sí tiene una ventaja
 40

significativa cuando se dispensa el sustrato MNP en los ensayos DAZ o HIC, donde el tiempo es importante. En la siguiente página web se puede encontrar una descripción adicional de la estación robótica MiniTrak:

Dirección en Internet: las.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/P10503-MinitrakSpecificationsSheet.pdf

Automatización del Ensayo DAZ de Lp-PLA2

5 Para la automatización del ensayo DAZ descrito anteriormente, hemos dividido el análisis en tres tareas principales: la carga de la muestra a la placa de 96 pocillos, la adición del sustrato y la lectura. La automatización de cada tarea se evaluó en las plataformas robóticas MiniTrak y Multiprobe.

Automatizado DAZ en Multiprobe

10 Para la transferencia automática de la muestra sobre la plataforma MultiPROBE, se colocaron los tubos en el soporte de tubos, o se colocaron placas de muestras madre sobre la cubierta (14 máximo). Se inició el programa de transferencia de muestras en el sistema MultiPROBE, que incluye las siguientes acciones: Flush wash, recogido de puntas, recogida de muestras, dispensar muestras en placa de muestras/ensayo (96-pocillos), descartar puntas y repetir. Las placas de muestra se etiquetaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para almacenamiento a largo plazo, la placa se selló y se almacenó a -80°C hasta su uso.

15 Para realizar el ensayo se colocaron las muestras/placas de ensayo (28 máximo) sobre la cubierta MultiPROBE. 1,4 ml de sustrato R2 se puso en cada sonda sin punta desechable conectada, a continuación, 110 µl de sustrato R2 se dispensó en cada pocillo durante aproximadamente 40 segundos. El cambio en la absorción se midió inmediatamente usando un lector de placas en modo cinético a 405 nm durante 5 minutos después de la adición de R2. El lector de placas se fijó a temperatura ambiente, con mezcla automática establecida para
20 mezclar durante 20 segundos una vez antes de leer, y los puntos de datos se obtuvieron a intervalos de 15 segundos. El protocolo se repitió con placas posteriores una vez completada la lectura de cada placa anterior.

Rendimiento de DAZ de Lp-PLA2 en MultiPROBE

25 La reproducibilidad, la precisión y el efecto potencial de la placa de ensayo DAZ en MultiPROBE se testó usando una sola muestra simulada de plasma (suero de ternera adulterado con rLP-PLA2) en dos placas de ensayo para generar 192 réplicas de la muestra (ver tabla a continuación). Los siguientes son los resultados del análisis que muestra la media, mediana, desviación estándar, %CV de cada fila y columna de cada placa.

Análisis del efecto de la placa del ensayo DAZ en MultiPROBE (Placa 1)

	Media Mediana Des Est % CV															
Placa 1	110.86	111.21	109.95	84.71	108.10	108.35	109.48	109.42	110.33	110.27	111.22	110.29	107.85	110.11	7.35	6.82
	111.56	118.61	111.28	83.26	106.17	109.90	115.20	109.76	110.76	110.48	112.83	114.29	109.51	111.02	8.84	8.07
	108.51	110.00	109.86	87.40	107.86	107.58	108.40	108.50	109.04	109.02	111.02	110.74	107.33	108.77	6.37	5.93
	108.26	110.04	107.78	84.39	106.16	107.20	108.33	107.51	108.08	108.94	109.08	110.31	106.34	108.17	7.01	6.59
	108.49	110.24	108.71	85.18	105.93	108.25	107.01	107.74	108.74	109.83	109.98	110.76	106.74	108.60	6.93	6.49
	109.58	110.55	104.07	85.31	107.87	106.81	106.46	108.78	109.36	109.51	109.26	110.13	106.47	109.02	6.91	6.49
	109.15	111.03	110.63	84.18	108.38	108.21	108.38	109.27	109.20	109.54	110.42	111.01	107.45	109.23	7.40	6.88
	111.69	110.73	109.21	87.12	108.04	108.19	110.98	110.15	113.26	110.24	111.24	108.92	108.31	110.20	6.84	6.32
	109.76	111.55	108.94	85.19	107.31	108.06	109.28	108.89	109.85	109.73	110.63	110.81	107.50	109.50	7.12	6.62
Media	109.76	111.55	108.94	85.19	107.31	108.06	109.28	108.89	109.85	109.73	110.63	110.81				
Mediana	109.67	110.88	109.07	85.19	107.58	108.12	108.84	108.89	109.60	109.73	110.63	110.75				
SD	1.32	2.70	2.10	1.33	0.97	0.87	2.59	0.88	1.51	0.54	1.14	1.45				
% CV	1.21	2.42	1.93	1.56	0.90	0.81	2.37	0.81	1.38	0.49	1.03	1.30				

ES 2 416 344 T3

Análisis del efecto de la placa del ensayo DAZ en MultiPROBE (Placa 2)

	Media Mediana Des Est % CV															
Placa 1	101.04	102.43	103.02	102.85	83.74	10271	99.97	93.14	101.68	100.47	105.41	104.19	100.05	102.06	5.98	5.97
	111.56	118.61	111.28	83.26	106.17	109.90	115.20	109.76	110.76	110.48	112.83	114.29	100.37	101.09	7.26	7.23
	95.82	101.05	102.21	104.75	83.43	103.16	102.01	95.47	98.56	101.24	101.16	102.37	99.27	101.20	5.72	5.76
	95.22	99.51	105.32	102.85	84.81	97.85	97.57	95.83	97.67	101.74	100.93	102.78	98.51	98.68	5.30	5.38
	97.18	99.65	103.45	105.74	83.34	100.67	104.48	97.80	99.29	103.16	102.95	103.74	100.12	101.81	5.95	5.94
	99.32	100.96	104.67	103.41	85.86	105.40	104.33	102.72	99.66	104.20	104.07	98.95	101.13	103.07	5.31	5.25
	104.07	105.21	105.10	107.45	82.79	105.10	104.31	103.63	105.68	103.31	103.13	104.25	102.84	104.28	6.42	6.25
	97.00	100.92	105.48	105.77	85.33	102.77	104.01	106.65	103.12	102.09	104.51	102.66	101.69	102.95	5.75	5.65
99.44	101.53	104.18	105.21	84.13	102.93	102.02	99.25	100.60	101.99	101.51	103.19	100.50	101.76	5.95	5.42	
Media	99.44	101.53	104.18	105.21	84.13	102.93	102.02	99.25	100.60	101.99	101.51	103.19				
Mediana	99.38	101.29	104.19	105.21	84.94	102.93	102.02	99.01	100.13	101.99	102.23	103.19				
SD	3.66	1.72	1.11	2.05	1.01	2.50	2.53	4.35	2.52	1.42	4.61	2.03				
% CV	3.68	1.70	1.07	1.94	1.20	2.43	2.48	4.39	2.51	1.39	4.54	1.97				

Los resultados del análisis muestran que ningún efecto significativo de placa se observó en el ensayo DAZ de Lp-PLA2 en MultiPROBE. Además, el ensayo mostró excelentes CVs intra- e inter-ensayo demostrando que el ensayo DAZ de Lp-PLA2 puede automatizarse en la plataforma MultiPROBE.

5

DAZ Automatizado en MiniTrak

Para la transferencia automática de la muestra sobre la plataforma MiniTrak, se cargaron placas de muestra madre en el apilador de muestra (12 máximo), y un número igual de placas de ensayo vacías se cargaron en el apilador de placas de ensayo. Se inició el programa de transferencia de muestras en el sistema MiniTrak, el cual incluye las siguientes acciones: recoger puntas, Recoger 25 uL de muestras, dispensar muestras en la placa de ensayo, descartar puntas y repetir. Las placas de muestra se etiquetaron y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Para almacenamiento a largo plazo, la placa se selló y se almacenó a -80°C hasta su uso.

Para realizar el ensayo, se colocaron las placas de ensayo cargadas con las muestras (máximo 12) en el apilador placa de ensayo. La plataforma MiniTrak recogió las puntas y elaboró 115 ul de sustrato R2 en cada punta. 110 uL de sustrato R2 se dispuso en todos los pocillos y las puntas se descartaron. El cambio en la absorción se midió inmediatamente usando un lector de placas en modo cinético a 405 nm durante 5 minutos después de la adición de R2. El lector de placas se fijó a temperatura ambiente, con mezcla automática establecida para mezclar durante 20 segundos una vez antes de realiza la lectura, y los puntos de datos se obtuvieron a intervalos de 15 segundos. El protocolo se repitió con placas posteriores una vez completada la lectura de cada placa anterior.

Rendimiento DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak

El rendimiento del ensayo DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak se evaluó para conocer la reproducibilidad y exactitud durante una ejecución por lotes, las pruebas del efecto de la placa, correlación para el ensayo manual DAZ en el plasma normal y la precisión. Una ejecución por lote típico consistió en 10 placas de ensayo que pueden ser completados por un operador en 2 horas.

Reproducibilidad de la ejecución en lotes de DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak y efecto placa

Para probar la reproducibilidad y exactitud en una ejecución por lotes y el efecto potencial de la placa del ensayo DAZ en MiniTrak hemos testado una sola muestra de plasma simulado (suero de ternera adulterado con rLp-PLA2) en diez placas de ensayo para generar 960 réplicas de la muestra. A continuación se presentan

30

ES 2 416 344 T3

los resultados del análisis que muestra la media, mediana, desviación estándar y %CV de cada fila y columna de cada placa.

