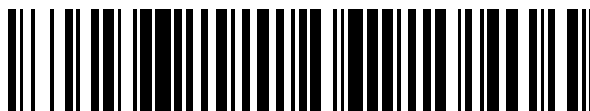


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 528**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/28 (2006.01)

A61K 31/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.01.2002 E 02718773 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1353666**

54 Título: **Mieloperoxidasa, un indicador de riesgo para enfermedad cardiovascular**

30 Prioridad:

02.01.2001 US 259340 P
12.04.2001 US 283432 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.11.2013

73 Titular/es:

THE CLEVELAND CLINIC FOUNDATION (100.0%)
9500 Euclid Avenue
Cleveland, OH 44195, US

72 Inventor/es:

HAZEN, STANLEY y
ZHANG, RENLIANG

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 429 528 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

Mieloperoxidasa, un indicador de riesgo para enfermedad cardiovascular.

- 5 **[0001]** El trabajo descrito en esta solicitud tuvo el apoyo, al menos en parte, de la Concesión N° RO1 HDL62526-01 del National Institutes of Health. El gobierno de Estados Unidos posee ciertos derechos sobre esta invención.

ANTECEDENTES

- 10 **[0002]** La presente invención se refiere al campo de la enfermedad cardiovascular. Más en concreto, se refiere a procedimientos de diagnóstico para determinar si un sujeto individual o de prueba, presenta un riesgo mayor o inferior de desarrollar o presentar enfermedad cardiovascular distinto de otros individuos en una población dada de sujetos humanos.

- 15 **[0003]** Enfermedad cardiovascular (ECV) es el término general aplicado a cardiopatías y enfermedades de los vasos sanguíneos, incluyendo aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica. Los trastornos cardiovasculares son manifestaciones graves de ECV e incluyen infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva. La ECV es responsable de una de cada dos muertes en los Estados Unidos y es la principal enfermedad mortal. Así, la
20 prevención de la enfermedad cardiovascular es un área de gran importancia en la salud pública.

- [0004]** Para prevenir ECV se recomienda una dieta baja en grasas y ejercicio. Además, puede prescribirse una serie de agentes terapéuticos por parte de profesionales médicos a aquellos individuos que, según se sabe, presentan el riesgo de desarrollar o tener ECV. Entre ellos se incluyen agentes de reducción de lípidos que reducen
25 los niveles en sangre de colesterol y triglicéridos. Se usan medicamentos para normalizar la presión arterial en pacientes hipertensos. También pueden prescribirse medicamentos que previenen la activación de plaquetas, tales como aspirina, para pacientes con riesgo de desarrollar ECV. Pueden usarse terapias más agresivas, tal como la administración de múltiples medicamentos, en aquellos individuos que presenten un riesgo elevado. Como las terapias de ECV pueden tener efectos secundarios adversos, es deseable tener pruebas de diagnóstico para
30 identificara aquellos individuos que presenten riesgo, en particular aquellos individuos que presenten un riesgo elevado, de desarrollar o tener ECV.

- [0005]** En la actualidad, se usan varios factores de riesgo entre los profesionales médicos para valorar el riesgo de un individuo de desarrollar ECV y para identificar a individuos que presenten un riesgo elevado. Los principales
35 factores de riesgo de enfermedad cardiovascular incluyen hipertensión, antecedentes familiares de ECV prematura, tabaquismo, altos niveles de colesterol total, bajos niveles de colesterol HDL, obesidad y diabetes. Los principales factores de riesgo de ECV son aditivos, y normalmente se usan en conjunto entre los médicos en un algoritmo de predicción de riesgo para dirigirse a aquellos individuos que tengan la máxima probabilidad de beneficiarse de un tratamiento de ECV. Estos algoritmos consiguen una alta sensibilidad y especificidad para predecir un riesgo del
40 15% de ECV en un plazo de 10 años. Sin embargo, la capacidad de los algoritmos actuales de predecir una mayor probabilidad de desarrollar ECV es limitada. Entre los individuos que no tienen ninguno de los factores de riesgo actuales, el riesgo a 10 años de desarrollar ECV sigue siendo del 2% aproximadamente. Además, se produce un alto número de complicaciones de ECV en individuos con perfiles de riesgo aparentemente bajos o moderados, según se determina usando en la actualidad factores de riesgo conocidos. Así, existe la necesidad de ampliar el
45 algoritmo actual de riesgo cardiovascular para identificar un espectro más amplio de individuos en riesgo de o afectadas por ECV.

- [0006]** El mecanismo de aterosclerosis no se comprende bien. En la última década una diversidad de datos clínicos, patológicos, bioquímicos y genéticos sustentan la noción de que la aterosclerosis es un trastorno
50 inflamatorio crónico. Los reactivos de fase aguda (por ejemplo, proteína C reactiva, proteínas de complemento), marcadores sensibles pero inespecíficos de inflamación, están enriquecidos en estrías grasas y las fases tardías de las lesiones ateroscleróticas. En un reciente ensayo clínico prospectivo, los niveles de plasma de base de proteína C reactiva predecían independientemente riesgo de infarto de miocardio e ictus por primera vez en individuos aparentemente sanos. La patente de Estados Unidos N° 6.040.147 describe procedimientos que usan proteína C
55 reactiva, citocinas y moléculas de adhesión celular para caracterizar el riesgo de un individuo de desarrollar un trastorno cardiovascular. Aunque útiles, estos marcadores pueden encontrarse en la sangre de individuos con inflamación debido a causas distintas de ECV, y así, estos marcadores pueden no ser suficientemente específicos.

- [0007]** Por consiguiente, aún existe la necesidad de pruebas de diagnóstico adicionales para caracterizar un riesgo

en los individuos de desarrollar o de presentar enfermedad cardiovascular. Son especialmente deseables pruebas de diagnóstico que emplean factores de riesgo que son independientes de los factores de riesgo de EAC tradicionales, tales como los niveles de LDL.

5 RESUMEN DE LA INVENCION

- [0008]** La presente invención proporciona nuevos procedimientos de diagnóstico para caracterizar el riesgo de un individuo de desarrollar o presentar enfermedad cardiovascular. Los presentes procedimientos son especialmente útiles para identificar aquellos individuos que necesitan terapias ECV altamente agresivas, así como aquellos individuos que no requieren terapias dirigidas a prevenir ECV. Marquez y col., 1995, J. Bio. Chem., vol. 270, Nº 51, págs. 30434-30440 describen estudios de la cinética y el mecanismo de la oxidación de tirosina y ditirosina por dos intermedios de mieloperoxidasa (MPO), representados MPO-I (el producto de oxidación de dos electrones de la MPO) y MPO-II (el producto de reducción de un electrón de la MPO-I).
- [0009]** Schmitt y col., 1999, Biochemistry, vol. 38, Nº 51, págs. 16904-16915 describen estudios de intermedios de nitración generados por neutrófilos y MPO como catalizadores fisiológicos para la peroxidación lipídica. Los autores indican que la MPO (o neutrófilos activados de forma artificial) provocan la formación de lípidos oxidados, *in vitro*, en condiciones fisiológicas, y en presencia de nitrito. Los autores también informan de que el sistema MPO-nitrito puede producir varios productos de peroxidación lipídica, incluyendo algunos citados en las reivindicaciones en trámite.
- [0010]** Abu-Soud y col., 2000, J. Bio. Chem., vol. 275, Nº 8, págs. 5425-5430 describen estudios sobre los efectos del óxido nítrico (NO) sobre la actividad catalítica de la mieloperoxidasa humana aislada (MPO). Los estudios muestran que el NO de unión a MPO es reversible y se asocia con la modulación bifásica de la actividad catalítica de la peroxidasa clásica (véase la página 5426, columna izquierda, en el mismo).
- [0011]** El documento EP 0 389 381 (Sanofi SA) describe un kit para ensayar las enzimas celulares endógenas (y especialmente la mieloperoxidasa) que son características de una población o subpoblación celular (y especialmente los granulocitos). En resumen, las células se inmovilizan en primer lugar sobre un soporte sólido mediante inmunocaptura, y después las células capturadas se tratan con un sustrato enzimático adecuado. La inmunocaptura se consigue mediante la unión entre uno o más antígenos superficiales de las células, y uno o más anticuerpos monoclonales correspondientes específicos para el antígeno o los antígenos.
- [0012]** Mertens y col., 2001, FASEB J., vol. 15, Nº 5, págs. 2073-2084 se refiere a estudios de la función de LDL y HDL oxidadas en enfermedad cardiovascular. Los autores analizan estudios anteriores que se refieren a MPO y productos de oxidación generados por MPO encontrados en lesiones. Los autores también describen sus propios estudios recientes que se refieren a la circulación de LDL oxidada, en los que presentan el anticuerpo monoclonal contra una forma oxidada de la molécula apoB-100, específicamente, apoB-100 sustituida con aldehído, y el uso del este anticuerpo en ensayos para determinar los niveles de LDL oxidada de circulación. Podrez y col., 2000, J. Clin. Invest., vol. 105, Nº 8, págs. 1095-1108 describen estudios que se refieren al sistema MPO-H₂O₂-NO₂⁻, la función de este sistema en la oxidación de LDL. El estudio identifica los receptores que reconocen las formas de alta captación de LDL nitrada y oxidada mediante macrófagos.
- [0013]** Hong y col., 2002, Hypertension, vol. 38, págs. 1044-1048 describen estudios que se refieren a la función de la tetrahidrobiopterina (H₄B), un cofactor de NO sintasa, en el tratamiento y prevención de la hipertensión. La NO sintasa genera las especies fuertemente oxidantes NO y peroxinitrito, y en el estudio, se detectaron cambios en los niveles de peroxinitrito usando, indirectamente, en ensayo de transferencia de Western para detectar la expresión de nitrotirosina en la arteria torácica.
- [0014]** Los presentes procedimientos de diagnóstico se basan en el descubrimiento de que los pacientes con enfermedad arterial coronaria (EAC) tienen significativamente mayores niveles de leucocitos y niveles de mieloperoxidasa (MPO) en sangre que pacientes sin EAC angiográficamente significativa. También se ha descubierto que los niveles de MPO leucocitaria en EAC y pacientes sin EAC son independientes de la edad, sexo, diabetes, hipertensión, tabaquismo (alguna vez o actualmente), recuento de GB, LDL-C, triglicéridos y puntuación de riesgo global de Framingham. Por lo tanto, los presentes procedimientos de diagnóstico, que implican valorar los niveles de actividad de la MPO, masa de la MPO, o niveles de productos de oxidación generados por MPO seleccionados en una muestra de sangre o derivado de la misma de un sujeto de prueba, proporcionan un valor predictivo de aditivo más allá del observado con factores de riesgo clínicos y diagnósticos empleados actualmente por los especialistas. En la invención, la ECV se selecciona entre aterosclerosis, cardiopatía coronaria, trastorno cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, o un trastorno cardiovascular seleccionado entre infarto de

miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios e insuficiencia cardiaca congestiva.

[0015] En un aspecto, el presente procedimiento de diagnóstico comprende determinar el nivel de actividad de la MPO o masa de la MPO, o ambas, en una muestra corporal de un paciente humano. La muestra corporal es sangre o un derivado de sangre obtenido a partir de dicha sangre seleccionado entre leucocitos, neutrófilos, suero o plasma. Después, el nivel de actividad de la MPO o masa de la MPO, o ambas, en la muestra corporal de un paciente humano se compara con uno o dos valores predeterminados que se obtienen a partir de mediciones de la actividad de la MPO en muestras corporales comparables obtenidas de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos. Dicha comparación caracteriza el riesgo de los sujetos de prueba de desarrollar ECV. Los pacientes humanos cuyos niveles sanguíneos de la actividad de la MPO o masa de la MPO, o ambas, son mayores que el valor predeterminado, tienen un riesgo mayor de desarrollar o presentar ECV que individuos cuyos niveles de la actividad de la MPO en sangre o la masa de la MPO, o ambas, estén en o por debajo del valor predeterminado. Además, la extensión de la diferencia entre los niveles de actividad de la MPO de pacientes humanos, o los niveles de la masa de la MPO, o ambos, y un valor predeterminado, es también útil para caracterizar la extensión del riesgo y, así, determinar que individuos se beneficiarán en mayor medida de ciertas terapias.

[0016] En otro aspecto, el procedimiento de diagnóstico comprende determinar el nivel de uno o más productos de oxidación generados por MPO seleccionados en una muestra corporal obtenida de un paciente humano. Los productos de oxidación generados por MPO seleccionados son ditirosina, nitrotirosina y metionina. También se describe sulfóxido. También se describen productos de peroxidación lipídica generados por MPO. Los productos de peroxidación lipídica de MPO preferidos son ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETE); ácidos hidroxi-octadecadienoicos (HODE); F2Isoprostanos; los monoésteres glutáricos y nonanodioicos de 2-lisoPC (G-PC y ND-PC, respectivamente); el ácido 9-hidroxi-10-dodecenedioico y ésteres del ácido 5-hidroxi-8-oxo-6-octenedioico de 2-lisoPC (HDdiA-PC y HODiA-PC, respectivamente); el ácido 9-hidroxi-12-oxo-10-dodecenoico y ésteres del ácido 5-hidroxi-8-oxo-6-octenoico de 2-lisoPC (HODA-PC y HOOA-PC, respectivamente); el ácido 9-ceto-12-oxo-10-dodecenoico y ésteres del ácido 5-ceto-8-oxo-6-octenoico de 2-lisoPC (KODA-PC y KOOA-PC, respectivamente); el ácido 9-ceto-10-dodecendioico y ésteres del ácido 5-ceto-6-octendioico de 2-lisoPC (KDdiA-PC y KODiA-PC, respectivamente); el ácido 5-oxovalérico y ésteres del ácido 9-oxononanoico de 2-lisoPC (OV-PC y ON-PC, respectivamente); 5-colesten-5 α ,6 α -epoxi-3 β -ol (colesterol α -epóxido); 5-colesten-5 β ,6 β -epoxi-3 β -ol (colesterol β -epóxido); 5-colesten-3 β ,7 β -diol (7-OH-colesterol); 5-colesten-3 β ,25-diols (25-OH colesterol); 5-colesten-3 β -ol-7 β -hidroperóxido (7-OOH colesterol); y colestano-3 β , seleccionado entre 5 α ,6 β -triol (triol). La muestra corporal es sangre, orina o un derivado de sangre, seleccionada entre leucocitos, neutrófilos, monocitos, suero o plasma. Después, los niveles de los productos de oxidación generados por MPO seleccionados en las muestras corporales del paciente humano se comparan con un valor predeterminado que se obtiene a partir de medidas de los productos de oxidación generados por MPO seleccionados en muestras corporales comparables obtenidas de controles sanos. Dicha comparación caracteriza el riesgo del sujeto de prueba de desarrollar una ECV seleccionada entre aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, o un trastorno cardiovascular seleccionado entre infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios e insuficiencia cardiaca congestiva.

[0017] Para aquellos individuos que ya han experimentado un acontecimiento cardiovascular adverso agudo, tal como un infarto de miocardio o ictus isquémico, los presentes procedimientos de diagnóstico son también útiles para valorar dicho riesgo de un individuo de presentar un acontecimiento recurrente. También se describe un procedimiento para controlar con el tiempo el estado de una ECV en un sujeto. El procedimiento comprende determinar los niveles de uno o más de los presentes factores de riesgo, incluyendo la actividad de la MPO, la masa de la MPO, los productos de oxidación generados por MPO seleccionados, y combinaciones de los mismos, en una muestra corporal tomada del sujeto en un momento inicial y en un fluido corporal correspondiente tomado del sujeto en un momento posterior. Un aumento en los niveles de los presentes factores de riesgo del fluido corporal tomado en el momento posterior en comparación con el momento inicial indica que el riesgo de un sujeto de presentar un acontecimiento/trastorno cardiovascular futuro ha aumentado. Un descenso en los niveles de los presentes factores de riesgo del fluido corporal tomado en el momento posterior en comparación con el momento inicial indica que el riesgo del sujeto de presentar un acontecimiento cardiovascular ha descendido.

[0018] En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para evaluar un agente terapéutico para una enfermedad cardiovascular seleccionada entre aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, o un trastorno cardiovascular seleccionado entre infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios e insuficiencia cardiaca congestiva en un sujeto que se sospecha que tiene, o que tiene, una enfermedad cardiovascular. El procedimiento comprende comparar los niveles de uno o más de los presentes factores de riesgo, incluyendo la actividad de la MPO, la masa de la MPO, los

productos de oxidación generados por MPO seleccionados, y combinaciones de los mismos, en una muestra corporal seleccionada entre sangre, un derivado de sangre seleccionado entre leucocitos, neutrófilos, monocitos, suero y plasma, u orina tomada del sujeto antes de la terapia y un fluido corporal correspondiente tomado de la orina del sujeto durante o después de la terapia. Un descenso en el nivel del factor de riesgo seleccionado en la muestra tomada después o durante la terapia en comparación con el nivel del factor de riesgo seleccionado en la muestra tomada antes de la terapia es indicativo de un efecto positivo de la terapia sobre la enfermedad cardiovascular en el sujeto tratado. El uno o más productos de oxidación generados por MPO seleccionados se seleccionan entre ditirosina libre, ditirosina unida a péptido, nitrotirosina libre, nitrotirosina unida a péptido, sulfóxido de metionina libre y sulfóxido de metionina unido a péptido.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0019]

15 Figura 1. Un modelo cinético para mieloperoxidasa.

Figura 2. Una representación esquemática de ciertos intermediarios reactivos generados por mieloperoxidasa y algunos productos de oxidación generados por MPO.

20 Figura 3. La estructura química de ditirosina y nitrotirosina.

Figura 4. Peroxidación Lipídica en Plasma con Neutrófilos de Sujetos Sanos y Sujetos con Deficiencia de MPO. Se incubaron neutrófilos (1×10^6 /ml) aislados de individuos normales y con deficiencia de MPO a 37 °C en HBSS suplementado con DTPA (100 μ M, pH 7,0) y plasma humano fresco (50% v/v). Las células se activaron mediante la adición de acetato de forbol miristato (PMA, 200 nM) y se incubaron durante 2 h (Sistema Completo). Después, el contenido de 9-H(P)ODE y 9-H(P) ETE formado en los lípidos plasmáticos endógenos se determinó por CL/IEN/EM/EM. Cuando se indicó, se añadió MPO humana (30 nM) a las mezclas de reacción. Los datos representan la media $\pm$ DT de determinaciones por triplicado. Cada barra dentro de un grupo para una condición determinada representa los resultados obtenidos de experimentos independientes realizados con preparaciones de neutrófilos de un donante distinto. LPN(MPO+), neutrófilos aislados de sujetos normales; LPN(MPO-), neutrófilos aislados de sujetos con deficiencia de MPO.

Figura 5. Caracterización del inicio dependiente de neutrófilos de la peroxidación lipídica de lípidos plasmáticos endógenos. Se incubaron neutrófilos (1×10^6 /ml) aislados de sujetos normales (LPN) a 37 °C en HBSS suplementado con DTPA (100 μ M, pH 7,0) y plasma humano fresco (50% v/v). Las células se activaron mediante la adición de acetato de forbol miristato (PMA, 200 nM) y después se incubaron durante 2 h (Sistema Completo). Después, el contenido de 9-H(P)ODE y 9-H(P)ETE formado de los lípidos plasmáticos endógenos se determinó por CL/IEN/EM/EM. Las adiciones o deleciones para el Sistema Completo fueron como se indicó. Las concentraciones finales de adicionales al Sistema Completo fueron MPO humana 30 nM, NaN_3 1 mM, catalasa (Cat) 300 nM, catalasa inactivada por calor (hiCat) 300 nM, metionina (Met) 100 μ M, ascorbato 100 μ M y 10 μ g/ml de superóxido dismutasa (SOD). Los datos representan la media $\pm$ DT de tres experimentos independientes.

