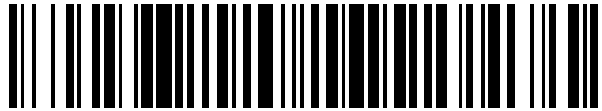


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 140**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.12.2010 E 10805642 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2507634**

54 Título: **Uso de fosfolipasas A2 secretadas en el diagnóstico y tratamiento de la malaria**

30 Prioridad:

03.12.2009 EP 09290901

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.08.2014

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (33.3%)**

3, rue Michel-Ange

75016 Paris, FR;

UNIVERSITE DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS

(33.3%) y

MUSEUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

(33.3%)

72 Inventor/es:

DEREGNAUCOURT, CHRISTIANE;

LAMBEAU, GÉRARD;

GUILLAUME, CAROLE y

SCHREVEL, JOSEPH

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 488 140 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

Uso de fosfolipasas A2 secretadas en el diagnóstico y tratamiento de la malaria.

5 La presente invención se refiere al uso de fosfolipasas A₂ secretadas en el diagnóstico y tratamiento de la malaria.

Los tejidos humanos secretan fosfolipasas A2 de bajo peso molecular (denominadas "PLA2 secretadas" o "sPLA2"; EC 3.1.1.4) que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos en la posición *sn*-2 para liberar ácidos grasos (tales como ácido araquidónico) y lisofosfolípidos. Los lisofosfolípidos son ácidos grasos que son biológicamente activos como
 10 precursores de potentes mediadores lipídicos bioactivos. Dichos mediadores lipídicos son elementos importantes en la inflamación, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (Kudo y Murakami 2002; Nakanishi y Rosenberg, 2006; Sun y col., 2007). Además de la posible función de las sPLA2 humanas en la producción de mediadores lipídicos, las pruebas acumuladas indican que es posible que estas enzimas participen en la inmunidad innata, en especial en la primera línea de defensa del hospedante contra bacterias y otros patógenos (Lambeau y Gelb, 2008; Nevalainen y
 15 col., 2008). Las sPLA2 humanas comparten propiedades características comunes: numerosos enlaces disulfuro, masas moleculares bajas (13-18 kDa), restos de histidinilo y aspartilo catalíticos, y concentraciones milimolares de requisito de calcio para la actividad catalítica óptima. Sin embargo, los diferentes parálogos de sPLA2 humana no son isoformas estrechamente relacionadas puesto que la identidad de aminoácidos entre cualesquiera dos de estas está comprendida entre 15 % y 50 %. Además, los diferentes parálogos tienen propiedades enzimáticas muy
 20 diferentes (Singer y col., 2002) así como distinta distribución tisular, regulación de la expresión y funciones biológicas emergentes (Murakami y col., 2010).

La familia de sPLA2 humanas comprende hasta ahora 9 enzimas catalíticamente activas y 2 proteínas de tipo sPLA2 catalíticamente inactivas (XIIB y otoconina-95). Se han clasificado como grupos (G) IB (Seilhamer y col., 1986), IIA
 25 (Kramer y col., 1989; Seilhamer y col., 1989), IID (Ishizaki y col., 1999), IIE (Suzuki y col., 2000), IIF (Valentin, 2000b), III (Valentin, 2000a), V (Chen y col., 1994), X (Cupillard y col., 1997) y XIIA (Gelb et al., 2000), XIIB (Rouault, M., y col., 2003) y otoconina-95 (véanse también las revisiones de Schaloske y Dennis, 2006; Lambeau y Gelb, 2008 y Murakami y col., 2010). La sPLA2 GIB (sPLA2 de tipo pancreático) y sPLA2 GIIA (sPLA2 de tipo inflamatorio) fueron las dos primeras sPLA2 humanas identificadas en los años 80 (Verheij y col., 1981 y Kramer et al., 1989). Los
 30 otros miembros de la familia de sPLA2 humanas se clonaron a finales de los 90 y más tarde (para una revisión véase Valentin y col., 2000c y Murakami y col., 2010).

Diferentes propiedades enzimáticas y distribución tisular y/o localizaciones celulares únicos de estas sPLA2 sugieren función o funciones fisiológicas distintas para cada enzima (para revisiones véase Lambeau y Gelb, 2008 y
 35 Murakami y col., 2010). Algunas parece que tienen una función en diferentes enfermedades inflamatorias, tales como los grupos IIA y V (Gilroy y col., 2004; Triggiani y col., 2005) y algunas presentan propiedades bactericidas contra bacterias Gram positivas y/o Gram negativas, tales como los grupos IIA, X, V, XII, IIE, IB, IIF (Koduri y col., 2002; Lambeau y Gelb, 2008).