Análisis del efecto de la placa en el ensayo DAZ en MiniTrak (placa 1)

Placa 1												Media	Mediana	Des Est	% CV	
89.593	87.747	86.927	89.827	87.64	91.287	91.213	90.133	89.7	83.1	89.9	88.507	88.80	89.65	2.54	2.26	
89.747	86.6	89.36	91.087	84.993	89.047	90.173	85.673	90.607	84.087	88.953	84.307	87.89	89.00	2.93	2.58	
87.04	87.193	89.22	90.153	84.94	89.92	90.847	85.233	90.18	90.493	86.207	89.84	88.44	89.53	2.45	2.17	
88.353	86.707	84.573	89	86.427	88.62	90.827	89.08	87.96	91.073	89.56	90.58	88.56	88.81	2.19	1.94	
88.867	89.893	85.693	91.473	90.24	88.42	89.92	95.26	87.28	90.44	85.993	85.607	89.09	89.38	3.13	2.78	
87.313	91.707	87.973	91.733	89.76	85.393	90.773	88.54	87.567	89.527	84.967	87.927	88.60	88.26	2.49	2.20	
87.333	89.473	86.58	90.88	89.827	87.967	90.693	90.273	89.04	89.527	90.113	87.553	89.10	89.50	1.59	1.42	
87.973	88.713	83.593	89.46	90.66	84.013	88.153	90.213	86.4	88.747	89.933	86.18	87.84	88.43	2.65	2.33	
Media	99.44	101.53	104.18	105.21	84.13	102.93	102.02	99.25	100.60	101.99	101.51	103.19				
Mediana	99.38	101.29	104.19	105.21	84.94	102.93	102.02	99.01	100.13	101.99	102.23	103.19				
SD	3.66	1.72	1.11	2.05	1.01	2.50	2.53	4.35	2.52	1.42	4.61	2.03				
% CV	3.68	1.70	1.07	1.94	1.20	2.43	2.48	4.39	2.51	1.39	4.54	1.97				

5 Análisis de la reproducibilidad placa a placa del ensayo DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak

	Media	Mediana	%CV	SD
Placa 1	90.12	90.18	4.04	3.64
Placa 2	90.04	90.16	4.08	3.67
Placa 3	89.47	89.67	5.49	4.91
Placa 4	90.18	89.34	4.39	3.96
Placa 5	81.73	81.25	5.65	4.62
Placa 6	88.54	89.02	2.49	2.21
Placa 7	87.64	87.81	1.58	1.39
Placa 8	94.57	94.25	3.07	2.90
Placa 9	88.17	88.07	4.71	4.15
Placa 10	84.24	84.19	6.03	5.08
Promedio	88.47	88.39	4.15	3.65

Los resultados del análisis muestran que no se observó ningún efecto significativo de placa para el ensayo DAZ en MiniTrak. Además, el ensayo mostró excelentes CVs intra- e inter-ensayo. Los valores fueron reproducibles en toda la ejecución por lotes de 10 placas, lo que indica que los valores exactos sin la variación se obtuvieron durante una ejecución por lotes.

Correlación entre los ensayos DAZ automatizado en MiniTrak y DAZ manual

Para probar las correlaciones entre los valores derivados de los ensayos DAZ manual y DAZ automatizado en MiniTrak, 80 muestras de plasma normal fueron testadas con ambos ensayos, y los valores se correlacionaron en una parcela de regresión lineal. Una mejor línea de ajuste para la parcela de regresión lineal tenía una pendiente de $y = 0,9557x - 0,3013$. Además, el valor R^2 para el conjunto de datos fue 0,9487.

Estos resultados demuestran una correlación excelente entre el ensayo DAZ manual y el ensayo DAZ automatizado en MiniTrak. El ensayo DAZ automatizado en MiniTrak es equivalente al ensayo DAZ manual para la detección del cambio de actividad Lp-PLA2 debido a la administración de un inhibidor de Lp-PLA2.

ES 2 416 344 T3

Precisión DAZ en MiniTrak de Lp-PLA2

La variabilidad intra-ensayo para el ensayo DAZ en MiniTrak de PLA2 se evaluó para el %CV promedio calculado a partir del %CV de 24 muestras de plasma ejecutadas por triplicado. La siguiente tabla muestra los %CV promedio de las 24 muestras en las 3 ejecuciones, y %CV promedio del intra-ensayo. La precisión para el ensayo DAZ se calculó para nmol/min/ml.

5

DAZ en MiniTrak de Lp-PLA2 (nmol/min/mL)

Muestra de plasma	Ejecución 1 (%CV)	Ejecución 2 (%CV)	Ejecución 3 (%CV)	%CV promedio del intra-ensayo
1	5.9	0.5	2.4	2.9
2	1.1	0.4	1.9	1.1
3	0.9	0.4	5.1	2.1
4	0.1	1.4	0.4	0.6
5	0.9	0.5	1.2	0.9
6	1.0	0.2	1.1	0.8
7	1.3	2.6	0.6	1.5
8	1.4	1.7	1.4	1.5
9	1.3	2.5	2.5	2.1
10	2.6	1.6	2.3	2.2
11	1.9	3.0	0.7	1.9
12	0.6	0.9	2.2	1.3
13	1.1	0.8	2.8	1.6
14	5.4	1.9	1.1	2.8
15	1.3	2.7	0.5	1.5
16	1.2	1.6	1.4	1.4
17	0.4	3.0	2.3	1.9
18	2.0	3.8	0.5	2.1
19	1.9	0.6	1.0	1.2
20	1.2	0.7	1.7	1.2
21	0.8	1.4	0.8	1.0
22	1.7	1.8	0.4	1.3
23	2.6	4.9	1.2	2.9
24	2.0	2.3	7.6	3.9
%CV Promedio	1.7	1.7	1.8	1.7

La variabilidad inter-ensayo para el ensayo DAZ en MiniTrak de Lp-PLA2 se evaluó mediante el %CV de los valores para 24 muestras plasmáticas analizadas en 3 ensayos independientes. El %CV promedio del inter-ensayo para cada uno se calculó a partir de las pendientes de las 24 muestras. La precisión para el ensayo DAZ en MiniTrak de Lp-PLA2 se calculó para nmol/min/mL.

10

DAZ en MiniTrak de Lp-PLA2 (nmol/min/mL)

Plasma	Ejecución 1	Ejecución 2	Ejecución 3	CV del Inter-ensayo
1	104.61	112.90	107.76	3.8%
2	159.66	174.56	163.28	4.6%
3	82.79	89.25	82.59	4.4%
4	114.32	125.53	118.53	4.6%
5	114.33	126.18	118.38	4.9%
6	131.09	141.90	134.49	4.0%
7	148.08	162.57	155.41	4.6%
8	178.05	194.40	184.75	4.3%
9	271.28	311.94	294.44	6.9%
10	154.96	168.24	159.61	4.1%
11	137.72	152.27	148.34	5.0%
12	154.04	173.76	165.58	5.9%
13	86.47	98.32	92.47	6.3%
14	116.64	127.12	122.57	4.2%

15	114.79	128.17	122.58	5.4%
16	113.25	125.25	121.47	5.0%
17	153.93	168.41	161.36	4.4%
18	138.74	155.41	149.92	5.6%
19	74.32	81.62	77.87	4.6%
20	53.02	57.38	53.38	4.4%
21	55.99	60.46	55.89	4.5%
22	82.80	90.45	84.46	4.6%
23	100.27	109.14	103.85	4.2%
24	99.92	108.42	97.05	5.8%
%CV Promedio	122.54	135.15	128.17	4.8%

Hemos demostrado con éxito la adaptación de un ensayo basado en la actividad Lp-PLA2, como el ensayo DAZ, en una plataforma automatizada, como las plataformas automatizadas Multiprobe y MiniTrak. Además, hemos demostrado que el ensayo DAZ automatizado en la plataforma MiniTrak muestra una excelente reproducibilidad y precisión, y tiene una buena correlación con el método DAZ manual. Además ensayo DAZ automatizado en MiniTrak es un ensayo de alto rendimiento que puede analizar 10 placas por lote (960 determinaciones) por operador en 2 horas. Sobre la base de este rendimiento, estimamos que un operador puede realizar con fiabilidad dos ejecuciones por lote al día, lo que resulta en el análisis de 20 placas o 1920 determinaciones por día.

Hemos aplicado con éxito ambos sistemas robóticos a la carga de la muestra a la placa de ensayo de 96 pocillos y adición del sustrato, pero hemos dependido de un operador para mover la placa de la estación robotizada a un lector de placas. Sin embargo, se prevé que con el equipo y las modificaciones adecuadas todos los pasos se pueden automatizar. La adaptación de un brazo tornado Zymark a la MiniTrak permitiría la automatización de todo el proceso. Adicionalmente, se prefiere que la carga de las muestras sobre la placa de ensayo, especialmente cuando se transfieren las muestras a partir de tubos a placa, se realice manualmente, o con un sistema robótico equipado con una capacidad sensible de detección de líquidos (por ejemplo, MultiPROBE). Resulta ventajoso que el sistema pueda detectar puntas obstruidas, debido a las partículas obstructivas que se encuentran comúnmente en las muestras de plasma y suero. Además, también resulta ventajoso que la adición de sustrato en todos los 96-pocillos de la placa de ensayo se haga simultáneamente, utilizando un sistema robótico equipado con un dispensador de 96 cabezas (por ejemplo, MiniTrak), para mantener una buena precisión. Por lo tanto, ambos sistemas robóticos, MultiPROBE (o pipeteado manual) para carga de muestra a la placa de ensayo de 96 pocillos y MiniTrak por adición del sustrato, son útiles en la automatización del ensayo DAZ de Lp-PLA2. Se prevé que con el equipo adecuado, todos los procesos/tareas para ensayo DAZ de Lp-PLA2 puedan ser totalmente automatizados en un sistema integrado.

Automatización del Ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2

Para la automatización del ensayo HIC-DAZ descrito anteriormente, hemos dividido el análisis en cinco tareas principales: la carga de la muestra a una placa de ensayo de 96 pocillos, incubación, lavado, adición de sustrato y la lectura. La automatización de cada tarea se evaluó en la plataforma robótica MiniTrak debido al éxito observado con la automatización de ensayo DAZ.

Automatizado HIC en MiniTrak

20 uL de muestras de plasma, estándares y controles se transfirieron en placas de ensayo de medios pocillos recubiertas de anticuerpos anti Lp-PLA2 2C10 utilizando o bien la plataforma MultiPROBE (método descrito anteriormente), MiniTrak (método descrito anteriormente.), o manualmente. Esto se realizó para 5

ES 2 416 344 T3

placas (una ejecución de lote son 5 placas). Se estableció el tiempo para la Placa 1 y los pasos posteriores se iniciaron para la Placa 1. Se siguió el mismo procedimiento para cada placa, en secuencias y a intervalos de 6 minutos.