Figura 6. Caracterización del inicio dependiente de la MPO de la peroxidación lipídica de lípidos plasmáticos endógenos. Se incubó plasma humano fresco (50%, v/v) con MPO humana aislada (30 nM) a 37 °C en HBSS suplementado con DTPA (100 μ M, pH 7,0) y un sistema de generación de H_2O_2 comprendido por glucosa/glucosa oxidasa (G/GO) durante 12 h (Sistema Completo). En esta condición, se forma un flujo continuo de H_2O_2 a 10 μ M/h. Después, se determinó el contenido de 9-H(P)ODE y 9-H(P)ETE formado en los lípidos plasmáticos endógenos por CL/IEN/EM/EM. Las adiciones o deleciones para el Sistema Completo fueron como se indicó. Las concentraciones finales de adicionales al Sistema Completo fueron NaN_3 1 mM, catalasa (Cat) 300 nM, catalasa inactivada por calor (hiCat) 300 nM, SOD 200 nM, metionina (Met) 100 μ M y ascorbato 100 μ M. Los datos representan la media $\pm$ DT de tres experimentos independientes.

Figura 7. Las especies de fosfatidil colina oxidada generadas por oxidación de la MPO de LDL se enriquecen en las lesiones ateroscleróticas. El contenido de las especies de PC oxidada indicadas se determinó en la LDL nativa y LDL oxidada por el sistema MPO- H_2O_2 - NO_2 (NO_2 -LDL) usando CL/IEN/EM/EM. Los datos representan la media $\pm$ D.T. de determinaciones por triplicado de un experimento representativo realizado dos veces. El contenido de PAPC en preparaciones de LDL y NO_2 -LDL fue de $0,122 \pm 0,07$ y $0,008 \pm 0,001$ μ mol/mg de apoproteína, respectivamente. El contenido de PLPC en preparaciones de LDL y NO_2 -LD fue de $0,88 \pm 0,05$ y $0,35 \pm 0,05$ μ mol/mg de apoproteína,

respectivamente. La aorta torácica de Conejos Watanabe con Hiperlipidemia Hereditaria se aisló, se aclaró en PBS rociado con argón suplementado con BHT 100 μ M y DTPA 100 μ M, se sumergió en el mismo tampón, se cubrió con argón, se ultracongeló en nitrógeno líquido y después se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Se obtuvieron aortas relativamente libres de lesiones lipídicas de conejos WHHL de 10-12 semanas de edad, mientras que se recuperaron aortas con lesiones confluentes de conejos WHHL de >6 meses de edad. Las aortas individuales se pulverizaron con mortero y mazo de acero inoxidable en nitrógeno líquido, el polvo se transfirió a tubos de ensayo de vidrio tapados a rosca equipados con tapones revestidos de PTFE, y después los lípidos se extrajeron mediante el procedimiento de Bligh y Dyer en una atmósfera de argón en presencia de BHT. Se analizaron tres aortas en cada grupo. Después, se realizó la cuantificación de lípidos por CL/IEN/EM/EM. Los datos se expresaron como la media $\pm$ D.T.

Figura 8. Contenido de lípidos oxidados generados por MPO seleccionados en el material de la placa aterosclerótica de pacientes humanos y íntima aórtica normal de donantes de trasplante de corazón.

Figura 9. El contenido de MPO en leucocitos aislados (MPO Leucocitaria) y por ml de sangre (MPO en sangre) se determinó en 333 sujetos (158 con una enfermedad arterial coronaria conocida y 175 sin EAC angiográficamente significativa) como se describe en "Procedimientos". Se muestran gráficas de Box-whisker de los niveles de MPO frente al estado de la EAC. Las cajas incluyen los percentiles 25 a 75. Las líneas dentro de las cajas representan valores medios. Las barras representan los percentiles 2,5 y 97,5. RAN, recuento absoluto de neutrófilos; EAC, enfermedad arterial coronaria; LPN, leucocito polimorfonuclear.

Figura 10. Modelo 1 - Índices de probabilidades ajustados para los factores de riesgo significativos siguiendo un ajuste univariado: edad, género, hipertensión, historial de tabaquismo, HDLc, cuartil de GB y cuartil de MPO. Modelo 2 - Índices de probabilidades ajustados para valoración Global del Riesgo de Framingham, cuartil de GB y MPO. Círculos cerrados, índices de probabilidades sin ajustar. Triángulos cerrados, Modelo 1. Cuadrados cerrados, Modelo 2.

Figura 11. Citograma de GB de un individuo cuyo nivel de MPO por neutrófilo está por debajo de la media en una población (panel izquierdo), y un individuo cuyo nivel de MPO por neutrófilo está por encima de la media en una población (panel derecho).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0020] La presente invención proporciona procedimientos de diagnóstico para caracterizar el riesgo de un individuo de desarrollar o presentar una ECV. En un aspecto, el procedimiento comprende obtener el nivel de actividad de la MPO o masa de la MPO, o ambas, en una muestra corporal del individuo. En otro aspecto, el procedimiento comprende obtener el nivel de uno o más productos de oxidación generados por MPO seleccionados en una muestra corporal del individuo. Dichos productos de oxidación generados por MPO se seleccionan entre el grupo que consiste en ditirosina, nitrotirosina y sulfóxido de metionina. En otro aspecto más, el procedimiento comprende obtener el nivel de actividad de la MPO, o masa de la MPO, o ambas, y el nivel de uno o más productos de oxidación generados por MPO seleccionados en una muestra corporal obtenida del individuo.

[0021] Después, el nivel de actividad de la MPO, o masa de la MPO, o el producto de oxidación generado por MPO seleccionado en la muestra corporal del individuo se compara con un valor predeterminado para proporcionar un valor de riesgo que caracteriza el riesgo del individuo de desarrollar o presentar una ECV.

[0022] También se describen kits que comprenden ensayos para la actividad o la masa de la MPO, o el producto de oxidación generado por MPO seleccionado. Dichos ensayos tienen una sensibilidad apropiada con respecto a valores predeterminados seleccionados en base a los presentes ensayos de diagnóstico. Los kits difieren de los disponibles actualmente en el mercado para la MPO por incluir, por ejemplo, diferentes puntos de corte, diferentes sensibilidades en puntos de corte particulares, así como instrucciones u otro material impreso para caracterizar el riesgo en base al resultado del ensayo.

Preparación de la Muestra Corporal

[0023] Se obtiene sangre completa a partir del individuo o sujeto de prueba usando procedimientos clínicos convencionales. El plasma se obtiene a partir de muestras de sangre completa mediante la centrifugación de sangre anticoagulada. Dicho proceso proporciona una capa leucocitaria de componentes de glóbulos blancos y un sobrenadante del plasma.

[0024] Se recoge suero mediante la centrifugación de muestras de glóbulos rojos que se han recogido en tubos que no tienen anti-coagulante. Se permite que la sangre se coagule antes de la centrifugación. El fluido amarillento-rojizo que se obtiene por centrifugación es el suero.

5

[0025] Los leucocitos pueden aislarse a partir de muestras de sangre completa mediante cualquiera de las diversas técnicas que incluyen la centrifugación por gradiente de densidad como se describe en los ejemplos que se indican más adelante.

10 Mieloperoxidasa y Productos de Oxidación Generados por Mieloperoxidasa

[0026] La MPO (donante: peróxido ácido, óxido-reductasa, EC 1.11.1.7) es una proteína hemo tetramérica altamente glucosilada básica (Pl. 10) de aproximadamente 150 kDa. Está formada de dos promotores ligados a disulfuro idénticos, cada uno de los cuales posee una subunidad pesada de 59-64 kDa que contiene protoporfirina y una subunidad ligera de 14 kDa (Nauseef, W. M. y col., Blood 67: 1504-1507; 1986.)

[0027] MPO es abundante en neutrófilos y monocitos, y supone el 5%, y del 1 al 2%, respectivamente, del peso seco de estas células (Nauseef, W. M. y col., Blood 67: 1504-1507; 1986., (Hurst, J. K. En: Everse J.; Everse K.; Grisham M. B., eds. Peroxidases in chemistry and biology, 1ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1991: 37-62). La proteína hemo se almacena en gránulos azurófilos primarios de leucocitos y se secreta tanto en el medio extracelular como el compartimento fagolisosomal después de la activación de fagocitos mediante una diversidad de agonistas (Klebanoff, S. J. y col. The neutrophil: functions and clinical disorders. Ámsterdam: Elsevier Scientific Publishing Co.; 1978). Los procedimientos inmunohistoquímicos han demostrado que la MPO está presente en lesiones ateroscleróticas humanas. Sin embargo, todavía no se ha mostrado que la MPO esté presente en niveles aumentados en muestras de sangre de individuos con aterosclerosis.

[0028] En la figura 1 se muestra un modelo cinético de trabajo propuesto recientemente para MPO. MPO es una proteína hemo compleja que posee múltiples estados intermedios, en cada uno de los cuales influye la disponibilidad de especies de oxígeno reducidas, tales como O_2^- y H_2O_2 , y óxido nítrico (NO, monóxido de nitrógeno) (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000). En estado fundamental, MPO existe en la forma férrica (Fe(III)). Tras la adición de H_2O_2 , el grupo hemo de MPO se oxida mediante dos e^- equivalentes que forman un catión π ferrilo reactivo intermedio denominado Compuesto I. En presencia de haluros como Cl^- , Br^- e I^- , y el pseudohaluro tiocianato (SCN^-), el Compuesto I se reduce fácilmente en una etapa única de dos e^- , regenerando MPO-Fe(III) y el ácido hidroxaloso correspondiente (HOX). En niveles de plasma de haluros y tiocianato (Cl^- 100 mM, Br^- 100 mM, SCN^- 50 mM, r 100 nM, cloruro es un sustrato preferido y se forma ácido hipocloroso (HOCl), un potente oxidante de cloración (Foote, C. S. y col.; Nature 301: 715-726; 1983., Weiss, S. J., y col., J. Clin. Invest. 70: 598-607; 1982).

[0029] El compuesto I también puede oxidar numerosos sustratos orgánicos mientras el hemo experimenta dos etapas secuenciales de reducción de e^- para generar el compuesto II y MPO-Fe(III), respectivamente (figura 12). Los compuestos de bajo peso molecular sirven principalmente como sustratos para MPO, generando oxidantes que pueden difundirse y especies de radicales libres que pueden transportar seguidamente el potencial oxidante del hemo a dianas distantes. Además de haluros y SCN^- , algunos de los sustratos de origen natural para MPO incluyen nitrito (NO_2^-) (van der Vliet, A., y col., J. Biol. Chem. 272: 7617-7625; 1997), tirosina (van der Vliet, A., y col., J. Biol. Chem. 272: 7617-7625; 1997), ascorbato (Marquez, L. A., y col., J. Biol. Chem. 265: 5666-5670; 1990), urato (Maehly, H. C. Methods Enzymol. 2: 798-801; 1955), catecolaminas (Metodiowa, D., y col., Eur. J. Biochem. 193: 445-448; 1990), estrógenos (Klebanoff, S. J. J. Exp. Med. 145: 983-998; 1977), y serotonina (Svensson, B. E. Chem. Biol. Interact. 70: 305-321; 1989). MPO-Fe(III) puede reducirse también a una forma ferrosa inactiva, MPO-Fe(II) (Hurst, J. K. En: Everse J.; Everse K.; Grisham M. B., eds. Peroxidases in chemistry and biology 1ª ed. Boca Raton: CRC Press; 1991: 37-62., (Kettle, A. J., y col., Redox. Rep. 3: 3-15; 1997). MPO-Fe(III) y MPO-Fe(II) se unen a O_2^- , y O_2 , respectivamente, para formar un producto intermedio dioxi ferroso, el compuesto III (MPO-Fe(II)- O_2) (figura 12). Los estudios espectrales muestran que la adición de H_2O_2 al Compuesto III forma en última instancia el compuesto II. Así, el compuesto III puede promover indirectamente reacciones de peroxidación e^- .

[0030] Estudios recientes identifican una función para NO, un radical libre de vida relativamente larga generado por la óxido nítrico sintasa (NOS), en la modulación de la actividad MPO peroxidasa (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000). MPO y la isoforma inducible de NOS se colocan en el gránulo primario de los leucocitos. Durante la activación de fagocitos, por ejemplo durante la ingestión de bacterias, MPO y NOS son secretados en el fagolisosoma y compartimentos extracelulares, y se observa nitración de proteínas bacterianas (Evans, T. J., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 9553-9558; 1996). Estudios de cinética rápida muestran que para

bajos niveles de NO, la velocidad inicial de peroxidación catalizada por MPO de sustratos se mejora. El mecanismo consiste en la aceleración de la etapa de limitación de velocidad en la catálisis de MPO, la reducción de compuesto II a MPO-Fe(III) (figura 1) (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000, Abu-Soud, H. M., y col. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian animal peroxidases. Presentado; 2000). A niveles superiores de NO, tiene lugar una inhibición reversible de MPO a través de la formación de un complejo de nitrosilo espectroscópicamente distinguible, MPO-Fe(III)-NO (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000). NO también puede servir como un sustrato para compuesto I de MPO, lo que produce su reducción a Compuesto II (Abu-Soud, H. M., y col. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian animal peroxidases. Presentado; 2000). Además, en presencia de NO, la velocidad global de conversión de MPO a través del ciclo de la peroxidasa se potencia casi 1.000 veces (Abu-Soud, H. M., y col. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian animal peroxidases. Presentado; 2000). Finalmente, NO también se une de forma reversible a MPOFe(II) para formar el producto intermedio MPO-Fe(II)-NO correspondiente, que está en equilibrio con MPO-Fe(II) y MPO-Fe(III)-NO (figura 1) (Abu-Soud, H. M., y col., J. Biol. Chem. 275: 5425-5430; 2000., Abu-Soud, H. M., y col. Nitric oxide is a physiological substrate for mammalian animal peroxidases. Presentado; 2000).

[0031] Como se ha descrito anteriormente, MPO puede utilizar una diversidad de cosustratos con H₂O₂ para generar oxidantes reactivos como productos intermedios. Muchos productos finales estables generados por estas especies han sido caracterizados y muestran estar enriquecidos en proteínas, lípidos y LDL recuperados de lesiones ateroscleróticas humanas (Chisolm, G. M., y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11452-11456; 1994, Hazell, L. J., y col., J. Clin. Invest. 97: 1535-1544; 1996, Hazen, S. L., y col., J. Clin. Invest. 99: 2075-2081; 1997, Leeuwenburgh, C., y col., J. Biol. Chem. 272: 1433-1436; 1997, Leeuwenburgh, C., y col., J. Biol. Chem. 272: 3520-3526; 1997). La figura 2 resume algunos de los productos intermedios reactivos y los productos formados por MPO, cualquiera de los cuales se sabe que están enriquecidos en lesiones vasculares.

25 Procedimientos para Determinar la Actividad de la MPO

[0032] La actividad de la mieloperoxidasa puede determinarse mediante cualquiera de una diversidad de procedimientos convencionales conocidos en la técnica. Un procedimiento de este tipo es un ensayo basado en colorimetría donde un cromóforo que sirve como sustrato para la peroxidasa genera un producto con una longitud de onda característica que puede ir seguido de cualquier de diversos procedimientos espectroscópicos, incluyendo detección UV-visible o de fluorescencia. Pueden encontrarse detalles adicionales sobre ensayos basados en colorimetría en Kettle, A.J. y Winterbourn, C.C. (1994) Methods in Enzymology. 233: 502-512; y Klebanoff, S.J., Waltersdorff, A.N. y Rosen, H. (1984) Methods in Enzymology. 105: 399-403. Un artículo de Gerber, Claudia, E. y col., titulado "Phagocytic Activity and Oxidative Burst of Granulocytes in Persons with Myeloperoxidase Deficiency", publicado en 1996 en Eur. J. Clin. Chem Clin Biochem 34: 901-908, describe un procedimiento para el aislamiento de leucocitos polimorfonucleares (es decir neutrófilos) y la medición de la actividad de la mieloperoxidasa con un ensayo colorimétrico, que implica la oxidación del cromógeno 4-cloro-1-naftol.

[0033] La actividad de la peroxidasa puede determinarse mediante tinción de la peroxidasa *in situ* en células que contienen MPO con procedimientos basados en citometría de flujo. Dichos procedimientos permiten un rastreo de alto rendimiento de determinaciones de la actividad de la peroxidasa en los leucocitos y subpoblaciones de leucocitos. Un ejemplo es la tinción citoquímica de la peroxidasa usada para generar un recuento de glóbulos blancos y diferenciales con analizadores hematológicos en base a procedimientos de tinción de la peroxidasa. Por ejemplo, el sistema hematológico Advia 120 de Bayer analiza sangre completa por citometría de flujo y realiza la tinción de la peroxidasa de glóbulos blancos para obtener un recuento de glóbulos blancos total (RGB) y para diferenciar entre los diversos grupos de glóbulos blancos.

[0034] Con estos procedimientos, la sangre entera se introduce en el instrumento y los glóbulos rojos se lisan en una cámara de lisis. Después, los glóbulos blancos restantes se fijan y se tiñen *in situ* para determinar la actividad de la peroxidasa. Las células teñidas se canalizan hasta el citómetro de flujo para su caracterización en base a la intensidad de la tinción de la peroxidasa y el tamaño global de la célula, que se refleja en la cantidad de dispersión de la luz de una célula determinada. Estos dos parámetros se representan gráficamente en el eje x y el eje y, respectivamente, mediante un software de citometría de flujo convencional, y se observan fácilmente grupos de poblaciones celulares individuales. Estos incluyen, pero sin limitación, neutrófilos, monocitos y eosinófilos, las tres poblaciones de leucocitos principales que contienen una tinción visible de la peroxidasa.

[0035] Durante el transcurso de estos análisis, los leucocitos, tales como monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos, se identifican por la intensidad de la tinción de la peroxidasa y su tamaño global. Por lo tanto, la información acerca de la tinción de la actividad de la peroxidasa global en poblaciones celulares específicas es

inherente en la posición de los grupos celulares individuales (por ejemplo, grupos de neutrófilos, monocitos, eosinófilos) y pueden determinarse los niveles de peroxidasa en las poblaciones celulares específicas. La actividad/tinción de la peroxidasa en este procedimiento de detección se compara con una referencia o calibrador de la tinción de la peroxidasa. Se identifican individuos con mayores niveles de la actividad de la peroxidasa por leucocito teniendo una población celular cuya ubicación en el citograma indica mayores niveles de peroxidasa (es decir, actividad de la peroxidasa media por leucocito) o demostrando una subpoblación de células dentro de un grupo celular (por ejemplo, grupos de neutrófilos, monocitos o eosinófilos) que contienen mayores niveles de actividad de la peroxidasa en un promedio o en un subgrupo superior, tal como el tercil o el cuartil superior.

10 Procedimientos para Determinar la Masa de la MPO

[0036] La masa de la mieloperoxidasa en una muestra dada se determina fácilmente mediante un procedimiento inmunológico, por ejemplo, están disponibles los kits comerciales ELISA para la cuantificación de la MPO mediante ELISA.

15

[0037] La masa de la MPO en una muestra también puede determinarse de forma indirecta mediante tinción de la peroxidasa *in situ* de la muestra corporal. Pueden realizarse procedimientos que analizan la tinción de la peroxidasa leucocitaria en sangre completa, tales como aquellos con analizadores hematológicos que funcionan en base a una tinción de la peroxidasa *in situ*. Estudios anteriores de otros investigadores han demostrado que la intensidad global de la tinción es proporcionar a la masa de la peroxidasa (por ejemplo, Claudia E. Gerber, Selim Kuci, Matthias Zipfel, Ditrich Niethammer y Gemot Bruchfelt, "Phagocytic activity and phagocytic activity and oxidative burst of granulocytes in persons with myeloperoxidase deficiency" European Journal of Clinical Chemistry and Clinic Biochemistry (1996) 34: 901-908).