40 De hecho, las diferentes sPLA2 humanas ejercen funciones muy especializadas y no redundantes en diferentes tejidos y contextos biológicos (Murakami y col., 2010). En efecto:

- las diferentes sPLA2 son expresadas en un número limitado de tejidos y células, se pueden encontrar en diferentes sitios en un solo tejido, y su expresión es regulada de modo diferencial de acuerdo con las etapas de la enfermedad
 45 (Murakami y col., 2010); p. ej., la detección de niveles altos de sPLA2 GIIA en diferentes sitios inflamados sugiere su implicación en la patogénesis de respuestas inflamatorias; su concentración en el suero y tejidos se correlaciona con la gravedad de la enfermedad en diferentes patologías inflamatorias inmunomediadas (Kudo y Murakami, 2002; Nevalainen y col., 2008; Menschikowski y col., 2006);

50 - algunas sPLA2 tienen actividades enzimáticas altas y específicas frente a determinados fosfolípidos mientras que otras sPLA2 tienen actividades muy bajas frente a muchos sino todos los tipos de fosfolípidos (Singer y col., 2002);

- unas pocas sPLA2 tienen capacidad para hidrolizar lipoproteínas y producir la liberación de mediadores lipídicos de membranas celulares (Singer y col., 2002 y Sato y col., 2008);

55 - algunas sPLA2, sean muy o poco activas enzimáticamente, se pueden unir a diferentes proteínas unidas a membrana y solubles (Lambeau y col., 2008);

- están surgiendo pruebas que indican que algunas sPLA2 ejercen funciones diferentes e incluso opuestas dentro

del mismo tejido *in vivo*; p. ej., tanto las sPLA2 GIIA como GV son proaterogénicas (Bostrom y col., 2007; Webb y col., 2003; Rosengren y col., 2006 y Jonsson-Rylander y col., 2008), mientras que las sPLA2 GX parece que son antiaterogénicas (Ait-Oufella y col., 2009); además, la sPLA2 GIIA es proinflamatoria, mientras que la GV es antiinflamatoria en un modelo de ratón de artritis reumatoide (Boilard y col., 2010);

5

- al contrario que la sPLA2 GIIA, parece que la sPLA2 GIID es antiinflamatoria en modelos murinos de colitis y esclerosis múltiple (von Allmen y col., 2009).

Parece a partir de lo anterior que las sPLA2 humanas actualmente se consideran isoformas funcionalmente distintas con diferentes funciones biológicas y a veces opuestas.

10

En los seres humanos infectados por malaria, se han observado en casos graves niveles anormalmente elevados de actividad de fosfolipasa A2 en la circulación (Vadas y col., 1992 y 1993). De hecho, la actividad de fosfolipasa A2 observada por Vadas y col., se atribuye a la sPLA2 GIIA humana, puesto que los anticuerpos monoclonales murinos 9C1 y 4A1 usados por Vadas y col. (1992) son específicos para la sPLA2 GIIA, y el grupo de tipo sinovial II de PLA2 detectado por Vadas y col. (1993) se sabe que es la sPLA2 GIIA humana (véase Nevalainen y col., 2005). Vadas y sus colaboradores también han descubierto que una PLA2 humana recombinante (de hecho sPLA2 GIIA) produce la lisis selectivamente de eritrocitos humanos parasitados con *P. falciparum* y sugieren que niveles altos en la circulación de PLA2 endógeno (es decir, sPLA2 GIIA) pueden contribuir a la hemólisis de eritrocitos parasitados en pacientes con malaria (Vadas y col., 1992), pero no han proporcionado ningún dato que apoye estas afirmaciones.

15

20

Se refieren quinientos millones de casos clínicos de malaria cada año y se calcula que la mortalidad está en el intervalo entre 0,7 y 2,7 millones. La amplia mayoría de los casos presenta una enfermedad febril no específica que se termina de forma relativamente fácil, pero una minoría de casos avanza a la enfermedad grave, potencialmente mortal (WHO, Management of Severe Malaria, 2000. A practical handbook, 2nd ed. Geneva: World Health Organisation). Ahora se acepta actualmente que la malaria grave es un trastorno de múltiples procesos y multisistémico extremadamente complejo. En los seres humanos la enfermedad es causada por parásitos protozoarios del género *Plasmodium*: *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*. El ciclo de vida de estos parásitos de malaria en seres humanos es esencialmente el mismo: primero los esporozoitos entran en el torrente sanguíneo y migran al hígado. Después entran en las células hepáticas (hepatocitos), donde se multiplican en merozoitos, rompen las células hepáticas y vuelven a escapar al torrente sanguíneo. Después, los merozoitos entran en los glóbulos rojos (eritrocitos), donde se desarrollan en forma anillada, después en trofozoitos (una forma de alimentación), después esquizontes (una forma de reproducción) y de nuevo en merozoitos.

25

30

P. falciparum es la causa principal de mortalidad, principalmente a través de dos complicaciones principales: malaria cerebral y anemia grave. Una característica central de la infección por *P. falciparum* es el secuestro de formas maduras (esquizontes) de eritrocitos parasitados dentro de la microvasculatura de los órganos principales del cuerpo, predominantemente en el cerebro, corazón, pulmones e intestino delgado. Los sucesos que dan como resultado el desarrollo de malaria cerebral son multifactoriales, abarcando interacciones dinámicas entre al menos tres procesos: secuestro de eritrocitos parasitados en el cerebro, hemostasia e inflamación (Van der Heyde, 2006).