5 Después de la adición de las muestras de plasma, estándares y controles la placa se selló y se incubó agitando a 180 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de la incubación, las placas se lavaron dos veces con 75 uL 1xTBS con 0,05% de Tween-20 y colocado en la MiniTrak. Se inició la función de recogida puntas en MiniTrak y 23 ul del sustrato R2 se puso en cada punta. Se desecharon las puntas después de dispensar 20 uL del sustrato R2 en cada pocillo. El cambio en la absorción se midió inmediatamente usando un lector de placas en modo cinético a 405 nm durante 5 minutos después de la adición de R2. El lector de 10 placas se fijó a temperatura ambiente, con mezcla automática establecida para mezclar durante 10 segundos una vez antes de leer, y los puntos de datos se obtuvieron a intervalos de 15 segundos. El protocolo se repitió con placas posteriores una vez completada la lectura de cada placa anterior.

Rendimiento HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak

15 El rendimiento del ensayo HIC de Lp-PLA2 en MiniTrak se evaluó para la reproducibilidad y exactitud durante una ejecución por lotes, las pruebas del efecto de la placa, la correlación para el ensayo manual HIC-DAZ en muestras de plasma normal, y la precisión. Una típica ejecución por lote consistió en probar 5 placas, que puede completar un operador en 1,5 horas.

20 *Reproductibilidad de una ejecución por lote en MiniTrak y efecto placa*

Para evaluar la reproducibilidad y exactitud en una ejecución por lotes, y el efecto potencial de la placa del ensayo HIC-DAZ en MiniTrak, hemos probado una sola muestra de plasma simulada (suero de ternera adulterada con rLp-PLA2) en 5 placas de ensayo para generar 480 réplicas de la muestra. A continuación se presentan los resultados del análisis que muestra la media, mediana, estándar, y %CV de cada fila y columna de 25 cada placa.

Análisis del efecto de la placa en el ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak

	Media Mediana Des Est % CV															
Placa 1	35.52	27.44	28.96	33.6	27.64	30.8	33.32	28.2	28.76	33.08	26.2	29.04	30.2133	29.00	2.975	9.8%
	31.04	26.48	27.44	31	30.68	27.2	31.88	27.32	27.4	33.56	28.68	28.04	29.2267	28.36	2.294	7.8%
	37.08	28.36	27	32.16	23.32	26.6	30.8	26.36	28	29.2	24.24	25.96	28.2567	27.50	3.744	13.3%
	30.92	25.36	26.32	30.4	26.64	24.72	30.76	24.28	27.4	28.44	25.68	26.04	27.2467	26.48	2.357	8.7%
	30.36	31.76	25.68	31.4	32.2	24.84	31.52	34.32	25.88	28.84	32.76	25.44	29.5833	30.88	3.316	11.2%
	30.16	30.28	25.04	31.24	32.2	22.96	29.44	37.08	25.16	27.44	30.28	23.8	28.7567	29.80	4.057	14.1%
	28.4	30.4	23.44	28.84	33	23.92	26.6	31.8	23.96	26.36	30	22.84	27.4633	27.50	3.459	12.6%
	29	30.28	28.48	27.88	30.04	23.72	26.16	32.36	25.44	31.04	30.76	19.52	27.89	28.74	3.649	13.1%
Media	31.56	28.795	26.545	30.815	29.465	25.595	30.06	30.215	26.5	29.745	28.575	25.085				
Mediana	30.64	29.32	26.66	31.12	30.36	24.78	30.78	30	26.64	29.02	29.34	25.7				
SD	3.088	2.235	1.824	1.805	3.345	2.543	2.526	4.369	1.636	2.590	2.929	3.020				
% CV	9.8%	7.8%	6.9%	5.9%	11.4%	9.9%	8.4%	14.5%	6.2%	8.7%	10.3%	12.0%				

Análisis de la reproductibilidad placa a placa del ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak

	Media	Mediana	SD	%CV
Placa 1	28.58	28.46	3.31	11.6%
Placa 2	30.16	29.70	4.13	13.7%
Placa 3	29.28	28.96	3.89	13.3%
Placa 4	28.93	28.86	3.92	13.5%
Placa 5	26.70	26.14	3.56	13.3%
Promedio	28.73	28.42	3.76	13.1%

5 Los resultados del análisis muestran que, aunque el ensayo HIC-DAZ en MiniTrak tuvo una variación superior de pocillo a pocillo que el ensayo DAZ en MiniTrak, en general, no se ha observado ningún efecto de placa significativo en el ensayo HIC-DAZ en MiniTrak. Además, el ensayo mostró CV aceptables intra- e inter-ensayo, y los valores fueron reproducibles en toda la ejecución por lotes de 5 placas, lo que indica que los valores exactos sin la variación se pueden obtener durante una ejecución por lote.

Correlación en HIC-DAZ en MiniTrak HIC-DAZ y HIC-DAZ manual

10 Para probar la correlación entre los valores derivados de los ensayos HIC-DAZ manual y HIC-DAZ automatizados en MiniTrak, se sometieron a ensayo 80 muestras plasmáticas normales con ambos ensayos y los valores se correlacionaron en una parcela de regresión lineal. Cuatro muestras no cumplieron el intervalo CV, y por lo tanto, fueron excluidas del análisis. Una línea de mejor ajuste para la parcela de regresión lineal tenía una pendiente de $y = 0,8971x + 2,5573$. Además, el valor R^2 para el ajuste de datos fue 0,8493.

15 Los resultados muestran que existe una buena correlación entre los ensayos HIC manual y HIC en MiniTrak. Además, el ensayo HIC-DAZ automatizado en MiniTrak es comparable con el ensayo HIC-DAZ manual para detectar el cambio de actividad de Lp-PLA2 debido a la administración de un inhibidor de Lp-PLA2.

Precisión HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak

20 La variabilidad del intra-ensayo para el ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak se evaluó por el %CV promedio calculado de los %CV de 24 muestras plasmáticas por triplicado. La siguiente tabla muestra %CV promedios de 3 ejecuciones y %CV medio intra-ensayo a partir de cada una de estas tres ejecuciones. La precisión para el ensayo HIC-DAZ se calculó para nmol/ min/mL.

HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak (nmol/min/mL)

Muestra de plasma	Ejecución 1 (%CV)	Ejecución 2 (%CV)	Ejecución 3 (%CV)	%CV promedio del intra-ensayo
1	10.08	14.43	8.52	11.01
2	14.84	15.24	10.71	13.60
3	12.02	14.38	13.79	13.40
4	4.18	11.98	6.75	7.64
5	8.66	14.35	11.37	11.46
6	12.48	14.97	10.91	12.79
7	7.57	11.56	11.79	10.31
8	7.99	15.07	12.49	11.85
9	14.55	14.60	12.64	13.93
10	21.25	17.10	15.64	18.00
11	12.61	15.62	13.03	13.75
12	23.14	18.19	15.09	18.81
13	14.45	16.96	10.64	14.01

ES 2 416 344 T3

14	12.40	17.39	10.69	13.49
15	8.61	14.84	7.07	10.18
16	22.65	17.53	7.45	15.88
17	13.52	14.53	12.47	13.50
18	11.85	10.28	8.68	10.27
19	16.43	16.33	14.84	15.87
20	6.62	14.60	20.08	13.76
21	12.53	17.44	9.82	13.26
22	17.33	12.45	10.04	13.27
23	14.36	16.42	19.60	16.79
24	8.93	12.97	7.05	9.65
%CV Promedio	12.88	14.97	11.71	13.19

La variabilidad intra-ensayo para el ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak se evaluó por %CV promedio inter-ensayo de los valores para 24 muestras de plasma analizadas en 3 ensayos independientes. El %CV promedio inter-ensayo para cada uno se calculó a partir de la pendiente de las 24 muestras. La precisión del ensayo HIC se calculó para nmol/min/mL.

5 HIC-DAZ de Lp-PLA2 en MiniTrak (nmol/min/mL)

Plasma	Ejecución promedio nmol/min/ml 1	Ejecución promedio nmol/min/ml 2	Ejecución promedio nmol/min/ml 3	CV inter-ensayos
1	33.52	33.34	35.64	3.7%
2	40.25	36.40	36.61	5.7%
3	30.10	30.37	28.34	3.7%
4	34.99	32.69	31.85	4.9%
5	29.23	29.25	29.13	0.2%
6	32.25	31.16	32.04	1.8%
7	38.22	39.08	38.56	1.1%
8	30.4	29.93	28.41	3.5%
9	50.67	50.97	53.06	2.5%
10.	25.51	22.93	23.23	5.9%
11	34.13	33.28	31.32	4.4%
12	34.67	29.32	29.32	9.9%
13	31.93	32.32	32.76	1.3%
14	29.90	27.26	28.81	4.6%
15	37.38	38.68	37.90	1.7%
16	25.66	28.40	29.41	7.0%
17	37.64	36.67	37.34	1.3%
18	38.68	37.73	38.96	1.7%
19	23.30	22.86	22.99	1.0%
20	14.56	12.03	13.00	9.7%
21	16.86	15.83	16.63	3.3%
22	21.37	21.18	21.75	1.4%
23	28.32	29.41	28.99	1.9%
24	31.20	30.14	32.40	3.6%
Promedio	31.28	30.47	30.77	3.6%

Hemos demostrado con éxito la adaptación de un ensayo HIC-DAZ de Lp-PLA2 a una plataforma automatizada como la plataforma automatizada MiniTrak. Hemos demostrado que el ensayo HIC automatizado en MiniTrak muestra una reproducibilidad y precisión aceptables, y tiene una buena correlación con el método HIC-DAZ manual. Además, el ensayo automatizado HIC-DAZ en MiniTrak es un ensayo de alto rendimiento que puede analizar 5 placas por lote (480 determinaciones), por operador en 1,5 horas. Sobre la base de este rendimiento, un operador puede realizar con fiabilidad tres ejecuciones por lotes al día, lo que resulta en el análisis de las 15 placas o 1440 o determinaciones por día.