20

[0038] La citometría de flujo a través de un analizador hematológico es una técnica de alto rendimiento para cuantificar los parámetros usados en la determinación de los niveles de la actividad o masa de la MPO o el número de células que contienen niveles elevados de la actividad o masa de la MPO. La ventaja de usar una técnica de este tipo es su facilidad de uso y su velocidad. El Advia 120 puede realizar 120 recuentos y diferenciales de células sanguíneas completos en una hora y utiliza sólo unos pocos microlitros de sangre a la vez. Todos los datos necesarios para la determinación de la actividad de la peroxidasa se mantienen dentro de los grupos de células de citometría de flujo usados para calcular por último el recuento y diferencial de glóbulos blancos totales. Con ajustes menores al software de este aparato, la lectura puede modificarse para incluir múltiples índices diferentes de actividad de la peroxidasa total. Por ejemplo, los individuos cuyos grupos de neutrófilos contienen un aumento global en la actividad de la peroxidasa media (es decir, un aumento del índice medio de peroxidasa) tendrán un aumento del riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular. Además de determinar simplemente la actividad media de la peroxidasa para un tipo de célula determinada, los individuos con un aumento del riesgo de desarrollar ECV pueden identificarse examinando la distribución global de la actividad de la peroxidasa dentro de un grupo celular determinado (media + modo, etc.). Se espera que observando la población de actividad de la peroxidasa por leucocito, los individuos que poseen leucocitos con una mayor proporción de células que contienen una actividad de la peroxidasa alta en un subconjunto de células (por ejemplo, el cuartil superior, o el tercil superior) puedan estar en un riesgo particularmente alto.

40

Niveles de la Actividad de la MPO y Masa de la MPO

[0039] El nivel de actividad de la MPO, o masa de la MPO, en el fluido corporal puede determinarse midiendo la actividad de la MPO o la masa de la MPO en el fluido corporal y normalizando este valor para obtener la actividad o masa de la MPO por ml de sangre, por ml de suero, por ml de plasma, por leucocito (por ejemplo neutrófilo o monocito), por peso, por ejemplo mg de proteína sanguínea total, por peso de proteína leucocitaria (por ejemplo por peso de proteína de neutrófilo o monocito). Como alternativa, el nivel de actividad de la MPO o masa de la MPO en el fluido corporal puede ser un valor representativo que se basa en la actividad de la MPO en la sangre o derivados sanguíneos de los sujetos de prueba. Por ejemplo, el nivel de la actividad de la MPO puede ser el porcentaje o número real de los neutrófilos o monocitos del sujeto de prueba que contienen elevados niveles de la actividad de la MPO o masa de la MPO. Los ejemplos de otros valores representativos incluyen, pero sin limitación, unidades arbitrarias para un parámetro que puede obtenerse a partir de un citograma basado en citometría de flujo, tal como la posición del grupo de neutrófilos en los ejes X e Y, o el ángulo del eje principal del grupo de neutrófilos con respecto a los ejes X e Y.

55

Productos de Oxidación Generados por Mieloperoxidasa

Función de la MPO en la Generación de HETE y HODE y Ésteres de Colesterol Oxidados

[0040] Recientemente se ha cuestionado una función de la MPO en la oxidación de LDL y el inicio de la peroxidación lipídica por varios investigadores. Noguchi y col. examinaron la capacidad de los leucocitos aislados de ratones con genes inactivados sin tratar y de MPO para promover la oxidación de LDL en sistemas modelo *ex vivo* y observaron únicamente modestas diferencias en los parámetros en la oxidación lipídica controlada (Noguchi N, y col. J. Biochem. (Tokio) 2000; 127: 971-976). También se ha sugerido recientemente que se inhibe la oxidación catalizada por MPO de LDL, en lugar de promoverse, por la presencia de NO_2^- , particularmente cuando se enfoca en productos de oxidación de proteínas. (Carr AC, y col. J. Biol. Chem. 2001; 276: 1822-1828). Además, se ha propuesto un antioxidante en lugar de una función prooxidante para productos de oxidación de tirosina mediada por MPO y la oxidación de LDL. (Santanam N., y col. J. Clin. Invest 1995; 95: 2594-2600, Exner M. y col., FEBS Lett. 2001; 490: 28-31). También se ha sugerido por algunos investigadores que el HOCl generado por la MPO puede promover la oxidación de lípidos de lipoproteínas y la formación de hidroxiperoxidos (Panassenko OM., Biofactors 1997; 6: 181-190), mientras que otros estudios no han apoyado estas observaciones (Schmitt D, y col., Biochem. 1999; 38: 16904-16915, Hazen SL, y col., Circ.Res. 1999; 85: 950-958). Finalmente, estudios recientes han apreciado especies diferentes entre los leucocitos murinos y humanos con respecto a la MPO y la generación de especies oxidantes reactivas (Xie QW, y col., Biological oxidants: generation and injurious consequences. San Diego, California, USA, Academic Press, 1992, Rausch PG, y col., Blood 1975; 46: 913-919, Nauseef WM., J. Clin. Invest 2001; 107: 401-403, Brennan ML, y col. J. Clin. Invest 2001; 107: 419-430).

[0041] Para determinar la función de la MPO en el fomento de la oxidación lipídica en plasma, se incubaron neutrófilos activados de sujetos sanos y sujetos con una deficiencia de mieloperoxidasa con plasma completo (50%, v/v) y niveles fisiológicos de Cl^- (final 100 mM). Los fagocitos se activaron con PMA y la formación de productos de oxidación específicos de ácidos linoleicos y araquidónicos, respectivamente, se determinó por CL/IEN/EM/EM.

Aislamiento de la MPO y lipoproteínas

[0042] La MPO (donante: peróxido ácido, óxido-reductasa, EC 1.11.1.7) se aisló y se caracterizó como se describe (Heinecke JW, y col., J. Biol. Chem. 1993; 268: 4069-4077, Wu W, y col., Biochemistry 1999; 38: 3538-3548). La pureza de la MPO aislada se estableció demostrando una $R/Z \geq 0,85$ (A_{430}/A_{280}), análisis SDS PAGE con tinción azul Coomassie, y tinción de tetrametilbencidina peroxidasa en gel para confirmar que no había contaminación con peroxidasa de eosinófilos (Wu W, y col., Biochemistry 1999; 38: 3538-3548). La MPO purificada se almacenó en glicerol al 50% a -20°C . La concentración enzimática se determinó por espectrofotometría ($\epsilon_{430} = 170.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (Odajima T, y col. Biochim. Biophys. Acta. 1970; 71-77). La LDL se aisló de plasma fresco mediante ultracentrifugación secuencial como una fracción de $1,019 < d < 1,063 \text{ g/ml}$ con diálisis realizada en frascos cerrados herméticamente en una atmósfera de argón (Hatch FT. Adv. Lipid Res. 1968; 6: 1-68). Las preparaciones finales se mantuvieron en fosfato sódico 50 mM (pH 7,0), DTPA 100 μM y se almacenaron en una atmósfera de N_2 hasta su uso. Las concentraciones de LDL se expresan por mg de proteína de LDL.

Preparaciones de neutrófilos humanos

[0043] Se aislaron neutrófilos humanos de sangre completa obtenida de sujetos normales y con deficiencia de MPO, como se describe (Hazen SL, y col., J. Biol. Chem. 1996; 271: 1861-1867). Las preparaciones de neutrófilos se suspendieron en HBSS (Mg^{2+} , Ca^{2+} , libre de fenol y bicarbonato, pH 7,0) y se usaron inmediatamente para los experimentos.

Reacción de peroxidación lipídica

[0044] Los neutrófilos humanos aislados ($10^6/\text{ml}$) se incubaron a 37°C con plasma humano normal al 50% (v/v) o LDL humana aislada (0,2 mg/ml) en una atmósfera de aire en HBSS suplementado con DTPA 100 μM . Los neutrófilos se activaron añadiendo acetato de forbol miristato 200 nM (PMA) y se mantuvieron en suspensión mediante mezcla suave cada 5 min. Después de 2 h, las reacciones se detuvieron mediante inmersión en un baño de hielo/agua, centrifugación a 4°C y la adición inmediata de hidroxitolueno butilado 50 μM (BHT) y catalasa 300 μM al sobrenadante. Después, los productos de peroxidación lipídica en el sobrenadante se sometieron a ensayo rápidamente como se describe a continuación.

[0045] Las reacciones con MPO aislada se realizaron típicamente a 37°C en tampón fosfato sódico (20 mM, pH 7,0) suplementado con DTPA 100 μM usando MPO 30 nM, glucosa 1 mM (G), 20 ng/ml de glucosa oxidasa (GO). En esta condición, se generó un flujo constante de H_2O_2 (0,18 $\mu\text{M}/\text{min}$) por el sistema de glucosa/glucosa oxidasa

(G/GO). A menos que se indique otra cosa, las reacciones se terminaron por inmersión en un baño de hielo/agua y una adición de tanto BHT 50 μ M como catalasa 300 nM a la mezcla de reacción.

Extracción lipídica y preparación de muestras

5

[0046] Los lípidos se extrajeron y se prepararon para su análisis por espectrometría de masas en una atmósfera de argón o nitrógeno en todas las etapas. En primer lugar, los hidroxiperóxidos en la mezcla de reacción se redujeron a sus hidróxidos correspondientes añadiendo SnCl_2 (final 1 mM). A la muestra se le añadió una cantidad conocida de ácido 12(S)-hidroxi-5,8,10,14-eicosatetraenoico-5,6,8,9,11,12,14,15-d8 convencional interno deuterado (12-HETE-d8; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), y después se extrajeron lípidos plasmáticos añadiendo una mezcla de ácido acético 1 M/2-isopropanol/hexano (2/20/30, v/v/v) en una relación de 5 ml de mezcla de disolvente orgánico:1 ml de plasma. Después de la agitación vorticial de la mezcla y la centrifugación, los lípidos se extrajeron en la fase de hexano. El plasma se extrajo de nuevo mediante la adición de un volumen equivalente de hexano seguido de agitación vorticial y centrifugación. Los hidroperóxidos de colesterol éster (CE-H(P)ODE) se analizaron como sus formas hidróxido reducidas por SnCl_2 estables secando los extractos de hexano combinados en una atmósfera de N_2 , reconstituyendo muestras con 200 μ l de 2-isopropanol/acetonitrilo/agua (44/54/2, v/v/v) y almacenaje a -80 °C en una atmósfera de argón hasta el análisis. Para el ensayo de ácidos grasos libres y sus productos de oxidación, los lípidos totales (fosfolípidos, ésteres de colesterol, triglicéridos) se secaron en una atmósfera de N_2 , se suspendieron de nuevo en 1,5 ml de 2-isopropanol, y después los ácidos grasos se liberaron mediante hidrólisis de base con 1,5 ml de NaOH 1 M a 60 °C durante 30 min en una atmósfera de argón. Las muestras hidrolizadas se acidificaron a pH 3,0 con HCl 2 M, y los ácidos grasos se extrajeron dos veces con 5 ml de hexano. Las fases de hexano combinadas se secaron en una atmósfera de N_2 , se suspendieron de nuevo en 100 μ l de metanol y se almacenaron en una atmósfera de argón a -80 °C hasta su análisis por CL/IEN/EM/EM, como se describe a continuación.

25

Fraccionamiento por HPLC de filtrado plasmático

[0047] Con el fin de estudiar la función que tienen los compuestos de bajo peso molecular en el plasma como sustratos para la MPO en la promoción de la peroxidación lipídica, el plasma completo de donantes sanos normales se filtró a través de un filtro de corte de 10 kDa de PM (Centriprep YM-10, Millipore-Corporation Bedford, MA USA) por centrifugación. El filtrado de plasma se usó directamente o después del fraccionamiento por HPLC. El fraccionamiento por HPLC de fase inversa se realizó usando una columna C-18 Beckman (4,6 x 250 mm, 5 μ m ODS; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA). La separación de compuestos de bajo peso molecular en el filtrado plasmático (0,5 ml) se realizó al caudal de 1,0 ml/min con el siguiente gradiente: 100% de fase móvil A (ácido acético al 0,1% que contenía agua) durante 10 min, después un gradiente lineal al 100% de fase móvil B (ácido acético al 0,1% que contenía metanol) durante 10 min, seguido del 100% de fase móvil B durante 5 min. El efluente se recogió en forma de fracciones de 1 ml, se secó en una atmósfera de N_2 y después se suspendió de nuevo en tampón (0,1 ml) para su análisis. El fraccionamiento del filtrado plasmático (0,5 ml) por HPLC de intercambio aniónico fuerte (SAX-HPLC) se realizó en una columna de HPLC SPHERIS (4,6 x 250 mm, 5 μ m SAX; Phase Separations Inc. Norwalk Connecticut). La separación de compuestos de bajo peso molecular en el filtrado plasmático se realizó al caudal de 0,9 ml/min en condiciones isocráticas usando tampón acetato amónico 45 mM (pH 4,0) como fase móvil. El efluente se recogió en forma de fracciones de 1,0 ml, se secó en una atmósfera de N_2 , y después se suspendió de nuevo en tampón (0,1 ml) para su análisis.

45 a) Espectrometría de masas

[0048] Se empleó CL/IEN/EM/EM para cuantificar productos de oxidación dependientes de radicales libres de ácido araquidónico (ácido 9-hidroxi-5,7,11,14-eicosatetraenoico y ácido 9-hidroperoxi-5,7,11,14-eicosatetraenoico (9-H(P)ETE)), y ácido linoleico (ácido 9-hidroxi-10,12-octadecadienoico y ácido 9-hidroperoxi-10,12-octadecadienoico (9-H(P)ODE)). Inmediatamente anterior a su análisis, se añadió un volumen de H_2O a cinco volúmenes de una muestra suspendida en metanol, que después se pasó a través de un filtro de 0,22 μ m (Millipore Corporation, Bedford, MA). La muestra (20 μ l) se inyectó sobre una columna C-18 Prodigy (1 x 250 mm, 5 μ m ODS, 100 Å; Phenomenex, Rancho Palos Verdes, CA) a un caudal de 50 μ l/min. La separación se realizó en condiciones isocráticas usando metanol al 95% en agua como la fase móvil. En cada análisis, la totalidad del efluente de la columna de HPLC se introdujo en un EM de triple cuadrupolo Quattro II (Micromass, Inc.). Los análisis se realizaron usando ionización por electronebulización en modo de ión negativo con monitoreo de reacciones múltiples (MRM) de iones precursores y producto característicos específicos para los isómeros controlados. Las transiciones controladas eran la relación masa-carga (m/z) 295 171 para 9-HODE; m/z 319 151 para 9-HETE; m/z 327 184 para 12-HETE-d8.

Se usó N₂ como la cortina antigas en la interfaz de electronebulización. El 12-HETE-d8 estándar interno se usó para calcular las eficiencias de extracción (que fueron >80% para todos los análisis). Se usaron curvas de calibración externas construidas con estándares auténticos para cuantificar 9-HETE y 9-HODE.

5 b) Cuantificación por RP-HPLC de CE-H(P)ODE

[0049] La muestra (100 µl) reconstituida en metanol (sin hidrólisis de base) se inyectó sobre una columna C-18 Beckman (4,6 x 250 mm, 5 µm ODS; Beckman Instruments, Inc., Fullerton, CA). Los lípidos se separaron usando un sistema de disolvente isocrático formado por 2-isopropanol/acetonitrilo/agua (44/54/2, v/v/v) a un caudal de 1,5 ml/min. Los CE-H(P)ODE se cuantificaron en lugar de sus formas hidróxido estables por detección UV a 234 nm usando CE-9-HODE (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI) para la generación de una curva de calibración externa.

RESULTADOS

[0050] Los neutrófilos normales generaron niveles significativos de 9-H(P)ODE y 9-(H)PETE en plasma después de la activación celular por PMA (figura 4). En un marcado contraste, los neutrófilos con deficiencia de MPO no pudieron generar niveles significativos de productos de peroxidación lipídica tras la estimulación con PMA, a pesar de su capacidad mejorada para producir O₂^{•-}. La adición de cantidades catalíticas de MPO restauró la capacidad de los neutrófilos con deficiencia de MPO de iniciar la peroxidación de lípidos plasmáticos endógenos (figura 4).

[0051] La adición de la catalasa, pero no catalasa inactivada por calor, a mezclas celulares dio como resultado la ablación casi completa de la peroxidación lipídica en plasma, sugiriendo enfáticamente una función crítica de H₂O₂ en la reacción dependiente de las células (figura 5). La incubación de las mezclas de reacción con superóxido dismutasa (SOD) no pudo atenuar la oxidación de los lípidos plasmáticos (figura 5). Por el contrario, la adición de hemotoxinas (por ejemplo azida, cianuro) y el ascorbato antioxidante soluble en agua, dio como resultado una inhibición completa de la peroxidación dependiente de neutrófilos de los lípidos plasmáticos. Finalmente, la adición de eliminadores de HOCl, tales como ditioneitol y la tioéter metionina, no pudieron atenuar la peroxidación dependiente de neutrófilos de los lípidos plasmáticos endógenos, evaluada por la cuantificación de 9-H(P)ODE y 9-H(P)ETE (figura 5).

[0052] Los resultados presentados hasta ahora sugieren enfáticamente que los neutrófilos emplean el sistema UTO-H₂O₂ para generar especies reactivas distintas de los intermediarios de cloración como los oxidantes primarios para el inicio de la peroxidación lipídica en plasma. Para confirmar una función fisiológica para la MPO, a continuación se añade MPO humana purificada y un sistema de generación de H₂O₂ (glucosa/glucosa oxidasa, G/GO) al plasma y se controla la formación de productos de oxidación específicos mediante análisis por CL/EN/EM/EM. La formación de 9-H(P)ODE y 9-H(P)ETE tuvo lugar fácilmente y tuvo un requisito absoluto de la presencia tanto de MPO como del sistema de generación de H₂O₂ (figura 6). La oxidación lipídica se inhibió de nuevo por catalasa, azida o ascorbato, pero no se vio afectada por la adición de SOD o metionina (figura 6). En conjunto, estos resultados apoyan fuertemente una función fundamental del sistema MPO-H₂O₂ de los leucocitos como un mecanismo primario para iniciar la peroxidación lipídica en tejidos y fluidos biológicos complejos, tales como plasma.

Oxidación por MPO de LDL y la Presencia de los Productos de Oxidación Resultantes en Lesiones Ateroscleróticas

[0053] *Procedimientos generales.* La mieloperoxidasa humana (donante: peróxido ácido, óxido-reductasa, EC 1.11.1.7) y la LDL se aislaron y se cuantificaron como se describe (Podrez, E.A. y col., 1999, J. Clin. Invest. 103: 1547). Todos los tampones se trataron con resina Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA) y se suplementaron con ácido dietilentriaminapentaacético (DT-PA) para eliminar los niveles traza de iones de metales de transición que puedan catalizar la oxidación de LDL durante las incubaciones. El LDL se marcó con Na^[125]I para una actividad específica entre 100 y 250 dpm/ng de proteína, como se describe (Hoppe, G., y col., 1994, J. Clin. Invest. 94, 1506-12). La extracción de los lípidos celulares y la separación por cromatografía de capa fina de ésteres de colesterol radiomarcados y colesterol libre se realizaron como se describe (Podrez, E.A. y col., 1999, J. Clin. Invest. 103: 1547). La incorporación de [¹⁴C]oleato en ésteres de colesterol por las células tras la incubación con las lipoproteínas indicadas (50 µg/ml), se determinó como se describe (Podrez, E.A. y col., 1999, J. Clin. Invest. 103: 1547). Se aislaron aortas torácicas de conejo de Conejos WHHL, se aclararon en PBS rociado con argón suplementado con hidroxitolueno butilado 100 µM (BHT) y DTPA 100 µM, se sumergieron en el mismo tampón, se cubrieron con argón, se ultracongelaron en nitrógeno líquido y después se almacenaron a -80 °C hasta su análisis. Se obtuvieron aortas relativamente libres de lesiones lipídicas de Conejos WHHL de 10-12 semanas de edad,

mientras que se recuperaron aortas llenas de lesiones de Conejos WHHL de más de 6 meses de edad.