10

Al igual que con el ensayo DAZ en MiniTrak, hemos aplicado con éxito los sistemas robóticos descritos anteriormente para la carga de muestra en una placa de ensayo de 96 pocillos y la adición de sustrato para el ensayo HIC-DAZ, pero hemos dependido de un operador para lavar la placa y para moverla de la estación robotizada a un lector de placas. Sin embargo, se prevé que, con el equipo y las modificaciones apropiadas, todos los pasos se pueden automatizar en un sistema integrado. La adaptación de un brazo retorcedor Zymark a MiniTrak, automatizaría todo el proceso. Resulta ventajoso cargar las muestras sobre la placa de ensayo, especialmente cuando la transferencia de las muestras de los tubos a la placa, se realice manualmente, o con un sistema robótico equipado con una capacidad de detección sensible de líquidos (por ejemplo, MultiPROBE) que puede detectar puntas obstruidas, debido a las partículas que se encuentran comúnmente en muestras de plasma y suero.

Correlaciones Plasma/Suero e intervalos

Se evaluó la idoneidad de los métodos de detección basados en actividad Lp-PLA2 descritos anteriormente para las testar las muestras de suero en los futuros estudios epidemiológicos. Se hizo una comparación entre las muestras de suero y plasmas emparejadas para los formatos de ensayo DAZ y HIC-DAZ. Se publicaron las correlaciones y comparaciones de intervalo normal entre las muestras de plasma y suero emparejado.

Las muestras emparejadas de plasma y suero de 200 PromedDx y 38 donantes diaDexus se sometieron a ensayo para la correlación de los niveles de actividad Lp-PLA2 medidos en cada muestra. Todas las muestras fueron testadas con los ensayos automatizados y DAZ y HIC-DAZ en MiniTrak. Los valores fueron analizados en la parcela de regresión lineal.

La parcela de regresión lineal entre las muestras emparejadas de plasma y suero de los 38 donantes diaDexus utilizando el ensayo DAZ automatizado de Lp-PLA2 generó una línea de mejor ajuste con una pendiente de $y = 1,0386x + 0,7997$. Además, el valor de R^2 para el ajuste de datos fue 0,9835.

La parcela de regresión lineal entre las muestras emparejadas de plasma y suero de las muestras de 200 PromeDx (Norton, MA) usando el ensayo DAZ automatizado de Lp-PLA2 generó una línea de mejor ajuste con una pendiente de $y = 0,9771x + 3,7692$. Además, el valor de R^2 para el ajuste de datos fue 0,9356.

La parcela de regresión lineal entre las muestras emparejadas de plasma y suero de los 38 donantes diaDexus utilizando el ensayo HIC-DAZ automatizado de Lp-PLA2 generó una línea de mejor ajuste con una pendiente de $y = 1.3824 + 0.9106x$. Además, el valor de R^2 para el ajuste de datos fue 0,786.

La parcela de regresión lineal entre las muestras de emparejadas de plasma y suero de las 200 muestras PromeDx utilizando el ensayo HIC-DAZ automatizado de Lp-PLA2 generó una línea de mejor ajuste con una pendiente de $y = 0,7728x + 4,5458$. Además, el valor de R^2 para el ajuste de datos fue 0,6846.

Los resultados muestran que las correlaciones entre los niveles de actividad Lp-PLA2 del plasma y suero son excelentes, especialmente para el ensayo DAZ. Las correlaciones muy altas entre las muestras de plasma y de suero en el ensayo DAZ indican que prácticamente no hay diferencia entre las muestras de suero y plasma para ese formato. El ensayo de HIC-DAZ demostró menor correlación entre las muestras de suero y plasma que el ensayo de DAZ, lo que podría ser debido a una mayor variación analítica en el ensayo HIC-DAZ. Sin embargo, los datos muestran una buena correlación entre los valores HIC-DAZ derivados de plasma y suero, lo que indica que, en general, no parece haber ninguna diferencia significativa entre los niveles de actividad de

Lp-PLA2 detectados en plasma y suero.

Intervalos normales de Plasma/ Suero

5 Para comparar valores de intervalo normales de DAZ y HIC-DAZ derivados de las muestras de plasma y suero, trazamos curvas de distribución de los valores DAZ y HIC-DAZ de las 200 muestras emparejadas de plasma y suero descritas anteriormente. Estas parcelas de intervalo normal se representan en las siguientes tablas.

Intervalos normales para las muestras de plasma y suero – DAZ

Cuantiles DAZ		Plasma (nmol/min/mL)	Suero (nmol/min/mL)
100.00%	Máximo	250.93	268.00
99.50%		249.82	264.59
97.50%		227.48	236.29
90.00%		187.85	193.49
75.00%	Cuartil	165.94	167.26
50.00%	Mediano	145.47	149.48
25.00%	Cuartil	124.02	125.67
10.00%		100.63	103.76
2.50%		85.61	88.96
0.50%		64.05	69.91
0.00%	Mínimo	63.29	69.62

10 Intervalos normales para las muestras de plasma y suero – HIC-DAZ

Cuantiles HIC		Plasma (nmol/min/mL)	Suero (nmol/min/mL)
100.00%	máximo	36.95	38.48
99.50%		36.92	37.80
97.50%		34.40	33.44
90.00%		30.95	29.90
75.00%	Cuartil	27.13	26.69
50.00%	Mediano	23.64	23.05
25.00%	Cuartil	19.80	20.28
10.00%		15.59	15.84
2.50%		11.36	11.14
0.50%		8.56	8.60
0.00%	Mínimo	8.16	8.11

Los datos anteriores indican que la distribución del intervalo normal es casi idéntica entre las muestras de plasma y suero para los ensayos DAZ y HIC. Estos resultados apoyan una vez más nuestra observación anterior, que mostró una correlación muy alta entre los valores DAZ e HIC derivados de las 200 muestras emparejadas de plasma y suero.

15 **Ejemplo 8: Factores de conversión entre formatos de ensayo**

20 Las 200 muestras de plasma normal de PromeDx se utilizaron para determinar un factor de conversión de nmol/min/ml para ng/ml basado en la distribución utilizando los formatos de ensayos DAZ y HIC-DAZ automatizados en MiniTrak. El software SoftMax Pro 4.7.1 de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) se utilizó para recoger la densidad óptica de cada muestra generando un valor de pendiente. La pendiente se convirtió a nmol/min/mL multiplicando 1,11 y 1,43 para HIC-DAZ y DAZ, respectivamente. Estas conversiones se determinaron sobre la base de estándares de p-nitrofenol (PNP) descritos anteriormente.

Los valores para nmol/min/ml y ng/ ml se evaluaron utilizando el software de detección estadística JMP4 del Instituto SAS (Cary, NC). Los datos se procesaron utilizando la herramienta de distribución de acuerdo con el grupo de opciones Analyze. Sólo se analizaron los valores dentro del intervalo lineal de la curva estándar de cada ensayo. El intervalo lineal de HIC-DAZ se determinó que era 0-270 ng/ml y DAZ fue 0-1000 ng/mL. Los valores de percentiles equivalentes dentro de estos rangos se compararon mediante un análisis de regresión lineal. Las ecuaciones generadas en este programa se designaron como factores de conversión. El factor de conversión ng/mL a nmol/min/ml para el ensayo de HIC-DAZ es $y = 8,4464x - 10,771$, con un valor de R^2 de 0,9874. El factor de conversión ng/mL a nmol/min/ml para el ensayo de DAZ es $y = 4,3404x - 98,625$, con un valor de R^2 de 0,9956. Ambos formatos de ensayo fueron capaces de correlacionar altamente mediciones de la actividad y de la masa, lo cual es útil para comparar los resultados de diversos ensayos. Las tablas siguientes muestran la conversión entre las unidades en cuantiles diferentes en el conjunto de la muestra y la ración de entre las unidades.

Cuantiles del ensayo DAZ

Cuantiles	nmol/min/mL	ng/mL	Ratio
100%	250.93	1013.4	4.04
99.50%	250.9	1013.2	4.04
97.50%	225.96	873.2	3.86
90%	185.66	701	3.78
75%	164.13	588.80	3.59
50%	146.60	506.10	3.45
25%	125.64	428.20	3.41
10%	101.74	335.10	3.29
2.50%	84.16	277.90	3.30
0.50%	63.31	196.70	3.11
0%	63.29	196.60	3.11

Cuantiles del ensayo HIC-DAZ

Cuantiles	nmol/min/mL	ng/mL	Ratio
75%	27.40	232.14	8.47
50%	24.40	194.91	7.99
25%	21.34	159.89	7.49
10%	18.12	136.50	7.53
2.50%	14.21	104.44	7.35
0.50%	7.98	61.15	7.66
0%.	7.97	61.11	7.67

La conversión de nmol/min/ml a ng/mL permite la correlación de formatos de ensayo con varios resultados. Los niveles elevados de Lp-PLA2 (ng/ml) en suero han demostrado que se asocian a varias formas de enfermedades cardiovasculares. La conversión de los niveles de actividad Lp-PLA2 es útil para correlacionar diferentes formatos de ensayo para su uso en la evaluación de riesgo, el diagnóstico de un trastorno de Lp-PLA2, la selección de personas para la terapia de enfermedades cardiovasculares y seguimiento de la respuesta a la terapia de las enfermedades cardiovasculares como las estatinas y los inhibidores de Lp-PLA2.

En resumen, hemos desarrollado con éxito ensayos automatizados de Lp-PLA2 de alto rendimiento que permiten la realización de 1920 y 1440 determinaciones sobre ensayos DAZ y HIC-DAZ, respectivamente, para un operador durante un turno de 8 horas. Estos resultados demuestran que es posible la automatización completa de los ensayos HIC-DAZ y DAZ. Los ensayos automatizados son reproducibles y precisos, y generan datos que son prácticamente idénticos a los métodos manuales en las muestras normales. La evaluación de

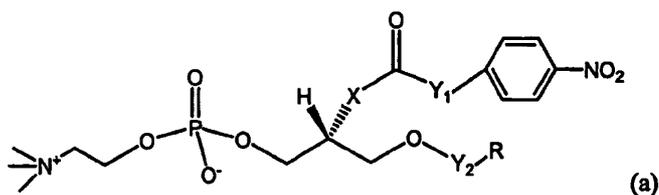
muestras emparejadas de plasma y suero muestran que los ensayos HIC-DAZ y DAZ de Lp-PLA2 generan valores comparables en plasma y suero, indicando el potencial de la utilización de muestras de suero en futuros estudios epidemiológicos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para medir la Fosfolipasa A2 asociada a la Lipoproteína (Lp-PLA2) enzimáticamente activa en una muestra obtenida de un individuo, el método incluye:
 - (a) Poner en contacto un aglutinador inmovilizado, esto una específicamente Lp-PLA2 con la muestra;
 - 5 (b) Lavar el aglutinador inmovilizado para eliminar el material no unido enzimáticamente activo o una sustancia interferente;
 - (c) Poner en contacto la unión Lp-PLA2 con un sustrato convertido a un producto detectable en presencia de Lp-PLA2; y
 - (d) Medir el producto detectable indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra.
- 10 2. Un método según la reivindicación 1 en donde la muestra es una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de plasma tratada con EDTA o una muestra de suero tratada con EDTA.
3. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en donde el aglutinador inmovilizado es un anticuerpo.
4. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 3, el método incluye además comparar el
15 producto detectable medido del paso (d) a un producto detectable en un control que incluya un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa.
5. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el aglutinador inmovilizado está unido a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética o una perla de látex.
6. Un método para medir la Fosfolipasa A2 asociada a la Lipoproteína (Lp-PLA2) enzimáticamente activa en una
20 muestra obtenida de un individuo, el método incluye:
 - (a) Poner en contacto un aglutinador, que una específicamente Lp-PLA2 con la muestra para formar un complejo aglutinante-Lp-PLA2;
 - (b) Inmovilizar el complejo aglutinante-Lp-PLA2;
 - (c) Lavar el complejo aglutinante-Lp-PLA2 inmovilizado para eliminar el material no unido
25 enzimáticamente activo o una sustancia interferente;
 - (d) Poner en contacto la unión inmovilizada de Lp-PLA2 con un sustrato convertido a un producto detectable en presencia de Lp-PLA2; y
 - (e) Medir el producto detectable indicativo de Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra.
7. Un método según la reivindicación 6 en donde la muestra es una muestra de suero, una muestra de plasma o
30 una muestra de plasma tratada con EDTA.
8. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6 o 7 en donde el aglutinador es un anticuerpo.
9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en donde el complejo aglutinante-Lp-PLA2 se inmoviliza uniéndose a un compuesto inmovilizado.

10. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 9 en donde el complejo inmovilizado es un anticuerpo, proteína o compuesto capaz de unir el complejo aglutinante-Lp-PLA2.
11. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, en donde el compuesto inmovilizado está unido a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética o una perla de látex.
- 5 12. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 6 a 8 en donde el aglutinante se conjuga con un agente inmovilizador.
13. Un método según la reivindicación 12, en donde el aglutinador conjugado con un agente inmovilizador es un anticuerpo.
14. Un método según la reivindicación 12, en donde el agente inmovilizador es un anticuerpo, proteína o compuesto capaz de unirse a un compuesto inmovilizado.
- 10 15. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 en donde el agente inmovilizador es biotina.
16. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 12 a 15, en donde el agente inmovilizador, conjugado con el complejo aglutinante-Lp-PLA2, se une a un compuesto inmovilizado.
17. Un método según la reivindicación 16, en donde el compuesto inmovilizado está unido a una placa de pocillos múltiples, una perla magnética o una perla de látex.
- 15 18. Un método según la reivindicación 16 o 17, en donde el compuesto inmovilizado es un anticuerpo, proteína o compuesto capaz de unirse a un agente inmovilizado conjugado.
19. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 en donde el compuesto inmovilizador es estreptavidina.
- 20 20. Un método según la reivindicación 6, que incluye además comparar el producto detectable medido de la etapa (e) con un producto detectable en un control que incluya un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa.
21. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 4 o 20 en donde el estándar de Lp-PLA2 enzimática activa es una proteína Lp-PLA2 recombinante o una proteína Lp-PLA2 nativa.
22. Un método según la reivindicación 21, en donde la proteína Lp-PLA2 recombinante se expresa con un sistema de expresión baculovirus o un sistema de expresión de mamífero.
- 25 23. Un método según la reivindicación 4 o 20, en donde una diferencia en un producto detectable en la muestra comparado con el estándar se debe a una diferencia en la actividad Lp-PLA2 en la muestra comparado con el estándar.
24. Un método para detectar la enfermedad vascular en un individuo que incluya la utilización del método según la reivindicación 23 para determinar la actividad Lp-PLA2 del individuo en una muestra, en donde la actividad incrementada de Lp-PLA2 en la muestra es indicativo de enfermedad vascular.
- 30

25. Un método para seleccionar a un individuo para someterlo a terapia para tratar la enfermedad vascular que incluya la utilización del método según la reivindicación 23 para determinar la actividad Lp-PLA2 del individuo en una muestra, en donde la actividad incrementada de Lp-PLA2 en la muestra indicará quién se beneficiará de la terapia para tratar la enfermedad vascular.
- 5 26. Un método para monitorear la respuesta de un individuo a la terapia para tratar la enfermedad vascular que comprende utilizar el método de acuerdo con la reivindicación 23 para determinar la actividad Lp-PLA2 del individuo en una muestra en donde la actividad disminuida de Lp-PLA2 en la muestra indica que un individuo está respondiendo favorablemente a la terapia para tratar la enfermedad vascular.
- 10 27. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 24, 25 o 26 en donde la enfermedad vascular se selecciona del grupo formado por la enfermedad coronaria vascular (ECV), enfermedad cardíaca coronaria (CHD), enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, apoplejía, defectos cardiovasculares congénitos y la insuficiencia cardíaca congestiva.
28. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 25 o 26 en donde la terapia se selecciona del grupo formado por estatinas e inhibidores de Lp-PLA2.
- 15 29. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 28, en donde el sustrato se selecciona del grupo formado por



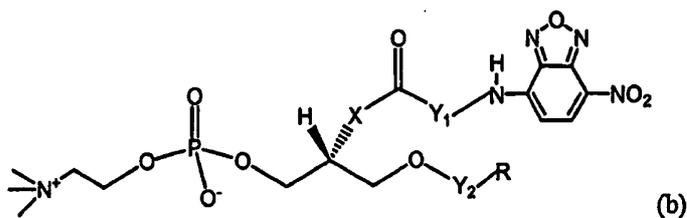
En donde

X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

- 20 R se selecciona del grupo formado por (CH₂)₄CH₃, (CH₂)₆CH₃, (CH₂)₈CH₃, (CH₂)₁₀CH₃, (CH₂)₁₂CH₃, (CH₂)₁₄CH₃ y (CH₂)₇CH=CH(CH₂)₂CH₃;

Y₁ se selecciona del grupo formado por (CO)₁₋₂ y (CH₂)₂₋₇; y

Y₂ se selecciona del grupo formado por CO y CH₂;



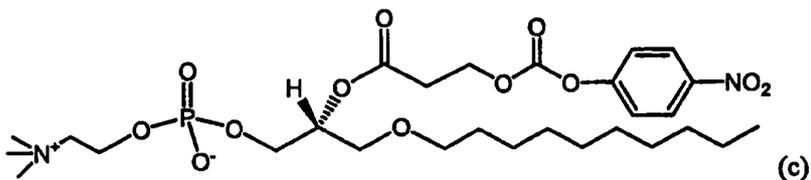
- 25 X se selecciona del grupo formado por O, S, y -O(CO)-;

R se selecciona del grupo formado por $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ y $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$;

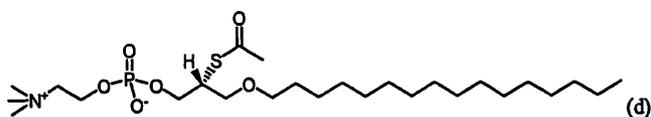
Y_1 se selecciona del grupo formado por $(\text{CO})_{1-2}$ y $(\text{CH}_2)_{2-7}$; y

Y_2 se selecciona del grupo formado por CO y CH_2 ;

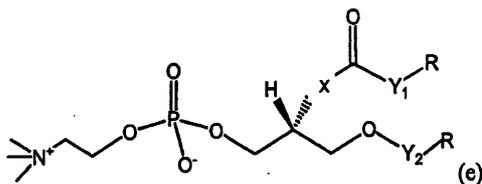
5



l-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl) phosphatidylcholine(MNP);



2-thio PAF; and



donde;

10 X se selecciona del grupo formado por O, S, y $-\text{O}(\text{CO})-$;

R se selecciona del grupo formado por $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ y $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$;

Y_1 se selecciona del grupo formado por $(\text{CO})_{1-2}$ y $(\text{CH}_2)_{2-7}$; y

Y_2 se selecciona del grupo formado por CO y CH_2 ;

15

30. Un método según la reivindicación 29, en donde el sustrato es un derivado oxidado de (a), (b), (c), (d) o (e).

31. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un producto detectable tiene una etiqueta radioactiva, colorimétrica, paramagnética o fluorescente.

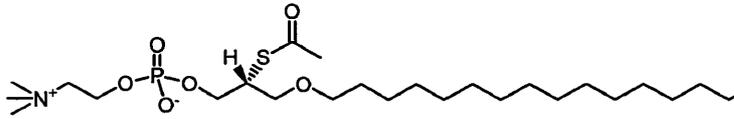
32. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde un producto detectable se mide fluorimétricamente, colorimétricamente, paramagnéticamente o por medio de radiación.

20

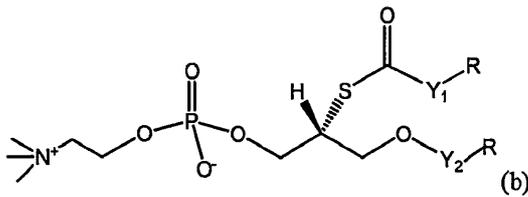
33. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 3, 8 o 13 en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo con expresión en fago o un anticuerpo policlonal.