[0054] *Modificación de lipoproteínas.* La LDL modificada por intermedios de nitración generados por MPO (NO_2 -LDL) se formó por la incubación de LDL (0,2 mg de proteína/ml) a 37 °C en fosfato sódico 50 mM, pH 7,0, DTPA 100 μM , MPO 30 nM, 100 $\mu\text{g/ml}$ de glucosa, 20 ng/ml de glucosa oxidasa y NaNO_2 0,5 mM durante 8 h a menos que se especifique otra cosa. En estas condiciones, se genera un flujo constante de H_2O_2 (10 $\mu\text{M/h}$) por el sistema de glucosa/glucosa oxidasa, como se determina por la oxidación de Fe(II) y la formación del complejo de Fe(III)-tiocianato (van der Vliet, A., y col., 1997, J. Biol. Chem., 272: 7617). Las reacciones de oxidación se terminaron por la adición de BHT 40 μM y catalasa 300 nM a la mezcla de reacción. La acetilación de LDL se realizó como se ha descrito anteriormente (Podrez, E.A., y col., 1999, J. Clin. Invest. 103: 1547).

[0055] *Separación de fosfolípidos y análisis por espectrometría de masas.* Los lípidos se mantuvieron en una atmósfera inerte (argón o nitrógeno) en todo momento. Los lípidos de vesículas PAPC o PLPC oxidadas, o de NO_2 -LDL, se extrajeron tres veces secuencialmente por el procedimiento de Bligh y Dyer [Bligh, 1959 #52] inmediatamente después de añadir un volumen equivalente de una solución saturada de NaCl (para mejorar la extracción lipídica). Los extractos de cloroformo combinados se evaporaron en una atmósfera de nitrógeno, y después los lípidos se suspendieron de nuevo en metanol (en aproximadamente 200 $\mu\text{g/0,1 ml}$), se filtraron a través de un filtro Acrodisc CR PTFE y se aplicaron sobre una columna de fase inversa (Luna C18, 250 x 10 mm, 5 μm , Phenomenex, Torrance, CA, Estados Unidos). Los lípidos se resolvieron a un caudal de 3 ml/min usando un gradiente ternario (acetonitrilo/metanol/ H_2O) generado por una HPLC de sistema de administración multidisolvente Waters 600 E (Waters, Milford, MA, Estados Unidos), y se controlaron usando un detector de luz dispersa evaporativo (Sedex 55, Sedere, Alfortville, Francia).

[0056] El fraccionamiento adicional y el aislamiento de los lípidos bioactivos se realizó sobre extractos lipídicos combinados de tres separaciones que se secaron en una atmósfera de N_2 , se suspendieron de nuevo en cloroformo (300 μl) suplementado con BHT y se mantuvieron en una atmósfera de argón. Se eliminó una alícuota de la fracción ($2/3^{\text{a}}$), se evaporó en una atmósfera de nitrógeno y se suspendió de nuevo en tampón HPLC (metanol/agua; 85/15; v/v) inmediatamente antes de la inyección sobre una columna de HPLC de fase inversa.

[0057] Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en un Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quatro II (Micromass, Inc., Altrincham, Reino Unido) equipado con una sonda de ionización por electronebulización (IEN) y se interconectaron con una HPLC HP 1100 (Hewlett-Packard, Wilmington, DE). Los lípidos (ambos libres y tras la derivación) se resolvieron sobre una columna Luna C18 250 x 4,6 mm, 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA) a un caudal de 0,8 ml/min. Se usó un gradiente discontinuo (Gradiente II) mezclando el disolvente A (metanol (MeOH): H_2O , 85:15, v:v) con el disolvente B (MeOH), como se indica a continuación: elución isocrática con el disolvente A de 0-7 min; aumento del 88% del disolvente B de 7-10 min; aumento del 91% de disolvente B de 10-34 min; y después aumento del 94% del disolvente B de 34-52 min). El efluente de la columna se dividió de tal forma que se introdujeron 45 $\mu\text{l/min}$ al espectrómetro de masas y 755 $\mu\text{l/min}$ se recogieron y se aislaron para determinar la actividad biológica. En algunos casos, la actividad biológica también se determinó usando el mismo gradiente tras la inyección de estándares auténticos. Los análisis de espectrometría de masas se realizaron en línea usando espectrometría de masas en tándem con ionización por electronebulización (IEN/EM/EM) en el modo de ión positivo con un modo de monitoreo de reacción múltiple (MRM) (potencial del cono de 60 eV/energía de colisión de 20-25 eV). Las transiciones de MRM usadas para detectar los fosfolípidos presentes en cada fracción fueron la relación masa-carga (m/z) para el catión molecular $[\text{MH}]^+$ y el ión producto m/z 184, el grupo fosfocolina (es decir, $[\text{MH}]^+ \rightarrow m/z$ 184). Los derivados oxima de fosfolípidos se controlaron a m/z $(\text{MH}+29)^+ \rightarrow m/z$ 184.

[0058] La cuantificación de las diversas especies de PC oxidada se realizó usando CL/IEN/EM/EM en modo de ión positivo usando MRM. Se incluyó ácido fórmico (0,1%) en las fases móviles. Se identificaron especies fosfolipídicas oxidadas distintas usando m/z para las transiciones de partida-producto protonadas especificada para cada fosfolípido individual y sus tiempos de retención, como se ilustra en las figuras 2 y 3. OV-PC y ND-PC se cuantificaron de forma similar pero también mediante control en la relación m/z para determinar la transición entre el hemiacetal formado con metanol para cada analito y la pérdida del grupo de cabeza polar (m/z 184).

[0059] Los lípidos se extrajeron inicialmente tres veces mediante el procedimiento de Bligh y Dyer (Bligh, E.G., y col., 1959, Canadian Journal of Biochemical Physiology, 37, 911-917) a partir de lipoproteínas o tejido en presencia de BHT. Los extractos combinados se secaron rápidamente en una atmósfera de nitrógeno, se suspendieron de nuevo en metanol: H_2O (98:2, v:v), y después los lípidos neutros en los extractos lipídicos se eliminaron mediante el paso a través de una minicolumna 18C (tubos Supelclean LC-18 SPE, 3 ml; Supelco Inc., Bellefonte, PA). Se añadió

una cantidad conocida de dimiristil fosfatidil colina (DMPC) a la fracción lipídica polar como un patrón interno, y los lípidos se secaron en una atmósfera de nitrógeno y se almacenaron en una atmósfera de argón a -80 °C hasta su análisis a las 24 h. Las curvas de calibración se construyeron con una cantidad fija de DMPC y un % en mol variable de cada especie de PC oxidada sintética, y se usaron para corregir las diferencias en los factores de respuesta de ionización observados entre los diferentes lípidos. En estudios preliminares adicionales, los procedimientos de cuantificación empleados se validaron independientemente para cada analito demostrando resultados idénticos a los obtenidos por el procedimiento de adiciones estándar.

RESULTADOS

10

[0060] La cuantificación de diversas especies de PC oxidada específicas por análisis por CL/IEN/EM/EM en formas nativas y oxidadas de LDL reveló aumentos sustanciales del contenido de especies de fosfatidil colina oxidadas (figura 7a, datos para LDL nativa, NO₂-LDL mostrados). Sin importar qué punto de tiempo de oxidación se examinó, HODA-PC y HOOA-PC fueron productos principales de la oxidación de LDL por MPO. Los % en mol combinados (con respecto a los fosfolípidos no oxidados restantes) y la ND-PC) detectados en NO₂-LDL (figura 7a) corresponde a ~1,2% en mol. De estos, el contenido combinado de las 8 especies de PC oxidada cuantificadas en la preparación de NO₂LDL (figura 7a) corresponde al 0,73% en mol.

[0061] Para determinar si las especies de PC oxidada se forman *in vivo*, se aislaron aortas torácicas con y sin extensas lesiones ateroscleróticas de conejos Watanabe con hiperlipidemia hereditaria (WHHL) y los niveles de múltiples fosfolípidos oxidados distintos se determinaron usando análisis por CL/IEN/EM/EM. Se apreciaron aumentos significativos en el contenido de cada una de las PC oxidadas derivadas de oxPAPC (HOOA-PC, KOOA-PC, HODiA-PC, KODiA-PC) y oxPLPC (HODA-PC, KODA-PC, HDDiA-PC y KDDiA-PC) en los recipientes afectados (figura 7b). De manera interesante, mientras que los niveles de especies de PC oxidada obtenidas de PLPC fueron inferiores a los observados para la ON-PC y ND-PC más altamente oxidada, los niveles de especies de PC oxidada obtenidos de PAPC fueron comparables a los observados para OV-PC y G-PC (figura 7a).

Presencia de HETE, HODE, F2 Isoprostanos y Especies de PC Oxidada en Lesiones Ateroscleróticas de Sujetos Humanos

30

[0062] El Angiogard es un dispositivo de protección embólica recientemente inventado para su uso durante intervenciones vasculares percutáneas. Se despliega distal a la lesión diana antes de inflar el globo para angioplastia. Sirve como un paraguas temporal, capturando el material plaquetario rico en lípidos extruído a través de una malla inserte similar a un tamiz. Los poros de la malla son grandes y la microscopía confirma que no obstruyen el flujo de células sanguíneas o plaquetas, sino que capturan los glóbulos lipídicos grandes. El material capturado en el Angiogard en el momento de la intervención se analizó para determinar las especies lipídicas presentes en el material plaquetario. La figura 8 muestra los niveles de múltiples productos de oxidación lipídica distintos cuantificados por procedimientos CL/IEN/EM/EM en el material plaquetario recuperado del Angiogard. Para comparación, también se valoraron los niveles de los mismos lípidos oxidados en la íntima aórtica normal recuperada en el momento de la cosecha de los órganos de donantes de trasplante de corazón. Se observaron aumentos dramáticos de los F₂-Isoprostanos y cada uno de los HETE controlados. El análisis del material plaquetario capturado en el Angiogard también confirmó la detección de múltiples especies de oxPC distintas (datos no mostrados).

Procedimientos para Determinar los Niveles de Productos de Oxidación Generados por Mieloperoxidasa Seleccionados

A. Ditirosina y Nitrotirosina

[0063] Los niveles de ditirosina y nitrotirosina en la muestra corporal pueden determinarse usando anticuerpos monoclonales que son reactivos con dichas especies de tirosina. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos anti-nitrotirosina y marcarse usando procedimientos convencionales, y después pueden emplearse en inmunoensayos para detectar la presencia de nitrotirosina libre o unida a péptido en la muestra. Los inmunoensayos adecuados incluyen, a modo de ejemplo, radioinmunoensayos, tanto de fase sólida como líquida, ensayos ligados a fluorescencia, o ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas. Preferiblemente, los inmunoensayos también se usan para cuantificar la cantidad de las especies de tirosina que está presente en la muestra.

[0064] Los anticuerpos monoclonales formulados contra las especies de ditirosina y nitrotirosina se producen de acuerdo con los procedimientos establecidos. Generalmente, el residuo de ditirosina o nitrotirosina, que se conoce

como un hapteno, se conjuga en primera lugar con una proteína portadora y se usa para inmunizar un animal huésped. Preferiblemente, el residuo de ditirosina y nitrotirosina se inserta en los péptidos sintéticos con diferente secuencia circundante y después se acopla a las proteínas portantes. Girando la secuencia circundante, las especies de ditirosina y nitrotirosina en el péptido acoplado al vehículo, se generan anticuerpos sólo para las especies de ditirosina y nitrotirosina, independientemente del contexto de secuencia circundante. Se han empleado con éxito estrategias similares con una diversidad de análogos aminoacídicos de bajo peso molecular diferentes.

[0065] Los animales huésped adecuados incluyen, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, cabras y cobayas. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica en el animal huésped. El adyuvante usando depende, al menos en parte, de la especie huésped. Para aumentar la probabilidad de que se produzcan anticuerpos monoclonales específicos para la ditirosina y la nitrotirosina, el péptido que contiene la especie de ditirosina y nitrotirosina respectiva puede conjugarse con una proteína portante que está presente en el animal inmunizado. Por ejemplo, se usa comúnmente albúmina de cobaya como un vehículo para inmunizaciones en cobayas. Dichos animales producen poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo, que se denominan como anticuerpos policlonales, y que pueden obtenerse a partir del suero de los animales inmunizados.

[0066] Se obtienen anticuerpos monoclonales, que son poblaciones homogéneas de un antígeno particular, a partir de líneas celulares continuas. Las técnicas convencionales para producir anticuerpos monoclonales son la técnica de hibridoma de Kohler y Millstein (Nature 356: 495-497 (1975)) y la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos de Kosbor y col. (Immunology Today 4: 72 (1983)). Dichos anticuerpos pueden ser cualquier clase de inmunoglobulina, incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, IgD y cualquier clase de las mismas. Se describen procedimientos para preparar anticuerpos frente a aminoácidos modificados, tales como, por ejemplo, 3-nitrotirosina, en Ye, Y. Z., M. Strong, Z. Q. Huang, y J. S. Beckman. 1996. Antibodies that recognize nitrotyrosine. Methods Enzymol. 269: 201-209.

[0067] En general, las técnicas para la medición directa de las especies de ditirosina y nitrotirosina unidas a proteína de fluidos corporales implican la eliminación de la proteína y los lípidos para proporcionar un extracto fluido que contenga residuos aminoacídicos libres. Los tejidos y los fluidos corporales se almacenan, preferiblemente en soluciones tamponadas, queladas y protegidas con antioxidante, preferiblemente a -80 °C como se ha descrito anteriormente. Después, el tejido congelado, y los fluidos corporales, se descongelan, se homogenizan y se extraen, preferiblemente con una mezcla de una sola fase de metanol:éter dietílico:agua como se ha descrito anteriormente para eliminar lípidos y sales. Se añaden estándares internos marcados con isótopos pesados al gránulo, que, preferiblemente, se seca al vacío, se hidroliza, y después el hidrolizado aminoacídico se suspende de nuevo, preferiblemente en una mezcla agua:metanol, se pasa sobre una minicolumna de extracción C18 de fase sólida, se derivatiza y se analiza por cromatografía de gases-espectrometría de masas con dilución de isótopos estables como anteriormente. Los valores de las especies de ditirosina y nitrotirosina libres en la muestra corporal pueden normalizarse con respecto al contenido de proteína, o un aminoácido, tal como tirosina, como se ha descrito anteriormente.

[0068] En un procedimiento altamente preferido, la proteína se deslipida y se desala usando dos extracciones secuenciales con una mezcla de una sola fase de H₂O/metanol/H₂O-éter dietílico saturado (1:3:8 v/v/v). Se añaden estándares de tirosina oxidada (2 pmol cada uno) y tirosina marcada universal (2 nmol) a gránulos de proteínas. Las proteínas se hidrolizan incubando el gránulo de proteína desalado con HCl 6 N desgasificado suplementado con fenol al 1% durante 24 h en una atmósfera de argón. Los hidrolizados aminoacídicos se suspenden de nuevo en agua tratada con chelex y se aplicaron a mini columnas de extracción C18 de fase sólida (minicolumna Supelclean LC-C18SPE; 3 ml; Supelco, Inc., Bellefonte, PA) equilibradas previamente con ácido trifluoroacético al 0,1%. Tras los lavados secuenciales con 2 ml de ácido trifluoroacético al 0,1%, se eluyeron tirosinas oxidadas y tirosina con 2 ml de metanol al 30% en ácido trifluoroacético al 0,1%, se secaron al vacío y después se analizaron por espectrometría de masas.

[0069] La espectrometría de masas en tándem se realiza usando ionización por electronebulización y detección con un espectrómetro de masas con trampa de iones (LCQ Deca, ThermoFinnigan, San Jose, CA) interconectado con un cromatógrafo líquido de alto rendimiento Thermo SP4000 (HPLC). Las muestras se suspenden en disolvente de equilibrio (H₂O con ácido fórmico al 0,1%) y se inyectan sobre una columna C18 Ultrasphere (Phenomenex, 5 µm, 2,0 mm x 150 mm). La L-tirosina y sus productos de oxidación se eluyen a un caudal de 200 µl/min usando un gradiente lineal generado contra ácido fórmico al 0,1% en metanol, pH 2,5 en forma de la segunda fase móvil. Los analitos se controlan en modo de ión positivo con EM/EM con ión producto de exploración completa a resolución unitaria. La respuesta se optimiza con una configuración de tensión de pulverización de 5 KV y una corriente de pulverización de 80 mA. La tensión capilar calentada se ajusta a 10 V y la temperatura a 350 °C. Se usa nitrógeno

tanto como envoltura como gas auxiliar, a un caudal de 70 y 30 unidades arbitrarias, respectivamente. La abundancia de analitos se evalúa midiendo las áreas pico cromatográficas de iones producto seleccionados extraídos de cromatogramas de iones totales de exploración completa, de acuerdo con los espectros de iones producto de la trampa de iones correspondientes. Los iones controlados para cada analito son: 3-nitro[$^{12}\text{C}_6$]tirosina (relación masa-carga (m/z) 227, 181 y 210), 3-nitro[$^{13}\text{C}_6$]tirosina (m/z 233, 187 y 216), 3-nitro[$^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}_1$]tirosina (m/z 237, 190 y 219), [$^{12}\text{C}_6$]tirosina (m/z 182, 136 y 165), [$^{13}\text{C}_9^{15}\text{N}_1$]tirosina (m/z 192, 145 y 174). La tirosina y la nitrotirosina se resuelven por la línea basal en las condiciones de HPLC empleadas, permitiendo programar el LCQ Deca para el análisis durante 0-7 min para la detección de isotopómeros de tirosina, y de 7 min para la detección de isotopómeros de 3-nitrotirosina.

10

[0070] La nitrotirosina y la ditirosina libres se miden de forma similar en las muestras, pero el tejido o fluido corporal se pasa en primer lugar a través de un filtro de corte de bajo peso molecular, y los componentes de bajo peso molecular se analizan por CL/ECS/EM/EM. Los valores de las especies de ditirosina y nitrotirosina libres y unidas a proteína en la muestra corporal pueden normalizarse con respecto al contenido de proteína, o un aminoácido, tal como la tirosina precursora, como se describe a continuación.

15

B. Productos de Oxidación Lipídica

[0071] Los productos de oxidación lipídica pueden medirse por HPLC con detección UV o HPLC con espectrometría de masas en línea. También pueden usarse otros procedimientos analíticos que incluyen CG/EM e inmunocitoquímicos. Los F2Isoprostanos pueden medirse mediante diversas técnicas de espectrometría de masas como se conocen en la técnica.

20

[0072] Se describen procedimientos de extracción y cuantificación de los productos de oxidación lipídica generados por MPO, ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETE), ácidos hidroxi-octadecadienoicos (HODE), F2Isoprostanos; los ésteres del ácido 5-oxovalérico de 2-lisoPC (OV-PC); 5-colesten-5 α ,6 α -epoxi-3 β -ol (colesterol α -epóxido); 5-colesten-5 β ,6 β -epoxi-3 β -ol (colesterol β -epóxido); 5-colesten-3 β ,7 β -diol (7-OH-colesterol); 5-colesten-3 β ,25-diol (25-OH colesterol 5-colesten-3 β -ol-7 β -hidroperóxido (7-OOH colesterol); y colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol) en Schmitt, y col. (1999) Biochemistry, Vol. 38, 16904-16915, que se incorpora específicamente en el presente documento por referencia. Para la determinación de 9-H(P)ODE, 9-H(P)ETE y F₂-isoprostanos, los hidroperóxidos en las mezclas de reacción se reducen a sus hidróxidos correspondientes durante la extracción que utiliza un procedimiento Dole modificado en el que está presente el agente reductor, trifenilfosfina (Savenkova, M. L., y col. (1994) J. Biol. Chem. 269, 20394-20400). Estas condiciones también inhiben la formación artefactual de isoprostanos y lípidos oxidados. Los lípidos se secan en una atmósfera de N₂, se suspenden de nuevo en isopropanol (2 ml) y después se liberan ácidos grasos por hidrólisis de base con hidróxido sódico 1 N (2 ml) a temperatura ambiente en una atmósfera de N₂ durante 90 min. Las muestras se acidifican (pH 3,0) con HCl 2 N, se añaden cantidades conocidas de patrones internos y los ácidos grasos libres se extraen dos veces con hexano (5 ml). Después, el contenido de 9-H(P)ODE, 9-H(P)ETE y F₂-isoprostanos se determina por análisis por CL/EM/EM como se describe a continuación.