34. Un método según la reivindicación 33, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
35. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 10, 14 o 18 en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo con expresión en fago o un anticuerpo policlonal.
36. Un método según la reivindicación 35, en donde el anticuerpo monoclonal, el anticuerpo con expresión en fago, o el anticuerpo policlonal es un anticuerpo anti-Ig de rata, ratón o cabra.
37. Un método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el material no unido enzimáticamente activo es una fosfolipasa.
38. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36 en donde la sustancia interferente es un compuesto de tioles libres.
39. Un kit para medir una Fosfolipasa A2 asociada a la Lipoproteína (Lp-PLA2) enzimáticamente activa en una muestra que incluye un anticuerpo que une específicamente Lp-PLA2 y un sustrato definido en la reivindicación 29 o 30.
40. Un kit según la reivindicación 39 que incluye además un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activo.
41. Un método para medir la Fosfolipasa A2 asociada a la Lipoproteína (Lp-PLA2) enzimáticamente activa en una muestra obtenida de un individuo, el método incluye:
- (a) La incubación de la muestra con un compuesto que reduce los tioles activos en la muestra;
 - (b) Poner en contacto la muestra incubada con un sustrato convertido a un producto de tioles libres en presencia de una Lp-PLA2 enzimáticamente activa; y
 - (d) Medir el producto detectable de tioles libres indicativo de la Lp-PLA2 enzimáticamente activa en la muestra.
42. Un método según la reivindicación 41 en donde la muestra es una muestra de suero, una muestra de plasma o una muestra de plasma tratada con EDTA.
43. Un método según la reivindicación 41 o 42 en donde el compuesto que reduce los tioles activos en la muestra es DTNB.
44. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43 en donde la muestra se incuba a temperatura ambiente.
45. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 43 en donde la muestra se incuba a 37° C.
46. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45 en donde la muestra se incuba aproximadamente de 2 minutos a 120 minutos.
47. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 41 a 45 en donde la muestra se incuba aproximadamente de 5 minutos a 30 minutos.

48. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 43 a 47, en donde el sustrato se selecciona del grupo formado por



2-tio-PAF, y



5

donde;

R se selecciona del grupo formado por $(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_8\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$, $(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ y $(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$;

Y_1 se selecciona del grupo formado por $(\text{CO})_{1-2}$ y $(\text{CH}_2)_{2-7}$; y

10 Y_2 se selecciona del grupo formado por CO y CH_2 ;

49. Un método según la reivindicación 48, en donde el sustrato es un derivado oxidado de (a) o (b).

15 50. Un método según la reivindicación 41, que incluye además comparar el producto de tioles libres medido de la etapa (c) con un producto tioles libres en un control que incluya un estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa.

51. Un método según cualquiera de las reivindicaciones de 41 a 50 en donde las etapas (a), (b) y (c) son conducidos a una placa de pocillos múltiples.

52. Un kit según cualquiera de las reivindicaciones 40 o un método según la reivindicación 50 en donde el estándar de Lp-PLA2 enzimáticamente activa es una proteína Lp-PLA2 o una proteína Lp-PLA2 nativa.

20 53. Un kit según la reivindicación 52, en donde la proteína Lp-PLA2 recombinante se expresa con un sistema de expresión baculovirus o un sistema de expresión de mamífero.

25 54. Un método para detectar la enfermedad vascular en un individuo que incluya la utilización del método según cualquiera de las reivindicaciones 41-51 para determinar la actividad Lp-PLA2 del individuo en una muestra, en donde la actividad incrementada en la muestra tal y como se compara con el control es indicativa de la enfermedad vascular.

55. Un método para seleccionar a un individuo para terapia para tratar enfermedades vasculares que incluya la utilización del método según cualquiera de las reivindicaciones 41-51 para determinar la actividad Lp-PLA2 del individuo en una muestra, en donde la actividad incrementada de Lp-PLA2 en la muestra comparada con el control es indicativa de un individuo que se beneficiará de la terapia para tratar la enfermedad vascular.
- 5 56. Un método para monitorear la respuesta de un individuo a la terapia para tratar enfermedades vasculares que incluya la utilización del método según cualquiera de las reivindicaciones 41-51 para determinar la actividad Lp-PLA2 del individuo en una muestra en donde la actividad disminuida de Lp-PLA2 en la muestra comparada con el control es indicativa de un individuo que está respondiendo favorablemente a la terapia para tratar la enfermedad vascular.
- 10 57. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 54, 55 o 56 en donde la enfermedad vascular se selecciona del grupo formado por la enfermedad coronaria vascular (ECV), enfermedad cardíaca coronaria (CHD), enfermedad vascular periférica, enfermedad arterial periférica, apoplejía, defectos cardiovasculares congénitos y la insuficiencia cardíaca congestiva.

FIG. 1A y FIG. 1B
Ensayo de Inmuncaptura Híbrida (HIC)

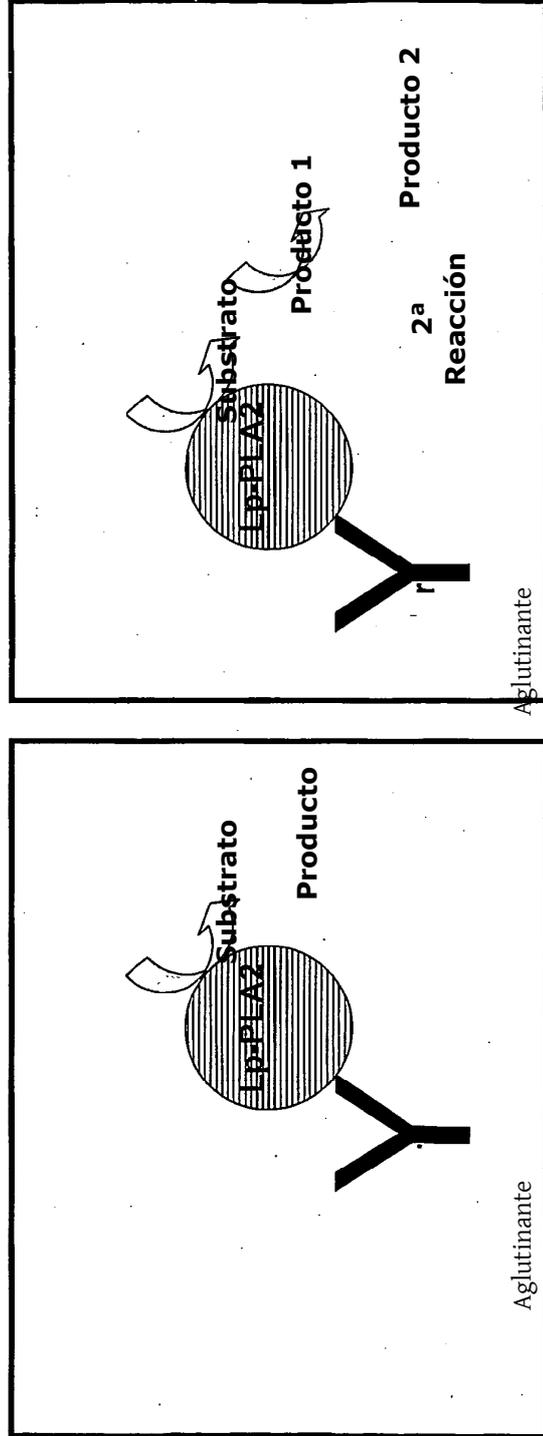
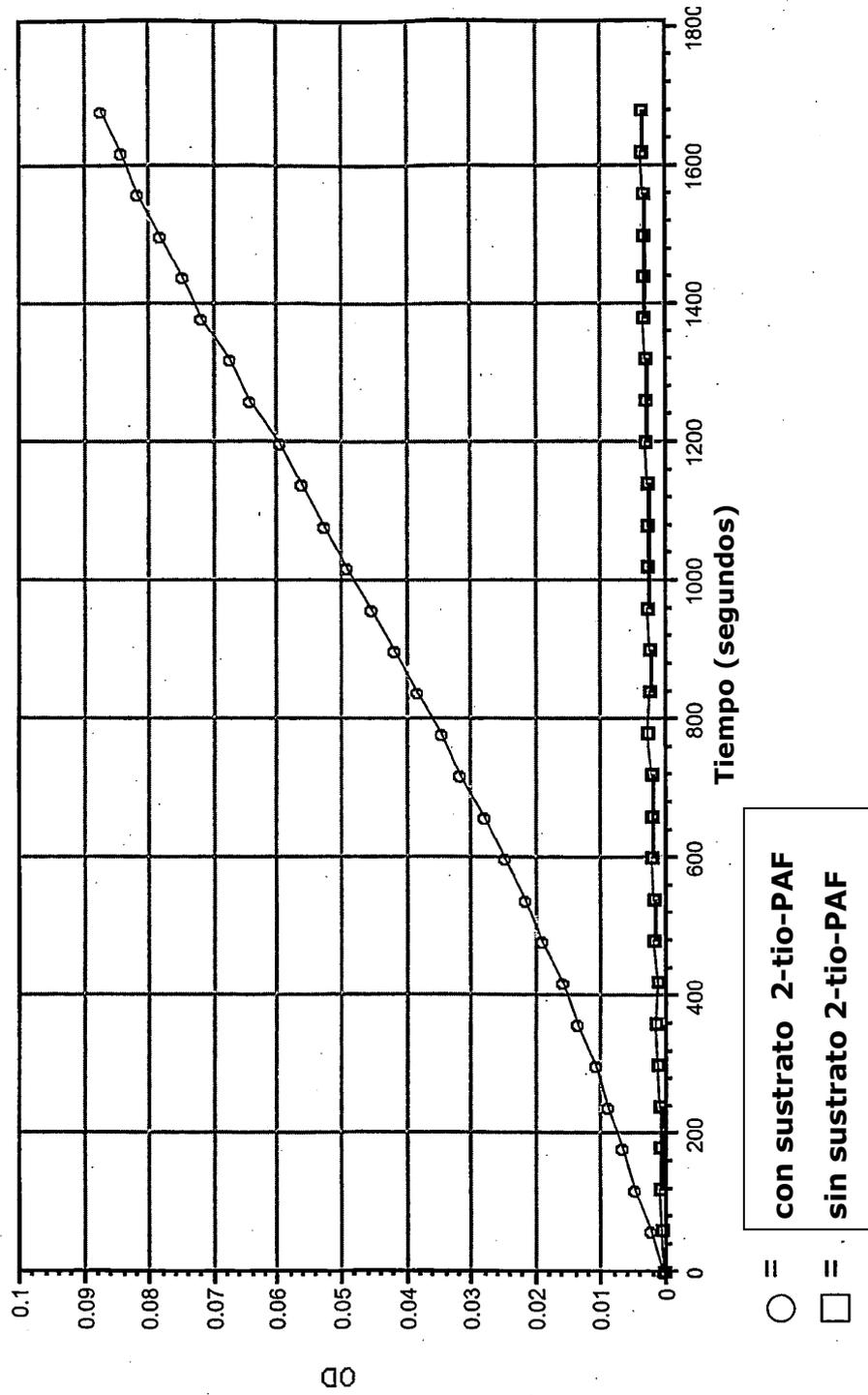


Fig. 1A

Fig. 1B

FIG. 2 Actividad Lp-PLA2 plasmática en Ensayo HIC-TioPAF (2c10 como mAb de captura)



**FIG.3: Actividad Lp-PLA2 plasmática en
Ensayo HIC-TioPAF (B200.1 como mAb de captura)**

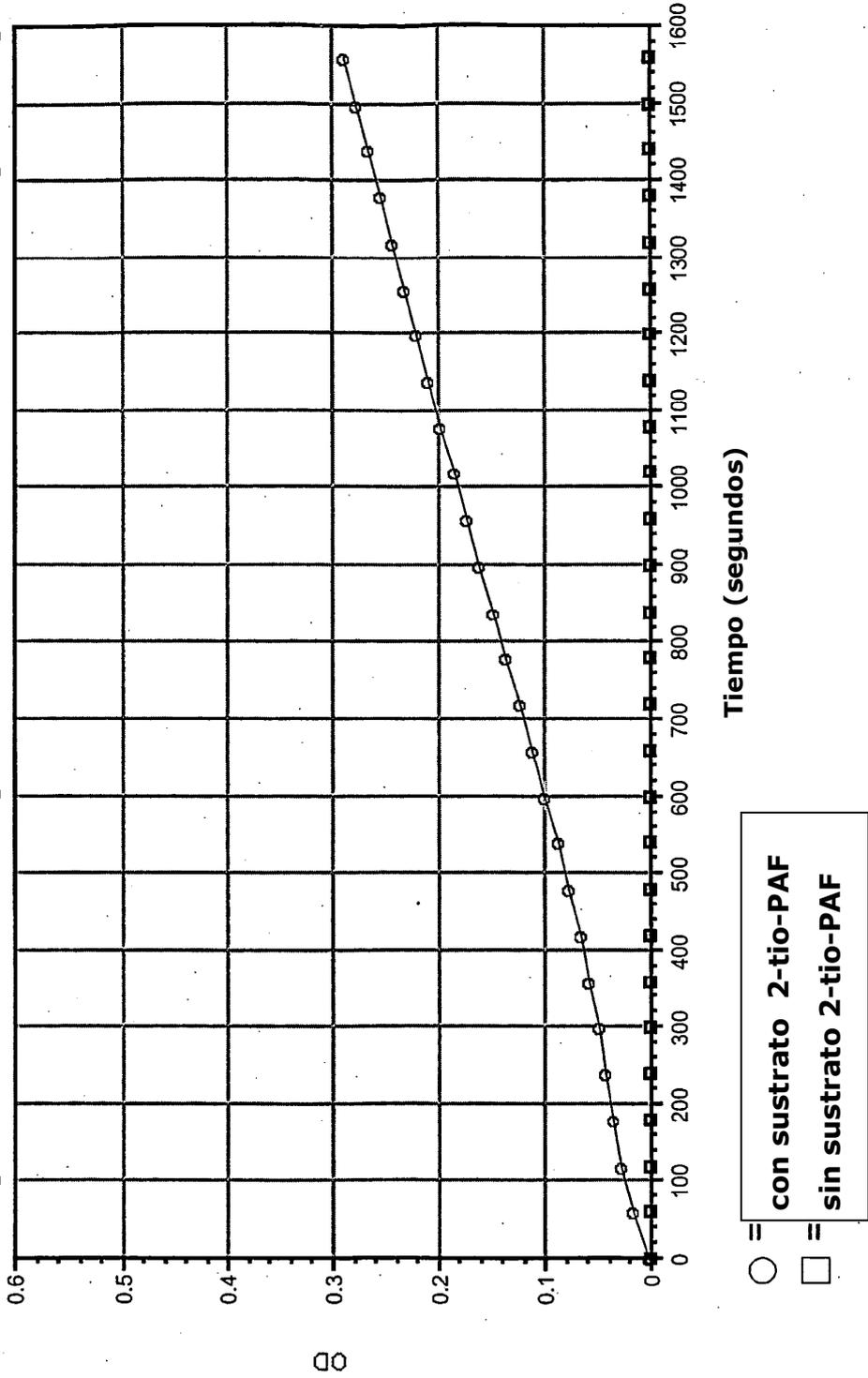


FIG.4: Actividad Lp-PLA2 plasmática en Ensayo HIC-TioPAF (B501.1 como mAb de captura)

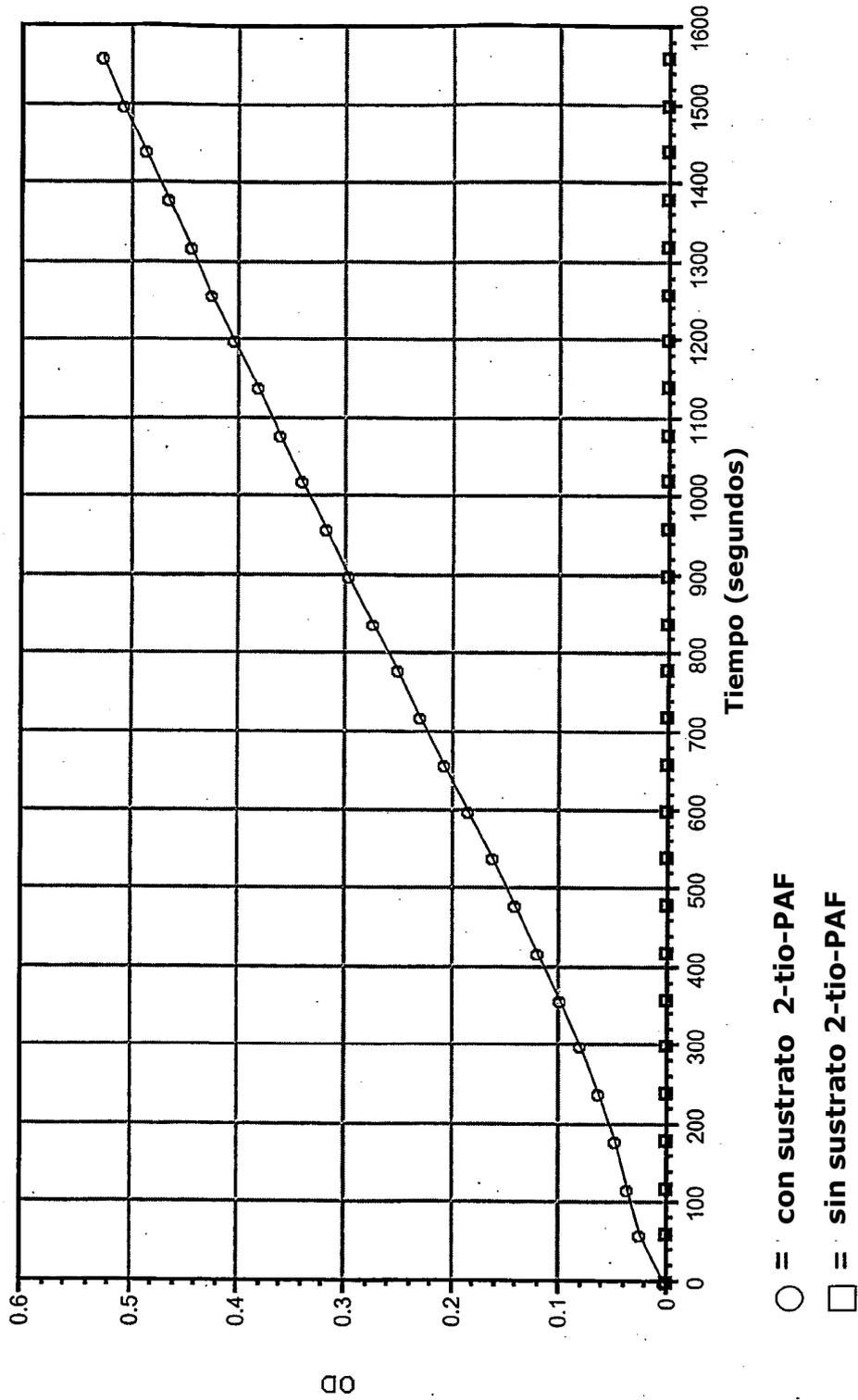
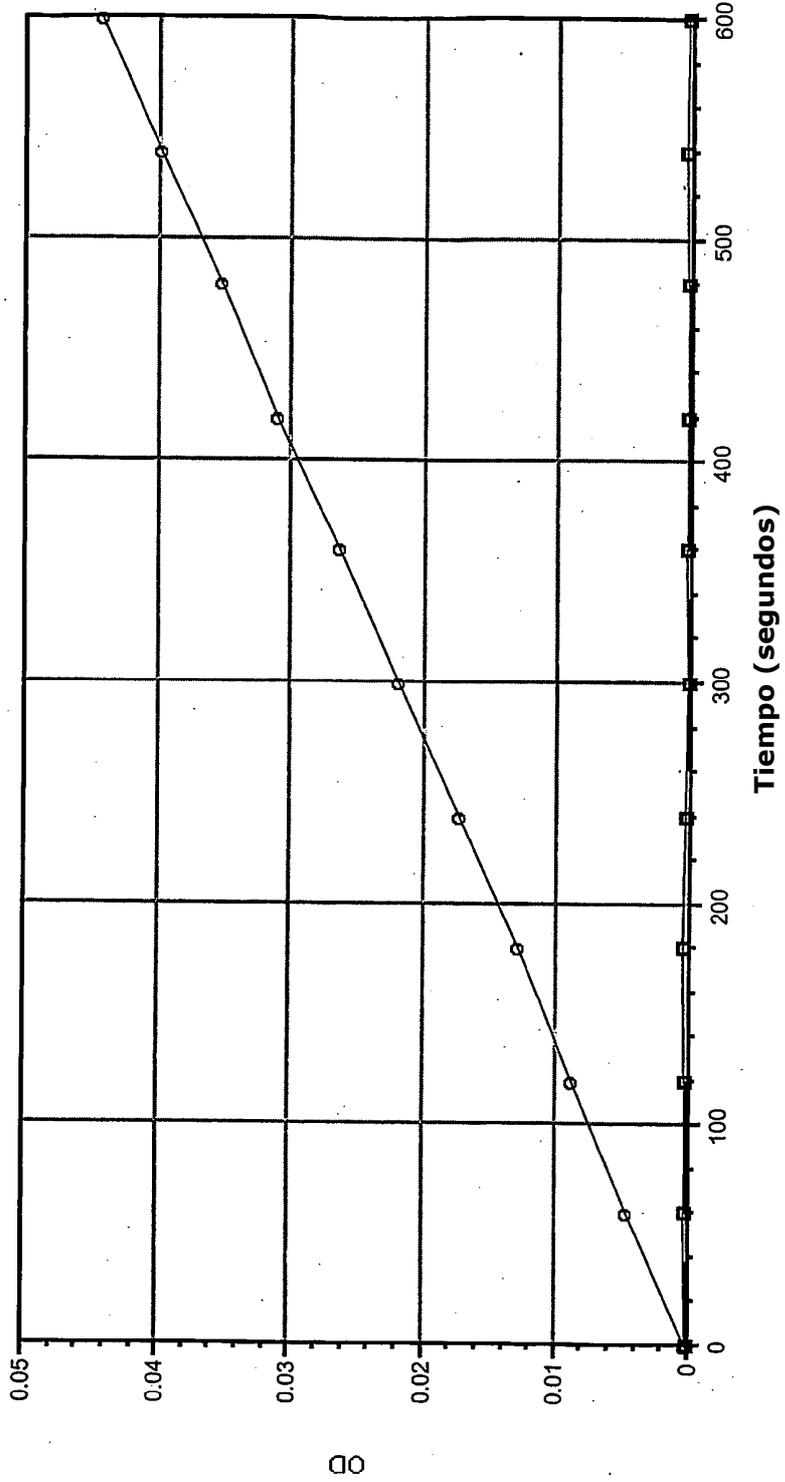