30

[0073] Se extrae 1-palmitoil-2 oxovaleril-sn-glicerol-3-fosfatidil colina (PoxvPC) mediante el mismo procedimiento Dole modificado usado para los análisis de 9-H(P)ODE, 9-H(P)ETE y F₂ isoprostanos que anteriormente, pero omitiendo la adición del reductor, trifenilfosfina. Los lípidos se secan en una atmósfera de N₂, se suspenden de nuevo en metanol y se almacenan en una atmósfera de argón a -70 °C hasta el análisis por CL/EM posterior como se describe a continuación. Los productos de oxidación de esteroles se extraen añadiendo NaCl 4 M (150 μ l) y acetonitrilo (500 μ l). Las muestras se agitan vorticialmente, se centrifugan, y la fase orgánica superior se elimina. Los extractos se secan en una atmósfera de N₂, se suspenden de nuevo en metanol, y se almacenan en una atmósfera de argón a -70 °C hasta su análisis por HPLC con análisis de espectrometría de masas en línea.

45

[0074] Los análisis por espectrometría de masas se realizan en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Quatro II interconectado con una HPLC HP 1100. Los F₂-isoprostanos se cuantifican por espectrometría de masas con dilución de isótopos estable usando espectrometría de masas en tándem con HPLC de fase inversa en línea (CL/EM/EM) con 8-epi-[$^2\text{H}_4$]PGF₂ α como patrón como se describe por Mallat (Mallat, Z., y col. (1999) J. Clin. Invest. 103, 421-427). Para los análisis de 9-HODE y 9-HETE, los extractos lipídicos generados tras la hidrólisis de base de los lípidos reducidos (anteriormente) se secan en una atmósfera de N₂ y se reconstituyen en metanol. Después, una alícuota de la mezcla se inyecta en una columna C18 Ultrasphere ODS equilibrada y se hace funcionar en condiciones isocráticas empleando metanol:H₂O, (85:15, v/v) como disolvente. El eluyente de columna se divide (930 μ l/min para el detector UV y 70 μ l/min para el detector de masas) y se analizó por el espectrómetro de masas. El análisis por CL/EM/EM de 9-HODE, 9-HETE y F₂-isoprostanos en efluentes de columna se realiza usando

55

espectrometría de masas con ionización por electronebulización (IEN-EM) en el modo de ión negativo con monitoreo de reacción múltiple (MRM) y controlando las transiciones m/z 295 $\rightarrow$ 171 para 9-HODE; m/z 319 $\rightarrow$ 151 para 9-HETE; m/z 353 $\rightarrow$ 309 para F_2 -isoprostanos; y m/z 357 $\rightarrow$ 313 para $[^2H_4]PGF_2\alpha$.

5 **[0075]** La cuantificación de POxvPC se realiza sobre extractos lipídicos utilizando HPLC con análisis por IEN-EM en línea en el modo de ión positivo y un control iónico seleccionado a m/z 782 y m/z 594, respectivamente. Una alícuota de extracto lipídico reconstituido en metanol (anteriormente) se mezcla con ácido fórmico al 0,1% en metanol (fase móvil B) y se carga sobre una columna C18 Columbus (1 x 250 mm, 5 μ m, P.J. Cobert, St. Louis, MO) equilibrada previamente al 70% de fase móvil B, 30% de fase móvil A (ácido fórmico al 0,1% en agua) a un caudal de 30 μ l/min. Después de un periodo de lavado de 3 min al 70% de fase móvil B, la columna se desarrolla con un gradiente lineal al 100% de fase móvil B, seguido de elución isocrática con el 100% de fase móvil B. Las curvas de calibración externas construidas con POxvPC auténtica se usan para la cuantificación. 7-OH colesterol, 7-ceto colesterol y 7-OOH colesterol se resuelven sobre una columna Ultrasphere ODS C18. El gradiente de elución consistió en 91:9, acetonitrilo:agua + formiato al 0,1% (v:v), y la columna se lavó entre realizaciones con acetonitrilo + formiato al 0,1%. El efluente de columna se divide (900 μ l/min para el detector UV y 100 μ l/min para el detector de masas) y se ioniza mediante ionización química a presión atmosférica (IQPA) en el modo de ión positivo con monitoreo de iones seleccionados. La identificación de 7-OH colesterol se realiza demostrando la co-migración de iones con m/z 385,3 (M-H₂O)+ y m/z 367,3 (M-2H₂O)+ con el mismo tiempo de retención que un patrón auténtico. Se usa el área integrada de la corriente de iones para el pico controlado a m/z 367,3 para la cuantificación. La identificación de 7-OOH colesterol se realiza demostrando la co-migración de iones con m/z 401,3 (M-H₂O)+, m/z 383,3 (M-2H₂O)+ y m/z 367,3 (M-H₂O₂)+ con el mismo tiempo de retención que un patrón auténtico. Se usa el área integrada de la corriente iónica para el pico controlado a m/z 401,3 para la cuantificación. La identificación de 7-ceto colesterol se realiza demostrando la co-migración de iones con m/z 401,3 (M + H)+ y m/z 383,3 (M-H₂O)+ con el mismo tiempo de retención que un patrón auténtico. Se usa el área integrada de la corriente iónica para el pico controlado a m/z 401,3 para la cuantificación. Las curvas de calibración externas construidas con 7-OH colesterol, 7-OOH colesterol y 7-ceto colesterol auténticos se usan para la cuantificación siguiendo experimentos por IQPA CL/EM preliminares que demuestran resultados idénticos a los obtenidos por el procedimiento de adiciones convencionales. Los tiempos de retención para 25-OH colesterol, 5,6 α - y α -epóxidos, y triol se determinan por análisis CL/EM de los patrones auténticos.

30

Valor predeterminado

[0076] El nivel de la masa de la MPO, la actividad de la MPO, o el producto de oxidación generado por MPO seleccionado en la muestra corporal obtenida del sujeto de prueba se compara con un valor predeterminado. El valor predeterminado se basa en los niveles de actividad de la MPO, de masa de la MPO, o del producto de oxidación generado por MPO seleccionado en muestras comparables obtenidas de la población general o de una población seleccionada de sujetos humanos. Por ejemplo, la población seleccionada puede formarse por sujetos aparentemente sanos. "Aparentemente sanos", como se usa en el presente documento, se refiere a individuos que no han tenido previamente ninguna señal o síntoma que indique la presencia de aterosclerosis, tal como angina de pecho, historial de un acontecimiento cardiovascular adverso agudo, tal como un infarto de miocardio o ictus, evidencia de aterosclerosis mediante procedimientos de diagnóstico por imagen, incluyendo, pero sin limitación, angiografía coronaria. Los individuos aparentemente sanos tampoco muestran de otro modo síntomas de enfermedad. En otras palabras, dichos individuos, si se examinan por un profesional médico, se caracterizarán como sanos y libres de síntomas de enfermedad.

45

[0077] El valor predeterminado se refiere al valor usado para caracterizar el nivel de actividad de la MPO o masa de la MPO en la muestra corporal obtenida del sujeto de prueba. Por lo tanto, si el nivel de la actividad de la MPO es un valor absoluto, tal como las unidades de actividad de la MPO por leucocito o por ml de sangre, el valor predeterminado también se basa en las unidades de actividad de la MPO por leucocito o por ml de sangre en los individuos de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos. De forma análoga, si el nivel de actividad de la MPO o masa de la MPO es un valor representativo, tal como una unidad arbitraria obtenida a partir de un citograma, el valor predeterminado también se basa en el valor representativo.

[0078] El valor predeterminado puede tomar una diversidad de formas. El valor predeterminado puede ser un valor de un solo corte, tal como una mediana o media. El valor predeterminado puede establecerse en base a grupos comparativos, tal como donde el riesgo en un grupo definido es doble al riesgo en otro grupo definido. El valor predeterminado puede ser un intervalo, por ejemplo, cuando la población general se divide igualmente (o de forma desigual) en grupos, tal como un grupo de bajo riesgo, un grupo de riesgo medio, y un grupo de alto riesgo, o en cuadrantes, siendo el cuadrante inferior los individuos con el mejor riesgo, siendo el cuadrante mayor los individuos

con el mayor riesgo.

[0079] El valor predeterminado puede obtenerse determinando el nivel de actividad o masa de la MPO en la población general. Como alternativa, el valor predeterminado puede obtenerse determinando el nivel de actividad o masa de la MPO en una población seleccionada, tal como una población no fumadora aparentemente sana. Por ejemplo, una población no fumadora aparentemente sana puede tener un intervalo normal diferente de actividad de la MPO o masa de la MPO del que tendrá una población fumadora o una población cuyos miembros hayan tenido un trastorno cardiovascular anterior. Por consiguiente, los valores predeterminados seleccionados pueden tener en cuenta la categoría en la que se sitúa un individuo. Pueden seleccionarse intervalos y categorías apropiadas con tan solo la experimentación rutinaria por los expertos en la técnica.

[0080] Los valores predeterminados de la actividad de la MPO o masa de la MPO, tales como, niveles medios, niveles de la mediana, o niveles de "corte", se establecen ensayando una muestra grande de individuos en la población general o la población seleccionada y usando un modelo estadístico, tal como el procedimiento del valor predictivo para seleccionar un criterio de positividad o una curva característica operativa del receptor que define la especificidad óptima (tasa negativa real más alta) y la sensibilidad (tasa positiva real más alta) como se describe en Knapp, R.G., y Miller, M.C. (1992). Clinical Epidemiology and Biostatistics. William y Wilkins, Harual Publishing Co. Malvern, PA. Puede determinarse un valor de "corte" para cada predictor de riesgo que se ensaya. El procedimiento estandarizado que se usó en el Ejemplo 1 a continuación emplea el ensayo de oxidación de guaiacol como se describe en Klebanoff, S.J., Waltersdorff, A.N. y Rosen, H. 1984. "Antimicrobial activity of myeloperoxidase". Methods in Enzymology. 105: 399-403).

Comparación de los Niveles de Actividad y Masa de la MPO y los Niveles de los Productos de Oxidación Generados por MPO Seleccionados en la Muestra Corporal del Sujeto de Prueba con respecto al Valor Predeterminado.

[0081] Los niveles de cada predictor de riesgo, es decir, la actividad de la MPO, la masa de la MPO y el producto de oxidación generado por MPO seleccionado, en la muestra corporal del individuo pueden compararse con un solo valor predeterminado o con un intervalo de valores predeterminados. Si el nivel del presente predictor de riesgo en la muestra corporal del sujeto de prueba es mayor que el valor predeterminado o el intervalo de valores predeterminados, el sujeto de prueba tiene un riesgo mayor de desarrollar o presentar ECV que los individuos con niveles comparables con, o por debajo del valor predeterminado o el intervalo de valores predeterminados. Por el contrario, si el nivel del presente predictor de riesgo en la muestra corporal del sujeto de prueba está por debajo del valor predeterminado o el intervalo de valores predeterminados, el sujeto de prueba tiene un riesgo menor de desarrollar o presentar ECV que los individuos con niveles comparables con, o por encima del valor predeterminado o el intervalo de valores predeterminados. Por ejemplo, un sujeto de prueba que tiene un mayor número de neutrófilos o monocitos, o ambos, con elevados niveles de la actividad de la MPO o la masa de la MPO en comparación con el valor predeterminado, tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular, y un sujeto de prueba que tiene un menor número de neutrófilos o monocitos, o ambos, con niveles disminuidos o inferiores de la actividad de la MPO o masa de la MPO en comparación con el valor predeterminado, tiene un riesgo inferior de desarrollar una enfermedad cardiovascular. La extensión de la diferencia entre los niveles de los predictores de riesgo del sujeto de prueba y el valor predeterminado también es útil para caracterizar la extensión del riesgo y, así, determinar qué individuos se beneficiarán en una mayor medida de ciertas terapias agresivas. En aquellos casos, en los que los intervalos de valores predeterminados se dividen en una pluralidad de grupos, tales como los intervalos de valores predeterminados para individuos con un alto riesgo, riesgo medio, y bajo riesgo, la comparación implica determinar en qué grupo se sitúa el nivel del sujeto de prueba del predictor de riesgo relevante.

[0082] Los presentes procedimientos de diagnóstico son útiles para determinar si y cuando los agentes terapéuticos que se dirigen a la prevención de ECV deben o no prescribirse para un paciente. Por ejemplo, los individuos con valores de actividad de la MPO (U/mg de proteína de LPN; o U/ml de sangre) por encima de un cierto valor de corte, o que están en el tercil o cuartil superior de un "intervalo normal", pueden identificarse como aquellos que necesitan una intervención más agresiva con agentes de reducción lipídica, cambios del estilo de vida, etc.

[0083] Uno de los hallazgos más atractivos del aumento de la MPO como un predictor de riesgo para ECV es que representa un marcador independiente para identificar individuos con un aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular. Es decir, en análisis multivariados frente a otros factores de riesgo conocidos para ECV (por ejemplo niveles lipídicos, tales como LDL, HDL, colesterol total, triglicéridos, así como antecedentes familiares, tabaquismo, hipertensión, diabetes), los niveles elevados de la actividad y la masa de la MPO predicen independientemente la asociación con una ECV. Por lo tanto, los presentes procedimientos de diagnóstico son útiles especialmente para identificar individuos con un riesgo aumentado que no podrían haberse identificado de otro modo por la existencia de

protocolos/procedimientos de barrido. Además, los presentes predictores de riesgo pueden usarse en combinación con predictores de riesgo usados actualmente, tales como niveles de LDL en sangre, niveles de triglicéridos en sangre y niveles de proteína C reactiva en sangre, y algoritmos basados en los mismos para caracterizar con más precisión el riesgo de un individuo de desarrollar o presentar ECV.

5

Evaluación de Agentes Terapéuticos de ECV

[0084] Los presentes procedimientos de diagnóstico también son útiles para evaluar el efecto de agentes terapéuticos de ECV en pacientes a los que se ha diagnosticado que tienen o están en riesgo de desarrollar ECV.

- 10 Dichos agentes terapéuticos incluyen, pero sin limitación, agentes antiinflamatorios, agentes de sensibilización de insulina, agentes hipertensivos, agentes antitrombóticos, agentes antiplaquetarios, agentes fibrinolíticos, agentes de reducción de lípidos, inhibidores directos de trombina, inhibidor de ACAT, inhibidor de CDTP tioglitzona, inhibidores de receptores de glicoproteína IIb/IIIa. Dicha evaluación comprende la determinación de los niveles de uno o más predictores de riesgo, incluyendo la actividad de la MPO, la masa de la MPO, los productos de oxidación generados
- 15 por MPO seleccionados, y combinaciones de los mismos, en una muestra corporal tomada del sujeto antes de la administración del agente terapéutico y un fluido corporal correspondiente tomado del sujeto después de la administración del agente terapéutico. Una disminución en el nivel del factor de riesgo seleccionado en la muestra tomada después de la administración del agente terapéutico en comparación con el nivel del factor de riesgo seleccionado en la muestra tomada antes de la administración del agente terapéutico es indicativa de un efecto
- 20 positivo del agente terapéutico en la enfermedad cardiovascular en el sujeto tratado.

EJEMPLOS

- [0085]** Los siguientes ejemplos son con fines de ilustración únicamente y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones que se adjuntan a los mismos.
- 25

EJEMPLO 1: Niveles de la Actividad de la MPO y la Masa de la MPO en Muestras Sanguíneas de Pacientes con y sin Enfermedad Arterial Coronaria

30 PROCEDIMIENTOS

- [0086] Población de Estudio:** En base a los cálculos de potencia de regresión logística (asumiendo grupos de igual tamaño), fueron necesarios 326 pacientes para proporcionar una potencia del 80% ($\alpha = 0,05$) para detectar un índice de probabilidades estadísticamente significativo de al menos 2,0 para una MPO alta (cuartil superior). Se
- 35 identificaron sujetos ($n = 333$) de dos prácticas en el Cardiology Department de la Cleveland Clinic Foundation. En primer lugar, se inscribió una serie de 85 pacientes consecutivos de la Preventive Cardiology Clinic. Simultáneamente, se inscribieron 125 pacientes consecutivos del laboratorio de cateterización. En base a la prevalencia de la EAC en esta serie, se determinó la necesidad de 116 sujetos de control adicionales. Se identificaron todos los pacientes que no presentaron una EAC significativa tras la cateterización en los 6 meses
- 40 anteriores a partir de la base de datos de cateterización, y después se seleccionaron al azar 140 (en base al código de área/número de teléfono) y se les invitó a participar en la medición de la MPO. La EAC se definió por un historial de infarto de miocardio documentado, anterior a la intervención de revascularización coronaria (CABG o intervención coronaria percutánea), o según la presencia de estenosis $\geq 50\%$ en una o más arterias coronarias identificadas durante la cateterización cardíaca. Los criterios de exclusión para el grupo de EAC fueron un acontecimiento
- 45 coronario agudo en los 3 meses anteriores a la inscripción, enfermedad renal en fase terminal y trasplante de médula ósea. El grupo de control consistía en sujetos que se habían sometido a una angiografía coronaria de diagnóstico que no reveló evidencia de EAC significativa. Los criterios de exclusión para los sujetos de control fueron uno o más vasos coronarios con estenosis $\geq 50\%$, enfermedad cardíaca valvular, disfunción del ventrículo izquierdo, enfermedad renal en fase terminal, trasplante de médula ósea, o evidencia de infección o enfermedades
- 50 inflamatorias activas que se revelaron por el historial y examen. Todos los pacientes eran mayores de 45 años de edad y afebriles. Se valoró el historial clínico para determinar diabetes mellitus, historial de tabaquismo pasado y presente, hipertensión y si cualquier pariente de primer grado ha tenido una EAC (hombres a la edad de 50 años y mujeres a la edad de 60). El protocolo de estudio y las formas de consentimiento se aprobaron por la Cleveland Clinic Foundation Institutional Review Board y se obtuvo el consentimiento informado por escrito de todos los
- 55 sujetos. Las muestras se codificaron para asegurar el anonimato y todos los análisis se realizaron de forma ciega.

[0087] Mediciones: Se extrajo sangre después de un ayuno nocturno en tubos que contenían EDTA y se usó para cuantificar los GB, el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDLc), el colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDLc), colesterol total (CT) y triglicéridos en ayunas (TA). Los neutrófilos se aislaron mediante

centrifugación por gradiente de densidad (Hazen, S.L., y col., J. Biol. Chem. 271: 1861-1867). Las preparaciones celulares fueron al menos homogéneas al 98% mediante inspección visual. Las preparaciones de leucocitos se suplementaron con bromuro de cetiltrimetilamonio al 0,2% para la lisis celular, se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min, se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

5

[0088] La MPO funcional se cuantificó mediante un ensayo de la actividad de la peroxidase de lisados de neutrófilos. En resumen, se añadieron células lisadas con detergente (10^4 /ml; muestras por triplicado) a tampón fosfato 20 mM (pH 7,0) que contenía guaiacol 14,4 mM, H_2O_2 0,34 mM y DTPA 200 μ M, y la formación del producto de oxidación de guaiacol se controló a A_{470} a 25 °C (Klebanoff, S.J., y col., Methods Enzymol. 105: 399-403, 10 Capeillere-Blandin, C., Biochem. J. 36(Pt2): 395-404). Se usó un coeficiente de absorbanza milimolar de 26,6 $M^{-1}cm^{-1}$ para el producto de oxidación de diguaiacol con el fin de calcular la actividad de la peroxidasa cuando se define una unidad de la actividad de la MPO como la cantidad que consume 1 μ mol de H_2O_2 por minuto a 25 °C. La actividad de la MPO indicada se normaliza por mg de proteína de neutrófilos (MPO Leucocitaria) o por ml de sangre (MPO en sangre). Se calculó la MPO en sangre (unidades de MPO por ml de sangre) multiplicando las unidades de la actividad de la MPO por veces de neutrófilos, el recuento absoluto de neutrófilos (por microlitro de sangre) 1000 15 veces. La concentración de proteína se determinó como se describe (Markwell, M.A., y col., Anal. Biochem. 87: 206-210).

[0089] Se descubrió que los niveles de MPO Leucocitaria en un individuo eran extremadamente reproducibles, 20 demostrando menos del $\pm 7\%$ de variaciones en los sujetos con el tiempo ($n = 6$ hombres evaluados una vez cada 1-3 meses durante un periodo de >2 años). El coeficiente de variación para la determinación de MPO Leucocitaria, como se determinó por el análisis de muestras múltiples veces de forma consecutiva, fue del 4,2%. La determinación de MPO Leucocitaria para 10 muestras se realizó en 3 días separados produjo un coeficiente de variación del 4,6%. El coeficiente de variación para la determinación de MPO en sangre, como se determinó por el análisis de 25 muestras múltiples veces de forma consecutiva, fue del 4,2%. La determinación de MPO en sangre para 10 muestras realizadas 3 días separados produjo un coeficiente de variación del 4,8%. La masa de la MPO por neutrófilo se determinó usando un ensayo inmunoabsorbente ligando a enzimas (ELISA). Las placas de captura se hicieron incubando placas de 96 pocillos durante una noche con un anticuerpo monoclonal (Dako, Glostrup, Dinamarca) formulado contra la cadena pesada de la MPO humana (10 μ g/ml en PBS 10 mM, pH 7,2). Las placas 30 se lavaron y el ensayo ELISA tipo sandwich se realizó sobre lisados de leucocitos usando anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina para la MPO humana. La masa de la MPO se calculó en base a las curvas convencionales generadas con cantidades conocidas de MPO humana purificada de leucocitos como se describe (Hazen, S.L., y col., J. Biol. Chem. 271: 1861-1867). La pureza de la MPO aislada se estableció mediante la demostración de una R/Z de 0,87 (A_{430}/A_{280}), un análisis SDS PAGE, y tinción de tetrametilbencidina peroxidasa en gel (Podrez, E.A., y 35 col., J. Clin. Invest 103: 1547-1560). La concentración enzimática se determinó por espectrofotometría utilizando un coeficiente de extinción de 89.000 $M^{-1}cm^{-1}$ /hemo.

[0090] Análisis Estadístico: Se representan características de presentación como media $\pm$ desviación típica o mediana (rango intercuartil) para medidas continuas y el número y porcentaje de medidas categóricas. Se evaluaron 40 las diferencias entre los sujetos de EAC y los sujetos de control con suma de clasificación de Wilcoxon o pruebas de asociación de chi. Los niveles de la MPO se dividieron en cuartiles para su análisis ya que ni la actividad de MPO Leucocitaria ni de la MPO en sangre sigue una distribución Gaussiana. Se evaluaron las tendencias desajustadas para tasas de EAC en aumento con la actividad de la MPO en aumento con la prueba de tendencia de Cochran-Armitage. Se determinó una puntuación de riesgo global de Framingham modificada utilizando un historial 45 documentado de hipertensión en lugar de la presión sanguínea registrada en el momento de la cateterización (Taylor, A.J., y col., Circulation 101: 1243-1248).

[0091] Se desarrollaron modelos de regresión logística (Sistema SAS, SAS Institute, Cary NC) para calcular índices de probabilidades (IP) calculando el riesgo relativo asociado con los cuartiles 2 y 3 combinados de la 50 actividad de la MPO y el cuartil superior de la actividad de la MPO en comparación con el cuartil inferior. Se hicieron ajustes para los factores de riesgo de EAC tradicionales individuales (edad, género, diabetes, hipertensión, tabaquismo (alguna vez o actualmente), antecedentes familiares, CT, LDLc, HDLc, TA, GB). La bondad de Hosmer-Lemeshow de pruebas de ajuste se emplearon para evaluar el ajuste de un modelo apropiado. Se valoraron asociaciones entre variables continuas con el uso de un coeficiente de correlación de la clasificación de Spearman. 55 Se valoraron asociaciones entre variables categóricas usando pruebas de suma de clasificación de Wilcoxon.

RESULTADOS

[0092] Demografía de los pacientes: Las características clínicas y bioquímicas de sujetos que participan en este

estudio se muestran en la Tabla 1. Los sujetos con EAC eran mayores, con mayor probabilidad de ser varón y más probabilidades de tener un historial de diabetes, hipertensión y tabaquismo. Los sujetos de EAC también mostraron un aumento de los niveles de triglicéridos en ayunas, un aumento del uso de medicaciones de reducción lipídica (predominantemente estatinas), aspirina y otras medicaciones cardiovasculares. Coherente con otros estudios, la puntuación del riesgo global de Framingham, el recuento absoluto de neutrófilos y los GB aumentaron significativamente en sujetos con EAC ($p < 0,001$ para cada uno; Tabla 1).

Tabla 1. Características Clínicas y Bioquímicas de los Sujetos

Características	c) Control (n = 175)	i) EAC (n = 158)
Edad, a	55 ± 10	64 ± 13***
Género (mujer), %	42	20***
Diabetes [†] , %	5	23***
Hipertensión [‡] , %	31	58***
Historial familiar de EAC, %	53	54
Historial de tabaquismo, %	49	78***
Tabaquismo actualmente [¶] , %	10	9
Cualquier medicamento de reducción de lípidos, %	27	70***
Estatina, %	25	65***
ASA, %	71	84**
Inhibidores de ACE, %	18	44***
Betabloqueantes, %	27	59***
Bloqueadores de los canales de calcio, %	15	24*
Colesterol total, mg/dl [¶]	203 (166-234)	203 (174-234)
Colesterol LDL, mg/dl [¶]	132 (89-144)	122 (90-146)
Colesterol HDL, mg/dl [¶]	49 (40-56)	43 (36-49)
Triglicéridos en ayunas, mg/dl [§]	121 (91-198)	159 (117-240)
GB ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	7,4 ± 3,0	8,4 ± 3,2***
RAN ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	3,8 ± 1,9	5,2 ± 2,6***
Riesgo Global de Framingham	5,5 ± 3,8	8,0 ± 3,0***

10

[0093] Estratificación de la MPO Leucocitaria, MPO en sangre y recuento de glóbulos blancos frente a prevalencia de la enfermedad arterial coronaria: Para probar la hipótesis de que los individuos con mayores niveles de MPO tienen una mayor prevalencia de EAC, se aislaron neutrófilos y se midió su contenido en MPO. La actividad de la MPO por mg de proteína de neutrófilo (MPO Leucocitaria) difería significativamente por el estado de la EAC con una mediana de 13,4 U/mg para los sujetos de control frente a 18,1 U/mg para pacientes de EAC ($p < 0,001$ para la tendencia, y para la diferencia; figura 1). La estratificación de los niveles de MPO leucocitaria por cuartiles para toda la cohorte reveló una correlación positiva con el estado de la EAC ($p < 0,001$ para la tendencia) con individuos en el cuartil superior que tenían el mayor riesgo (IP(CI), 8,8 (4,4-17,5); Tabla 2). Además de cuantificar el contenido de MPO leucocitaria por su actividad catalítica (es decir, un ensayo funcional), se cuantificó independientemente la masa de la MPO por neutrófilo en un subconjunto al azar de sujetos ($n = 111$) usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas. Los resultados observados de este ensayo se correlacionaron significativamente ($r = 0,95$) con las medidas de la actividad (datos no mostrados). Puesto que los índices para la EAC en el segundo y tercer cuartil de MPO Leucocitaria parecían comparables (Tabla 2), se combinaron para todos los análisis adicionales y se denominan como los niveles de intervalo medio en modelos univariados y multivariados. Como se ha observado en otros estudios, la puntuación de riesgo global de Framingham y los GB se correlacionaron asimismo de forma positiva con índices de EAC (Tabla 2).

Tabla 2.

Índice de Probabilidades de Prevalencia de Enfermedad Arterial Coronaria de Acuerdo con Niveles de Mieloperoxidasa, Recuento de Glóbulos Blancos y Puntuación de Riesgo Global de Framingham

30

Cuartil 1	Cuartil 2				para tendencia
<u>MPO Leucocitaria</u> [†]	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	
U/mg de proteína de LPN	≤11,8 24/91 (26%)	11,9-15,3	15,4-19,8	≥19,9	p<0,001
Tasa de EAC		35/76 (46%)	36/83 (43%)	63/83 (76%)	
IP(CI) sin ajustar	1,0	2,4 (1,2-4,6)**	2,1 (1,1-4,0)*	8,8 (4,4-17,5)***	
2. Modelo 1^a IP(CI)		8,5 (3,7-19,7)***		20,3 (7,9-52,1)	
3. Modelo 1^b IP(CI)		4,2 (2,1-8,1)***		11,9 (5,5-25,5)	
⁴ MPO en sangre [‡]					
U/LPN x RAN	≤2,9 16/91 (18%)	3,0-4,1	4,2-5,7	≥5,8	p<0,001
Tasa de EAC		35/83 (42%)	41/79(52%)	66/80 (83%)	
IP(CI) sin ajustar	1,0	3,4 (1,7-6,8)***	5,1 (2,5-10,2)***	22,1 (10,0-48,7)	
i. Mo		3,6 (1,8-7,5)***		15,1 (6,2-36,7)	
ii. Modelo b		5,3 (2,7-10,5)***		20,4 (8,9-47,2)	
iii. GB x 10³/mm³	≤5,78 24/85 (28%)	5,79-7,32	7,33-9,02	≥9,03	p<0,001
Tasa de EAC		46/82 (56%)	38/83 (46%)	50/83 (60%)	
IP(CI) sin ajustar	1,0	3,2 (1,7-6,2)***	2,1 (1,1-4,1)*	3,9 (2,0-7,3)***	
iv. Ajuste		3,0 (1,6-5,7)***		4,3 (2,1-8,9)***	
v. Fra					
Puntuación de Riesgo Global	≤4	5-7	8-9	≥10	p<0,001
Tasa de EAC	25/86 (29%)	41/114 (36%)	41/63 (65%)	51/70 (73%)	
IP(CI) sin ajustar	1,0	1,4 (0,8-2,5)	4,5(2,3-9,1)***	6,5 (3,2-13,2)***	
IP(CI) ajustado ^c		1,8 (1,0-3,3)		7,8 (3,5-17,5)***	

[0094] El contenido total de MPO en sangre depende tanto de los niveles de MPO por leucocito, así como del número total de leucocitos. Puesto los neutrófilos poseen >95% del contenido de MPO en sangre, se calculó el nivel de MPO por ml de sangre (MPO en sangre) multiplicando el contenido de MPO por veces de neutrófilos el recuento absoluto de neutrófilos. Las tasas de EAC se correlacionaron positivamente con los cuartiles de MPO en sangre (p<0,001 para la tendencia; figura 9, Tabla 2).

[0095] La MPO Leucocitaria no se correlaciona significativamente con los factores de riesgo de enfermedad arterial coronaria tradicionales: A continuación, se valoran las posibles correlaciones entre los factores de riesgo de EAC tradicionales y MPO Leucocitaria. Los niveles de MPO leucocitaria fueron independientes de la edad, el género, la diabetes, la hipertensión, tabaquismo (alguna vez o actualmente), GB, triglicéridos LDLc y el riesgo global de Framingham. Se observaron pequeñas correlaciones negativas entre la MPO leucocitaria y tanto el colesterol total (r = -0,15, p = 0,005) como HDLc (r = -0,14, p -0,01). Se observó una asociación positiva entre la MPO Leucocitaria y el recuento absoluto de neutrófilos (r = 0,20, p<0,001) y antecedentes familiares de EAC (media de MPO leucocitaria con antecedentes familiares = 15,9 frente a 14,1 sin EAC, p = 0,05). Se apreciaron correlaciones similares para la MPO en sangre.

[0096] La MPO Leucocitaria y MPO en sangre se correlacionan fuertemente con el estado de enfermedad arterial coronaria tras los ajustes para un único o múltiples factores de riesgo: Para evaluar si la MPO Leucocitaria y la MPO en sangre se asocian independientemente con el estado de EAC, se ajustaron los índices de probabilidades para los cuartiles de la MPO Leucocitaria y la MPO en sangre para factores de riesgo de EAC tradicionales individuales. Los índices de probabilidades tanto para el cuartil central (2 más 3) como el superior (4), con respecto al inferior (1), de tanto la MPO Leucocitaria como la MPO en sangre permanecieron altamente correlacionados con el estado de la EAC tras los ajustes para los factores de riesgo de la EAC tradicionales individuales, GB y la puntuación de riesgo global de Framingham (datos no mostrados), con índices de

probabilidades que variaban de 8,4 (CI = 4,2-16,9, $p < 0,001$) después del ajuste para HDLc a 13.5 (CI = 6,3-29,1, $p < 0,001$) después del ajuste para tabaquismo. La diabetes, hipertensión, tabaquismo, y a un menor grado, la edad, HDLc, riesgo global de Framingham y los GB, también permanecieron como predictores significativos para el estado de la EAC tras los ajustes de un único factor. Se observaron resultados similares para la MPO en sangre tras los ajustes de un único factor para los factores de riesgo de EAC tradicionales individuales (datos no mostrados).

[0097] Después, se realizaron análisis de regresión de multivariable usando varios modelos (Tabla 2, figura 10). El modelo 1 examinó la MPO leucocitaria y en sangre tras el ajuste simultáneo para cada uno de los factores de riesgo individuales que se correlacionaron significativamente con la EAC en la etapa anterior (es decir, regresión univariable). La MPO Leucocitaria permaneció como el predictor más fuerte del estado de EAC con un IP ajustado de 8,5 (CI = 3,7-19,7, cuartil medio frente a inferior) y 20,3 (CI = 7,9-52,1, cuartil superior frente a inferior). El índice de probabilidades ajustado para los GB, un marcador que predice el aumento del riesgo para EAC (2; 3; 23-25), fue 1,1 (CI = 1,02-1,21). Un segundo modelo de regresión que se ajustó para el riesgo global de Framingham y los GB produjo IP para la MPO Leucocitaria que correspondían con el IP mayor observado en el Modelo 1 (IP central frente a inferior = 4,2; IP superior frente a inferior = 11,9). Los IP ajustados para la puntuación de riesgo global de Framingham y los GB también fueron significativos. Asimismo, la MPO en sangre permaneció como un predictor fuerte del estado de EAC tras los ajustes de multivariabiles comparados con los factores de riesgo de EAC tradicionales, la puntuación de riesgo global de Framingham y los GB (Tabla 2)

20 EJEMPLO 2: Análisis de Citometría de Flujo de Muestras de Sangre de Sujetos con y sin EAC.

[0098] Las muestras de sangre de pacientes cuyos leucocitos tienen niveles por encima o por debajo de lo normal de MPO se analizaron por citometría de flujo. La sangre completa de cada paciente se inyectó en un analizador hematológico que identifica leucocitos en base a la tinción citoquímica de peroxidasa *in situ* (el Advia 120 de Bayer). En el instrumento, en primer lugar, la sangre completa se lisa y los GB intactos se calientan/fijan con formaldehído. Después, los sustratos de peroxidasa (peróxido ácido y un cromóforo) se incuban con los leucocitos, y las células teñidas resultantes se examinan por citometría de flujo (20 se de tiempo total entre la inyección de la muestra y el citograma obtenido). Los resultados se muestran en la figura 11. Los grupos de células mostrados en diferentes colores se refieren a: 1) Púrpura - neutrófilos; 2) Verde - monocitos; 3) Azul Oscuro - Linfocitos; 4) Amarillo - eosinófilos; 5) Turquesa - células grandes sin teñir; 6) Blanco - GR fantasmas/ruido. En base a estos datos, se indica el recuento de glóbulos blancos total (RGB) y un diferencial (% de distribución de neutrófilos, monocitos, eosinófilos y linfocitos).

[0099] La ubicación de una posición de un grupo de células dado en el citograma se refiere a su intensidad de absorción de luz (eje Y - una propiedad que se refiere a la actividad de la peroxidasa y, por lo tanto, la intensidad de la tinción) y la dispersión de la luz (eje X - una propiedad que se refiere tanto al tamaño como a la granularidad/índice de refracción, propiedades vinculadas a la actividad y la tinción de la peroxidasa).

[0100] El panel izquierdo ilustra el citograma de un individuo cuyo nivel de MPO por neutrófilo (también conocido como MPO leucocitaria) está por debajo de la media en una población (por ejemplo inferior al 25%). El panel derecho ilustra la ubicación del citograma de un individuo cuyo nivel de MPO por neutrófilo (también conocido como MPO leucocitaria) está por encima de la media en una población (por ejemplo, 50-75%). Debe apreciarse que la ubicación del grupo de neutrófilos en el eje X e Y es diferente y, en general, la MPO superior se desplaza a la derecha. Además, la inclinación del eje principal de la elipse que comprende el grupo de neutrófilos es diferente. Estos cambios llevan información relacionada con el contenido de MPO en ese tipo celular.

[0101] A través del uso de modelado y patrones con un contenido de peroxidasa conocido, se pueden desarrollar curvas típicas para usar esta información con el fin de identificar el nivel relativo de peroxidasa por leucocito. Es posible realizar el mismo tipo de análisis para los monocitos, el otro tipo celular principal en la sangre con MPO. La tinción de la peroxidasa en los eosinófilos se debe a la peroxidasa eosinofílica, una enzima relacionada con la MPO, pero un producto génico diferente.

EJEMPLO 3: Niveles de Ditirosina en Sangre de Sujetos Humanos con y sin EAC

[0102] Los niveles de ditirosina unida a proteína se midieron en muestras de sangre de 112 individuos con EAC y de 128 sujetos de control aparentemente sanos. Los niveles se midieron mediante HPLC con detección de fluorescencia en línea y se cuantificaron usando una curva de calibración externa generada con ditirosina sintética. Los resultados se normalizaron con respecto al contenido del aminoácido precursor, la tirosina, que se cuantificó simultáneamente por HPLC con detección de matriz de diodos en línea. Los resultados demostraron que los sujetos

con EAC tenían mayores niveles (aumento del 50%, $P < 0,001$ para la comparación de EAC frente a sujetos sanos) de ditirosina en su suero que los observados en el suero de sujetos de edad y sexo equiparables sanos.

EJEMPLO 4: Niveles de Nitrotirosina en Sangre de Sujetos Humanos con y sin EAC.

5

[0103] Los niveles de 3-nitrotirosina unida a proteína se midieron en muestras de sangre de los mismos sujetos que en el Ejemplo 3 donde se examinaron 112 individuos con EAC y 128 sujetos de control aparentemente sanos. Los niveles de nitrotirosina se midieron por HPLC con espectrometría de masas en tándem de ionización por electronebulización en línea (CL/IEN/EM/EM) usando técnicas de dilución con isótopos estable. Los resultados se normalizaron con respecto al contenido del aminoácido precursor, la tirosina, que se cuantificó simultáneamente por CL/IEN/EM/EM con dilución de isótopos estable. Los resultados demostraron que los sujetos con EAC tenían mayores niveles (aumento de 2,8 veces, $P < 0,001$ para la comparación de EAC frente a sujetos sanos) de nitrotirosina en su suero que sujetos de edad y sexo equiparables sanos.