FIG.5: Actividad Lp-PLA2 plasmática en Ensayo HIC-MNP (2c10 como mAb de captura)



- = con sustrato 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)-phosphatidylcholine (MNP)
- = sin sustrato 1-myristoyl-2-(4-nitrophenylsuccinyl)-phosphatidylcholine

**FIG. 6: Actividad Lp-PLA2 plasmática en
Ensayo Comercial TioPAF**

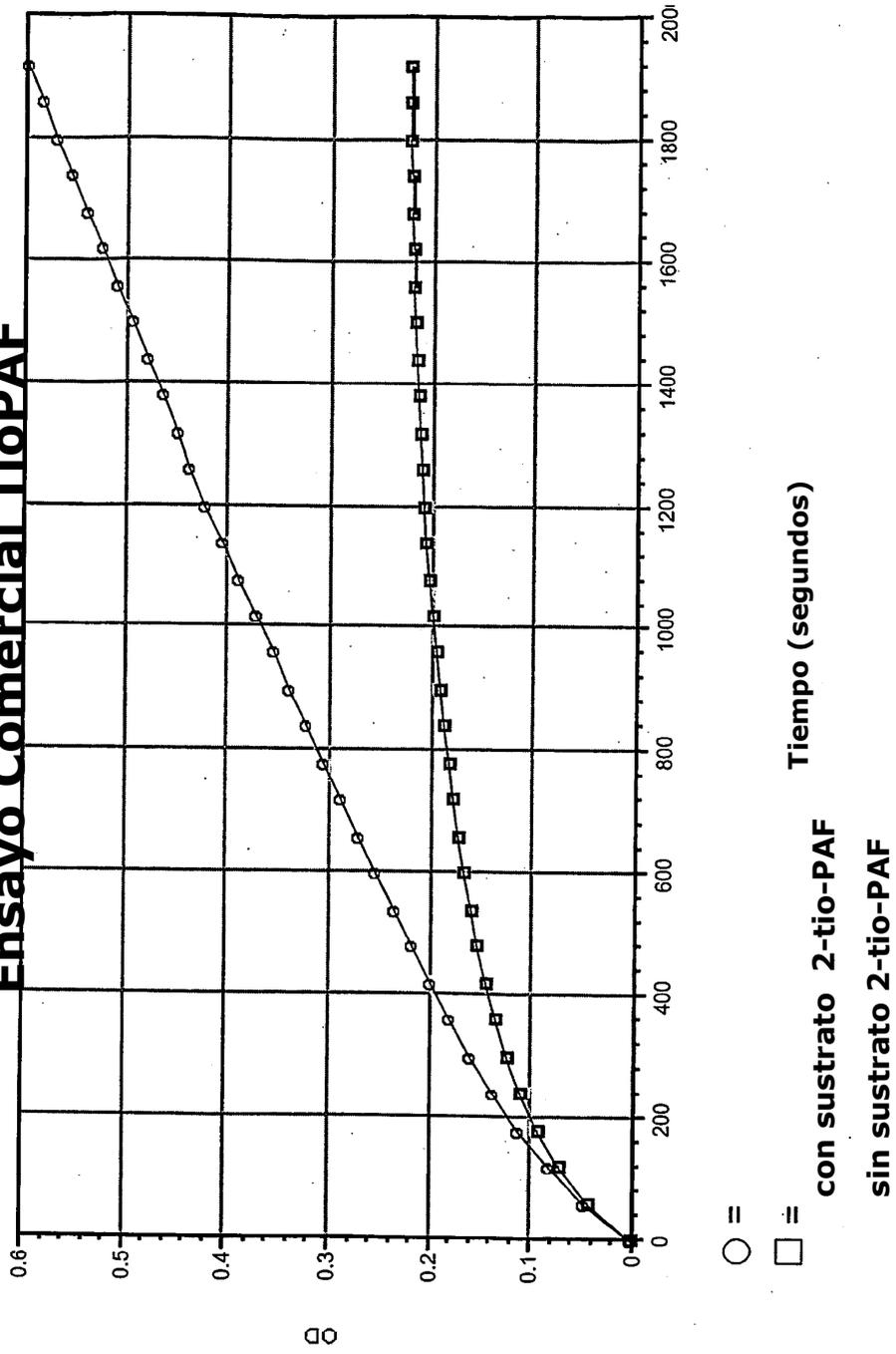


FIG. 7: Fondo de muestra plasmática en Ensayo TioPAF mejorado, con DTNB pero sin sustrato añadido

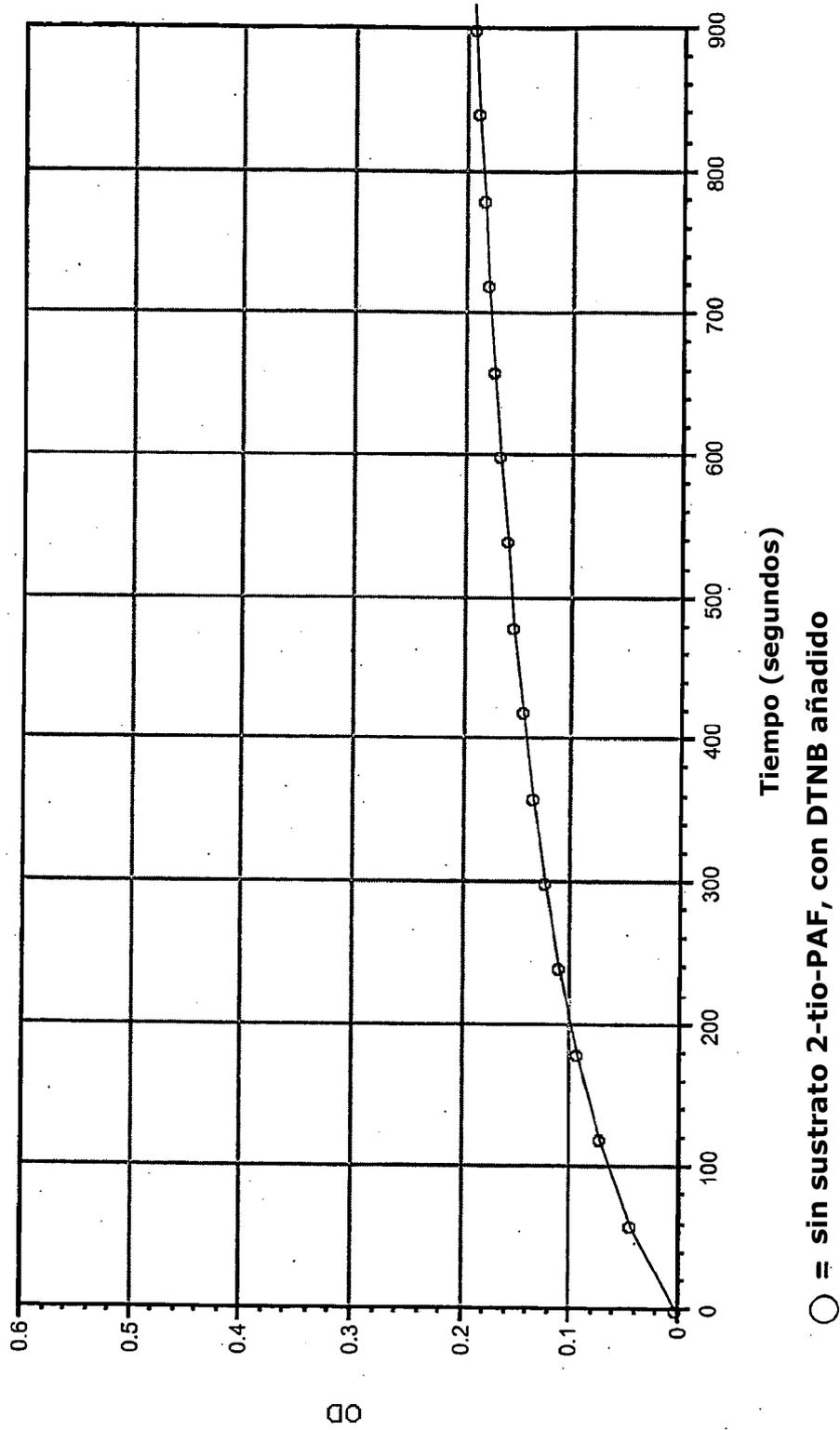


FIG. 8: Actividad Lp-PLA2 plasmática en Ensayo TioPAF mejorado