EJEMPLO 5: Niveles en sangre de HETE, HODE y F2Isoprostanos en Sujetos Humanos con y sin EAC.

[0104] Los niveles de HETE, HODE y F2Isoprostanos se midieron en muestras de sangre de los mismos sujetos que en el Ejemplo 3 donde se examinaron 112 individuos con EAC y 128 sujetos de control aparentemente sanos. Los lípidos se midieron por HPLC con espectrometría de masas en tándem de ionización por electronebulización en línea (CL/IEN/EM/EM). Los resultados se normalizaron con respecto al contenido del lípido precursor (ácido araquidónico para HETE y F2Isoprostanos, y ácido linoleico para HODE), que se cuantificaron simultáneamente por CL/IEN/EM/EM. Los resultados demostraron que los sujetos con EAC tenían mayores niveles de cada uno de los productos de oxidación en su plasma que sujetos de edad y sexo equiparables sanos. Los niveles de F2Isoprostano fueron mayores del 80% en plasma obtenido de sujetos con EAC frente a sujetos sin EAC, $P < 0,001$; los niveles de HETE y HODE fueron mayores del 60% en sujetos con EAC frente a sujetos sin EAC, $P < 0,001$).

EJEMPLO 6: Niveles en Sangre de Productos de Oxidación Lipídica Generados por MPO en Sujetos Humanos con y sin EAC.

[0105] Los niveles de productos de oxidación fosfolipídica mostraban que se generaban por MPO (G-PC y ND-PC, los monoésteres glutáricos y nonanodioicos de 2-lisoPC; HDdA-PC y HODdA-PC, el ácido 9-hidroxi-10-dodecenedioico y ésteres del ácido 5-hidroxi-8-oxo-6-octenedioico de 2-lisoPC; HODA-PC y HOOA-PC, el ácido 9-hidroxi-12-oxo-10-dodecenoico y ésteres del ácido 5-hidroxi-8-oxo-6-octenoico de 2-lisoPC; KODA-PC y KOOA-PC, el ácido 9-ceto-12-oxo-10-dodecenoico y ésteres del ácido 5-ceto-8-oxo-6-octenoico de 2-lisoPC; KDdA-PC y KODdA-PC, el ácido 9-ceto-10-dodecendioico y ésteres del ácido 5-ceto-6-octendioico de 2-lisoPC; OV-PC y ON-PC, el ácido 5-oxovalerico y ésteres del ácido 9-oxononanoico de 2-lisoPC; se midieron en muestras de sangre de 25 sujetos con EAC y 12 sujetos de control aparentemente sanos. Además, los niveles de colesterol α -epóxido, 5-colesten-5 α ,6 α -epoxi-3 β -ol; colesterol β -epóxido, 5-colesten-5 β ,6 β -epoxi-3 β -ol; 7-OH-colesterol, 5-colesten-3 β ,7 β -diol; 25-OH colesterol, 5-colesten-3 β ,25-diol; 7-OOH colesterol, 5-colesten-3 β -ol-7 β -hidroperóxido; triol, colestén-3 β ,5 α ,6 β -triol) se midieron en muestras de sangre de 25 sujetos con EAC y 12 sujetos de control aparentemente sanos. Los lípidos se midieron por HPLC con espectrometría de masas en tándem de ionización por electronebulización en línea (CL/IEN/EM/EM) usando procedimientos establecidos. Los resultados se normalizaron con respecto al contenido del lípido precursor (PAPC, 1-hexadecanoil-2-eicosatetra-5',8',11',14'-enoil-sn-glicero-3-fosfocolina; PLPC, 1-hexadecanoil-2-octadecadi-9',12'-enoil-sn-glicero-3-fosfocolina; o colesterol), que se cuantificaron simultáneamente por CL/IEN/EM/EM. Los resultados demostraron que los sujetos con CAD tenían mayores niveles (50% en 4 veces, dependiendo del lípido) de cada uno de los productos de oxidación de fosfolípidos en su plasma que sujetos de edad y sexo equiparables sanos.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de diagnóstico para caracterizar el riesgo de un paciente humano de desarrollar o presentar una enfermedad cardiovascular seleccionada entre aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad
5 cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, o un trastorno cardiovascular seleccionado entre infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios y insuficiencia cardíaca congestiva, que comprende:
 - a) obtener los niveles de actividad de la mieloperoxidasa (MPO), la masa de la mieloperoxidasa (MPO), o ambas en
10 una muestra corporal de un paciente humano, en el que dicha muestra corporal es sangre, o un derivado de sangre obtenido a partir de dicha sangre seleccionado entre leucocitos, neutrófilos, monocitos, suero y plasma; y
 - b) comparar los niveles de la actividad de la mieloperoxidasa (MPO), la masa de la mieloperoxidasa (MPO), o
15 ambas, respectivamente, en la muestra corporal de un paciente humano con uno o dos valores predeterminados; en el que niveles más altos indican el mayor riesgo del paciente humano de desarrollar o presentar dicha enfermedad cardiovascular o dicho trastorno cardiovascular.
2. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el nivel de actividad de
20 la mieloperoxidasa en la muestra corporal de un paciente humano se obtiene mediante citometría de flujo.
3. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que uno de dicho uno o dos valores predeterminados es un único valor normalizado o un intervalo de valores normalizados, y se basa en los
25 niveles de actividad de la MPO en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos.
4. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que uno de dicho uno o dos valores predeterminados es un único valor representativo o un intervalo de valores representativos, y se basa en
30 los niveles de actividad de la MPO en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos.
5. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que uno de dicho uno o dos valores predeterminados es una pluralidad de intervalos de niveles de la actividad de la MPO predeterminados
35 que se basan en los niveles de actividad de la MPO en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos, y dicha etapa de comparación comprende determinar en cuál de dicha pluralidad de intervalos de niveles de la actividad de la MPO predeterminados se sitúa el nivel de actividad de la MPO de un paciente humano.
6. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el
40 que los niveles de masa de la MPO en la muestra corporal de un paciente humano se obtienen mediante una técnica inmunológica.
7. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el
45 que uno de dicho uno o dos valores predeterminados es un único valor normalizado o un intervalo de valores normalizados, y se basa en los niveles de masa de la MPO en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos.
8. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el
50 que uno de dicho uno o dos valores predeterminados es un único valor representativo o un intervalo de valores representativos, y se basa en los niveles de masa de la MPO en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos.
9. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el
55 que uno de dicho uno o dos valores predeterminados es una pluralidad de intervalos de niveles de masa de la MPO predeterminados que se basan en los niveles de masa de la MPO en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos, y dicha etapa de comparación comprende determinar en cuál de dicha pluralidad de intervalos de niveles de masa de la MPO predeterminados se sitúa el nivel de masa de la MPO de un paciente humano.

10. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha muestra corporal es plasma.
11. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha muestra corporal es suero.
12. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha muestra corporal son neutrófilos obtenidos de dicha sangre.
- 10 13. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicha muestra corporal son monocitos obtenidos de dicha sangre.
14. Un procedimiento de diagnóstico para caracterizar el riesgo de un paciente humano de desarrollar o presentar una enfermedad cardiovascular seleccionada entre aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, o un trastorno cardiovascular seleccionado entre infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios e insuficiencia cardíaca congestiva, que comprende:
15 a) obtener los niveles de uno o más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa seleccionados en una muestra corporal de un paciente humano,
20 en el que dicha muestra corporal es orina, sangre o un derivado de sangre seleccionado entre leucocitos, neutrófilos, monocitos, suero y plasma,
25 en el que cada uno de dicho uno o más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa seleccionados se selecciona entre nitrotirosina, ditirosina y sulfóxido de metionina; y
b) comparar los niveles de cada uno de dicho uno o más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa seleccionados en la muestra corporal de un paciente humano con un valor predeterminado;
30 en el que niveles más altos indican el mayor riesgo del paciente humano de desarrollar o presentar dicha enfermedad cardiovascular o dicho trastorno cardiovascular.
15. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 14, en el que uno de dicho uno o 35 más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa seleccionados es ditirosina, nitrotirosina.
16. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con la reivindicación 14, en el que uno de dicho uno o más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa seleccionados es nitrotirosina.
- 40 17. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el valor predeterminado es un único valor representativo o un intervalo de valores representativos, y se basa en los niveles de dicho producto de oxidación de mieloperoxidasa seleccionado en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos.
- 45 18. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el que el valor predeterminado es una pluralidad de intervalos de niveles de la actividad de la MPO predeterminados que se basan en los niveles de dicho producto de oxidación de mieloperoxidasa seleccionado en muestras corporales comparables de la población general o una población seleccionada de sujetos humanos, y dicha etapa de comparación comprende determinar en cuál de dicha pluralidad de intervalos de producto de oxidación generado por 50 mieloperoxidasa seleccionados predeterminados se sitúa el nivel del producto de oxidación generado por mieloperoxidasa seleccionado de un paciente humano.
19. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que dicha muestra corporal es plasma.
- 55 20. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que dicha muestra corporal es suero.
21. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el

que dicha muestra corporal son neutrófilos.

22. Un procedimiento de diagnóstico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, en el que dicha muestra corporal son monocitos.

23. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:

c) obtener los niveles de un producto de oxidación generado por mieloperoxidasa seleccionado en dicha muestra corporal,

en el que dicho producto de oxidación generado por mieloperoxidasa seleccionado se selecciona entre nitrotirosina libre, nitrotirosina unida a péptido, ditirosina libre, ditirosina unida a péptido, sulfóxido de metionina libre, sulfóxido de metionina unido a péptido y un producto de peroxidación lipídica generado por MPO seleccionado entre ácidos hidroxi-eicosatetraenoicos (HETE); ácidos hidroxi-octadecadienoicos (HODE), F2Isoprostanos; los monoésteres glutáricos y nonanodioicos de 2-lisoPC (G-PC y ND-PC, respectivamente); el ácido 9-hidroxi-10-dodecenedioico y ésteres del ácido 5-hidroxi-8-oxo-6-octenedioico de 2-lisoPC (HDdiA-PC y BOdiA-PC, respectivamente); el ácido 9-hidroxi-12-oxo-10-dodecenoico y ésteres del ácido 5-hidroxi-8-oxo-6-octenoico de 2-lisoPC (HODA-PC y HOOA-PC, respectivamente); el ácido 9-ceto-12-oxo-10-dodecenoico y ésteres del ácido 5-ceto-8-oxo-6-octenoico de 2-lisoPC (KODA-PC y KOOA-PC, respectivamente); el ácido 9-ceto-10-dodecendioico y ésteres del ácido 5-ceto-6-octendioico de 2-lisoPC (KDdiA-PC y KOdiA-PC, respectivamente); el ácido 5-oxovalérico y ésteres del ácido 9-oxononanoico de 2-lisoPC (OV-PC y ON-PC, respectivamente); 5-colesten-5 α ,6 α -epoxi-3 β -ol (colesterol α -epóxido); 5-colesten-5 β -6 β -epoxi-3 β -ol (colesterol β -epóxido); 5-colesten-3 β ,7 β -diol (7-OH-colesterol); 5-colesten-3 β ,25-diols (25-OH colesterol); 5-colesten-3 β -ol-7 β -hidroperóxido (7-OOH colesterol); y colestano-3 β ,5 α ,6 β -triol (triol); y

d) comparar el nivel de dicho producto de oxidación generado por mieloperoxidasa seleccionado en la muestra corporal con un valor predeterminado adicional;

en el que niveles elevados de la etapa b y la etapa d indican el mayor riesgo de un paciente humano de desarrollar o presentar dicha enfermedad cardiovascular o dicho trastorno cardiovascular.

24. Un procedimiento para evaluar un agente terapéutico para una enfermedad cardiovascular seleccionada entre aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, o un trastorno cardiovascular seleccionado entre infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios e insuficiencia cardíaca congestiva, en un sujeto que se sospecha que tiene, o que tiene, dicha enfermedad cardiovascular o dicho trastorno cardiovascular, que comprende:

comparar los niveles de uno o más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa (MPO) seleccionados en una muestra corporal tomada del sujeto después del tratamiento con dicho agente terapéutico con los niveles de uno o más productos de oxidación generados por mieloperoxidasa (MPO) seleccionados en una muestra corporal correspondiente tomada del sujeto antes del tratamiento con dicho agente terapéutico,

en el que dicha muestra corporal es sangre, un derivado de sangre seleccionado entre leucocitos, neutrófilos, monocitos, suero y plasma, u orina, y

en el que dicho uno o más productos de oxidación generados por MPO seleccionados se seleccionan entre ditirosina libre, ditirosina unida a péptido, nitrotirosina libre o nitrotirosina unida a péptido, sulfóxido de metionina libre y sulfóxido de metionina unido a péptido.

25. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 24, que comprende adicionalmente la etapa de comparar los niveles de un segundo predictor de riesgo en la muestra de sangre tomada del sujeto después del tratamiento con dicho agente terapéutico con niveles de dicho segundo factor de riesgo en una muestra corporal correspondiente tomada del sujeto antes del tratamiento,

en el que el segundo predictor de riesgo se selecciona entre LDL, proteína C reactiva, colesterol total, colesterol HDL, triglicéridos, relación LDL/HDL, Lp(a), Interleucina 6, un producto de peroxidación lipídica generado por MPO y homocisteína.

26. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 25, en el que dicho producto de peroxidación lipídica generado por MPO se selecciona entre HETE, HODE y F2Isoprostanos.

27. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 26, en el que dicho producto de peroxidación lipídica generado por MPO se selecciona entre G-PC, ND-PC, HDdiA-PC, HOdiA-PC, HODA-PC, HOOA-PC, KODA-PC, KOOA-PC, KDdiA-PC, KOdiA-PC, OV-PC y ON-PC.

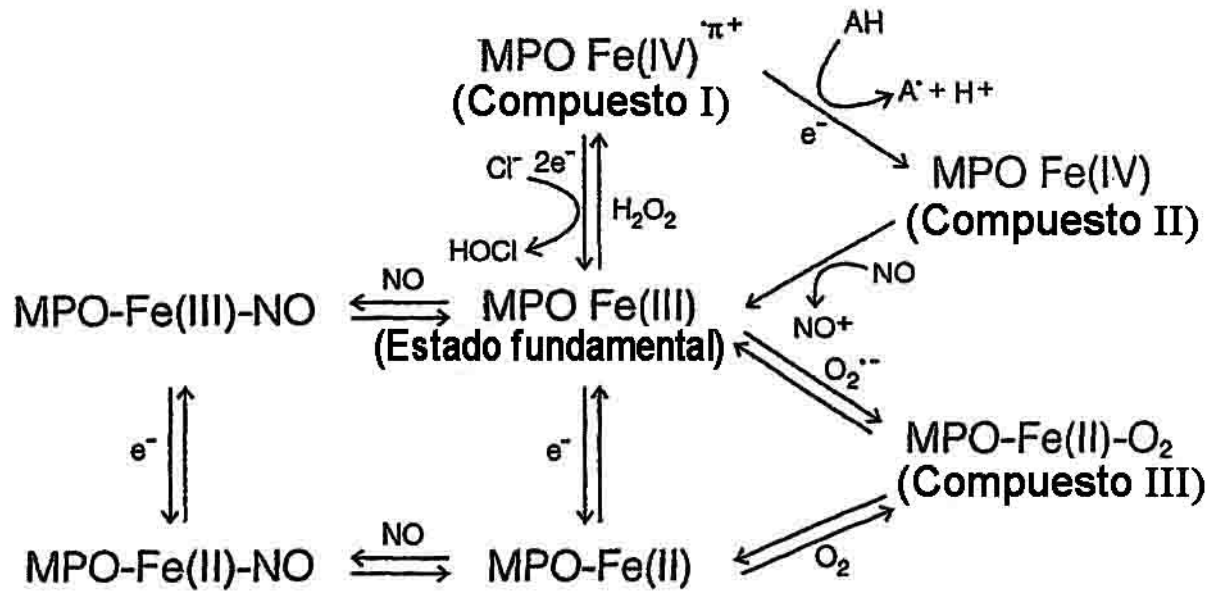


Fig. 1. Modulo cinético para mieloperoxidasa

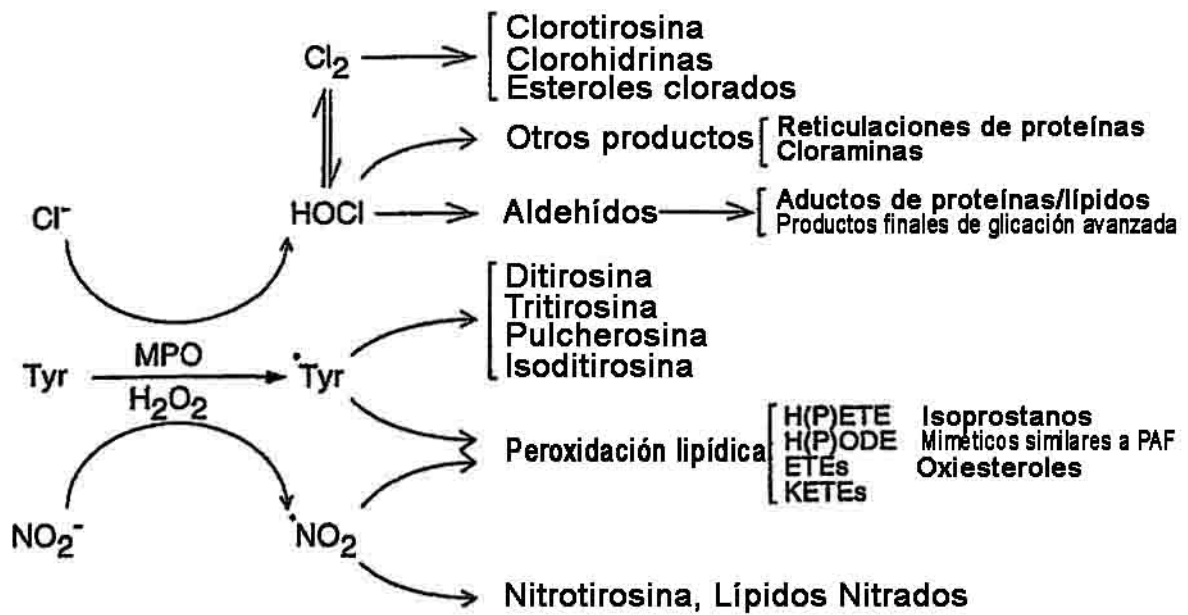


Fig. 2. Oxidantes reactivos generados por mieloperoxidasa y sus productos

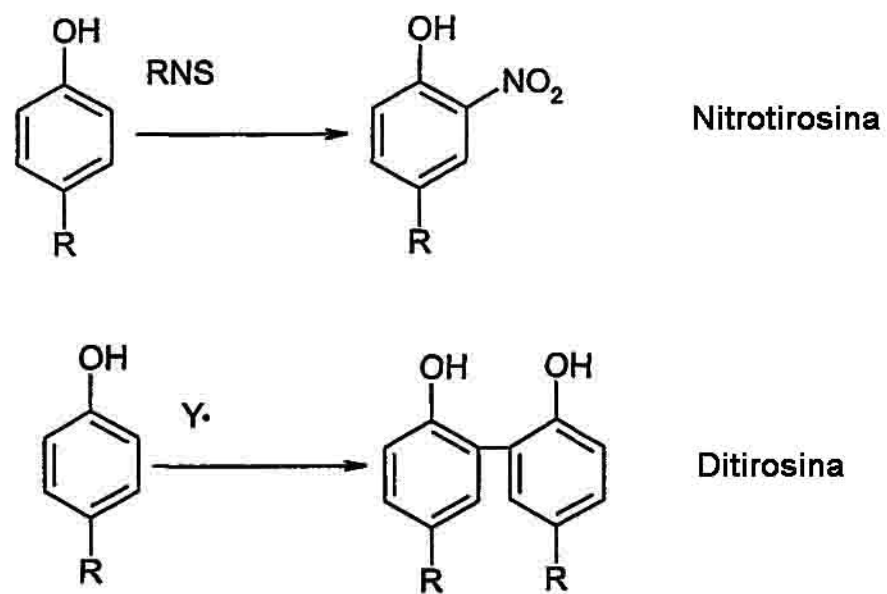


Figura 3

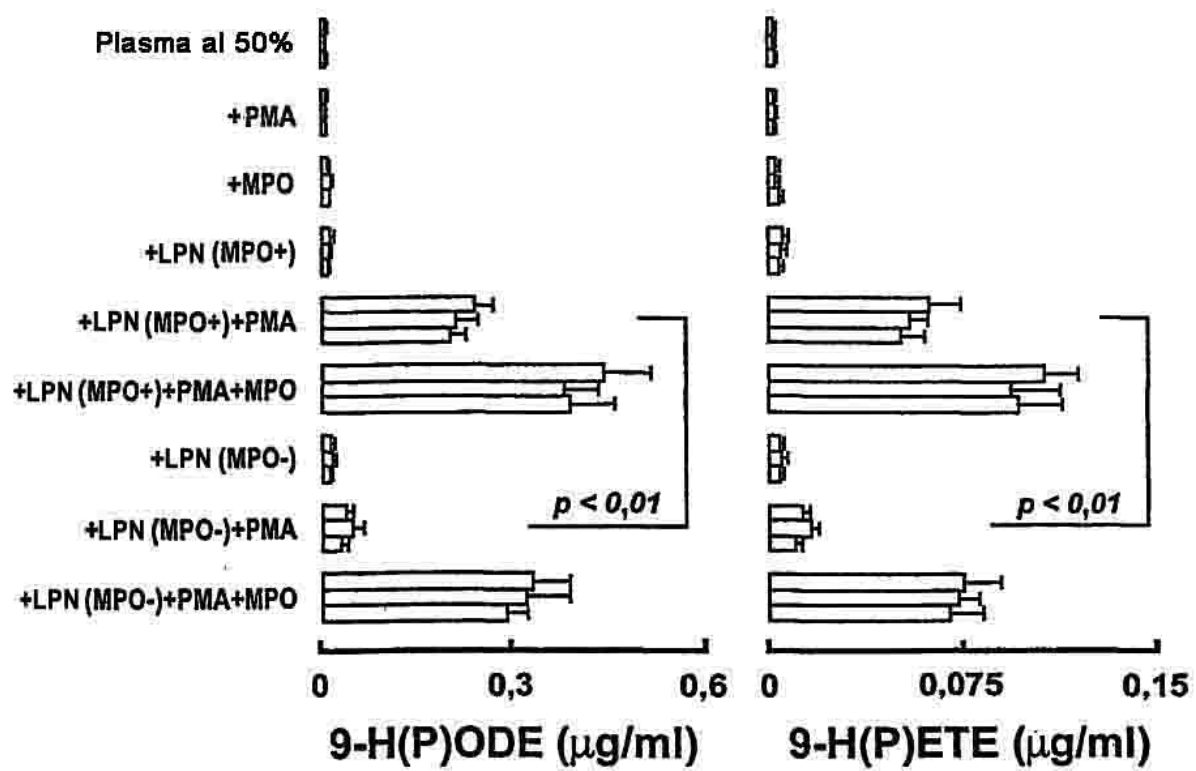


Figura 4

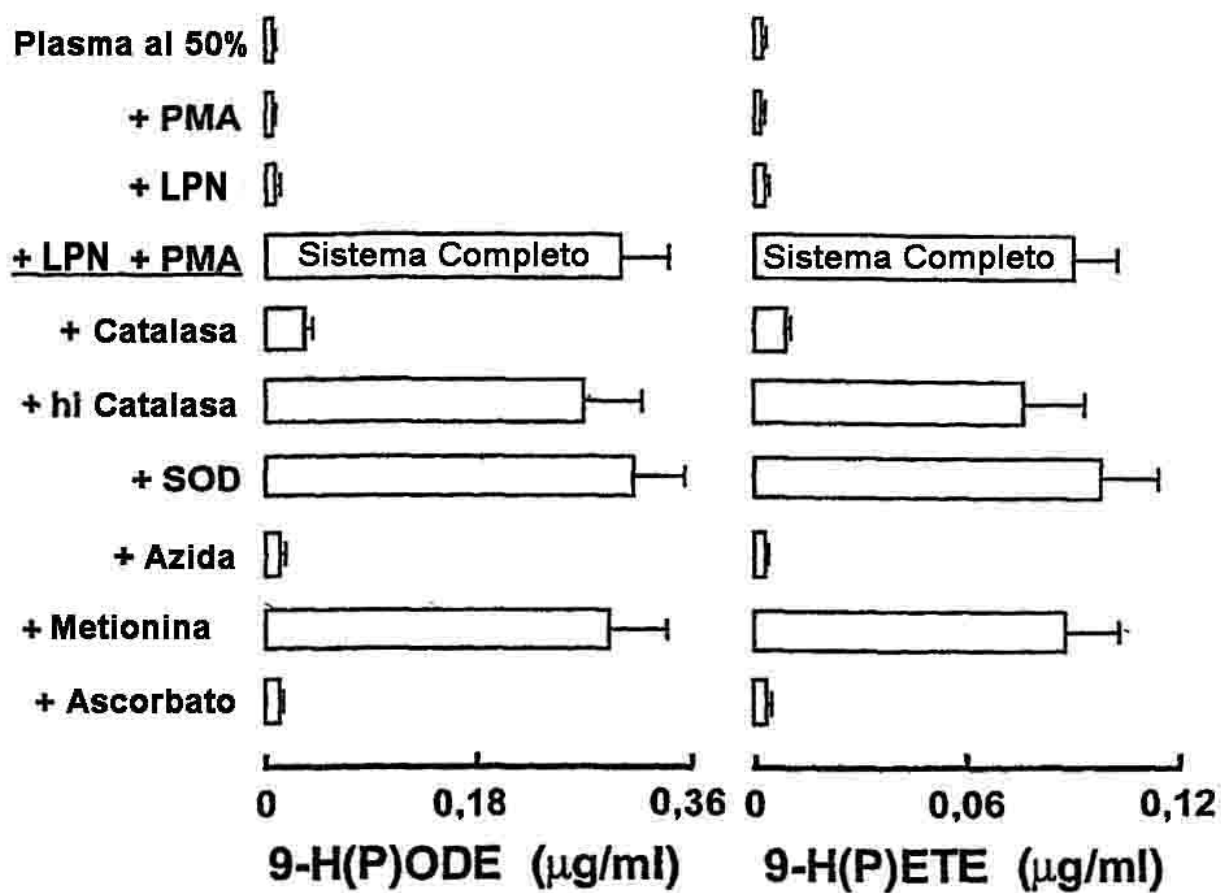


Figura 5

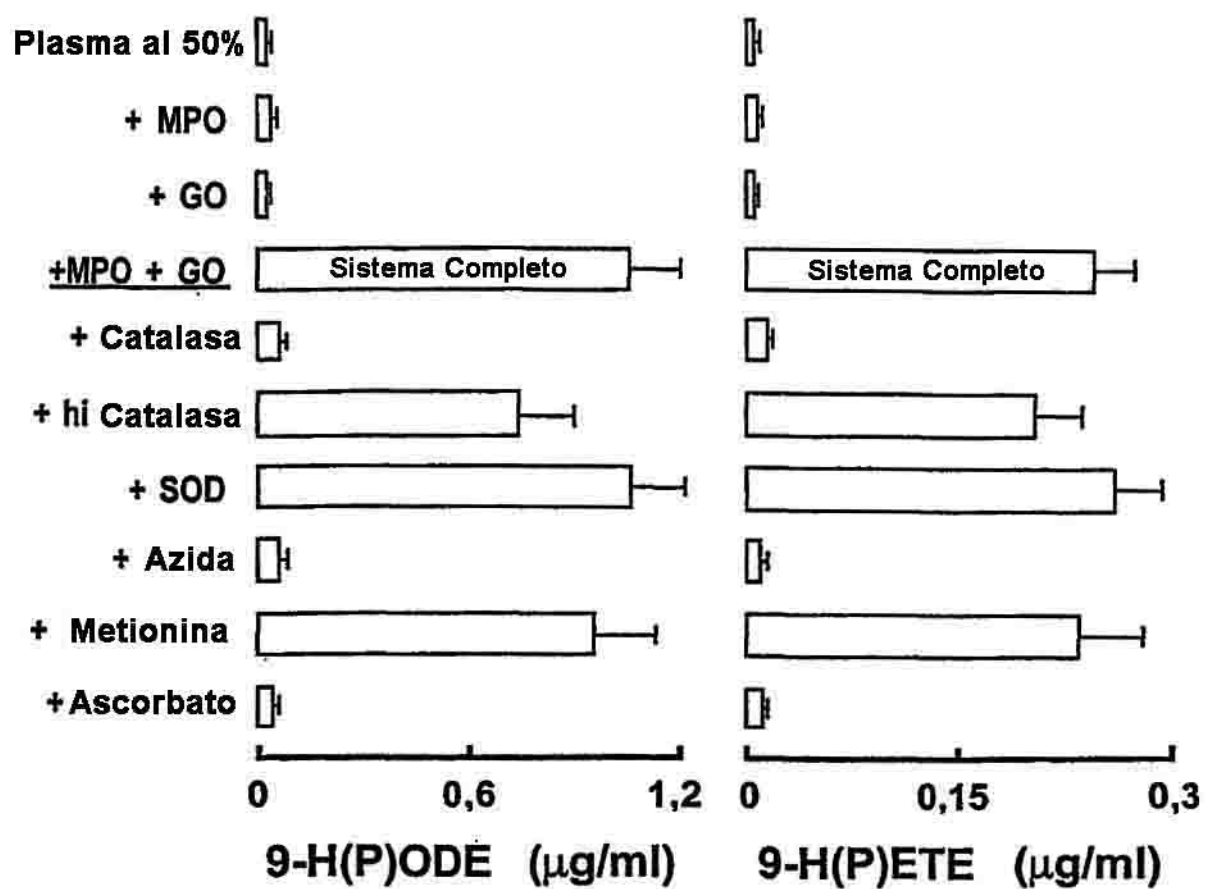


Figura 6

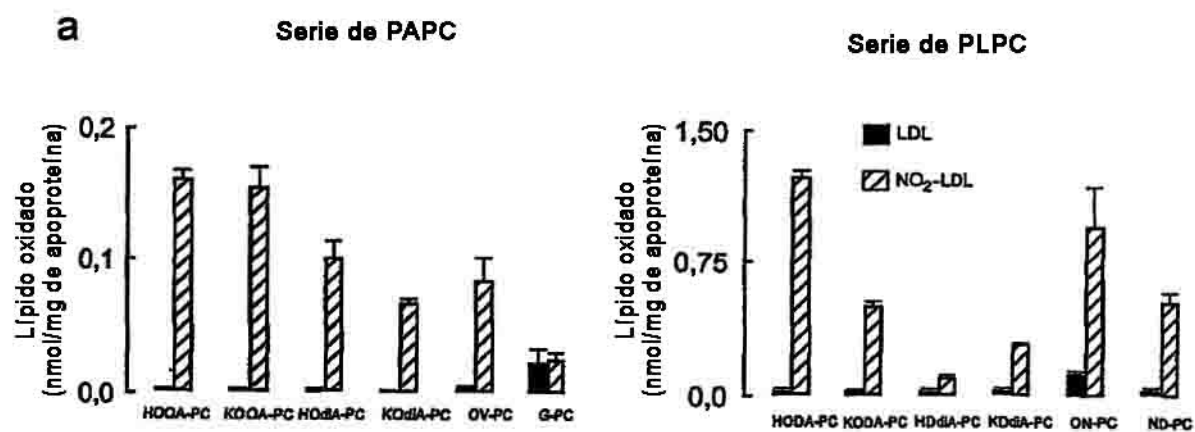


Figura 7

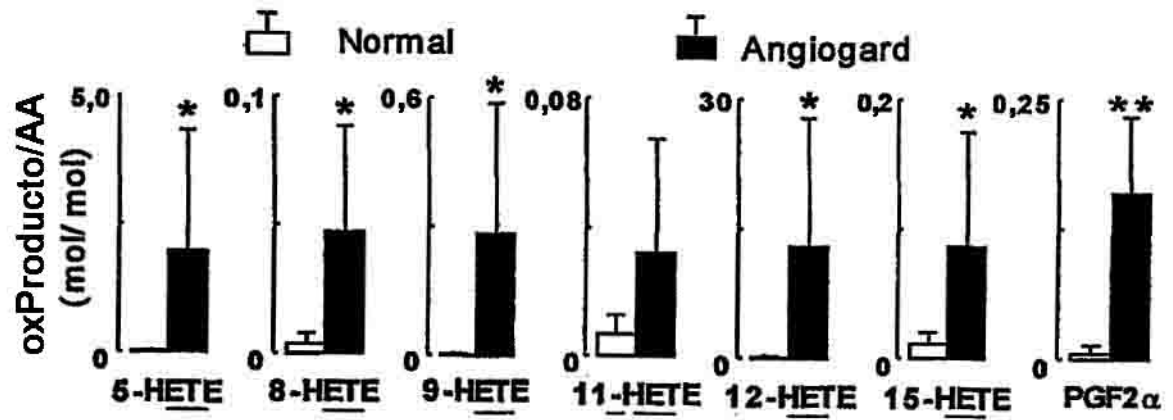


Figura 8

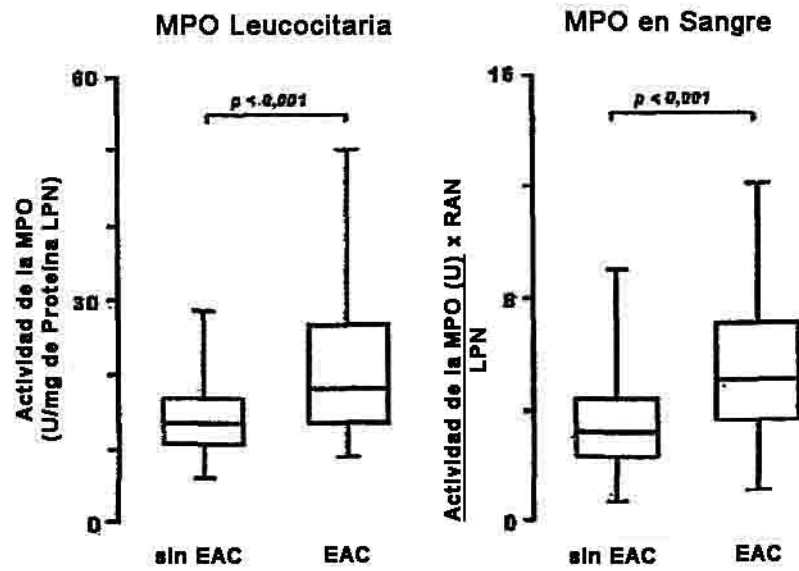


Figura 9

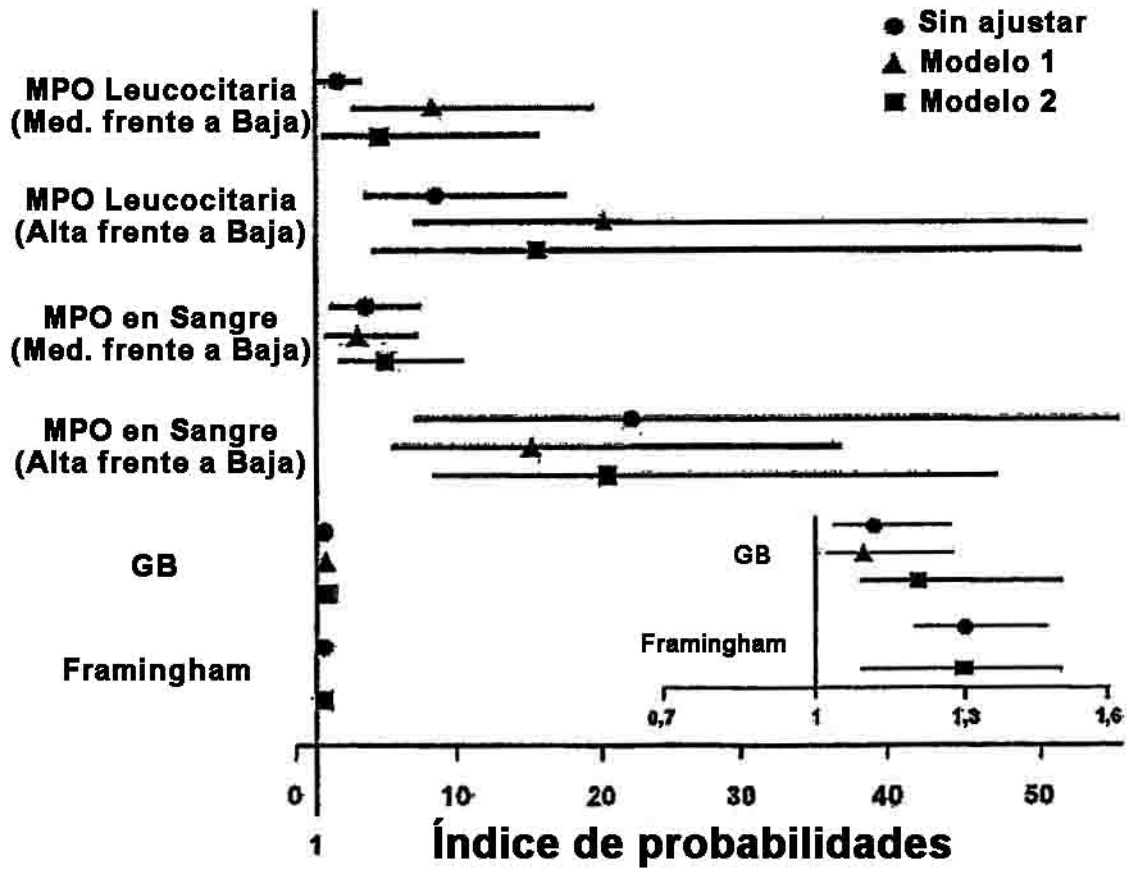


Figura 10

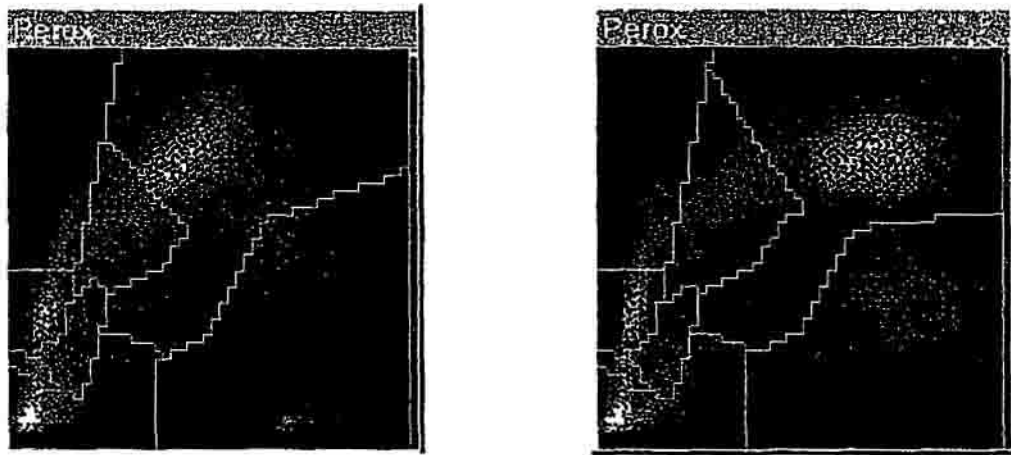


Figura 11