40

El diagnóstico de la malaria implica la identificación del parásito de la malaria o sus antígenos en la sangre del paciente. Se puede llevar a cabo por procedimientos de microscopía (p. ej., examen de frotis de sangre periférica o ensayo Quantitative Buffy Coat (QBC)), por inmunoanálisis de antígenos de la malaria (p. ej., usando ensayos de diagnóstico rápido (RDT)) o por ensayos de reacción en cadena de la polimerasa. Sin embargo, la eficacia del diagnóstico depende de muchos factores, tales como las diferentes formas de las cuatro especies de *Plasmodium*, las diferentes fases de la esquizogonia eritrocitaria (reproducción asexual en los eritrocitos), el contenido cuantitativo de parásitos en la sangre (parasitemia), los parásitos no viables y viables persistentes en la sangre y el secuestro de los parásitos en los tejidos.

45

50

Hasta la fecha, no hay un método rápido y preciso para evaluar el riesgo de desarrollar malaria grave y/o cerebral debido a *P. falciparum*. Solo determinados síntomas clínicos tales como hipoglucemia, anemia grave o parasitemia alta, en particular cuando están combinados en un paciente, pueden alertar de posibles complicaciones, a veces demasiado tarde.

55

Están disponibles muchos fármacos antimaláricos diferentes para prevenir y/o tratar la malaria, incluyendo esquizonticidas para formas eritrocitarias de *Plasmodium*, tales como amino-4-quinolinas (p. ej., cloroquina), aminoalcoholes (p. ej., quinina), sesquiterpenos (p. ej., artemisinina) y antimetabolitos, esquizonticidas para las formas intrahepáticas de *Plasmodium* y gametocitocidas, tales como amino-8-quinolinas (p. ej., primaquina), esquizonticidas

endoeritrocitarios activos en trofozoitos endoeritrocitarios, tales como quinina (que sigue siendo el fármaco antimalárico estándar en la gestión de formas graves de malaria) y combinaciones de los mismos. Sin embargo, la resistencia de los parásitos a algunos fármacos antimaláricos es un problema cada vez más grave.

- 5 Por consiguiente, a partir de lo anterior parece que es necesario desarrollar un nuevo método de diagnóstico de la malaria, en particular de la malaria por *P. falciparum*, y nuevos tratamientos.

Los autores de la invención han mostrado previamente que el grupo de sPLA2 IA, IIA y III de venenos de serpiente e insecto presentan propiedades anti-*Plasmodium* notables *in vitro* (Deregnacourt y Schrével, 2000; Guillaume y col., 10 2004). Han observado que las sPLA2 de veneno pueden matar indirectamente *P. falciparum* por hidrólisis de lipoproteínas del suero contenidas en el medio de cultivo del parásito, generando lípidos tóxicos, en especial ácidos grasos libres que median la muerte del parásito (Guillaume y col., 2006). Específicamente, la sPLA2 de veneno de abeja (*Apis mellifera*) ha demostrado actuar principalmente por este mecanismo indirecto (Guillaume y col., 2006).

15 Ahora, los autores de la invención han investigado las propiedades anti-*Plasmodium* de las sPLA2 humanas. Sorprendentemente, han mostrado *in vitro* que la sPLA2 GIIA no presenta ninguna actividad inhibitoria en los cultivos de *P. falciparum* estándar, sugiriendo que su función en la malaria, si tiene alguna, no tendría que ver con la eliminación directa del parásito, pero que las sPLA2 GIIF, GV y GX son activas contra *P. falciparum*. En el caso de la sPLA2 GX, la sPLA2 más activa contra *P. falciparum*, el efecto parasiticida resulta de la hidrólisis enzimática tanto de fosfolípidos exógenos del medio de cultivo como de fosfolípidos celulares de eritrocitos infectados. Los autores de la 20 invención también han mostrado que la actividad enzimática anti-*Plasmodium* de sPLA2 GX es potenciada en presencia del factor activador de plaquetas (PAF; un potente mediador de la agregación de plaquetas e inflamación; Venable y col., 1993).

25 Además, los autores de la invención han mostrado que i) el nivel plasmático de las sPLA2 hGIIA, hGIIF y hGV es significativamente mayor en pacientes infectados con *P. falciparum*, y ii) se encuentra una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de las sPLA2 hGIIF y hGV, y entre los niveles plasmáticos de las sPLA2 hGIIA y hGIIF en estos pacientes (véase el ejemplo 3 más adelante). Más específicamente, se encuentran aumentos significativos de las sPLA2 hGV y hGIIF en pacientes con parasitemia baja, pero no en pacientes con niveles de parásitos mayores.

30 Además, a partir de los resultados obtenidos por los autores de la invención parece que un aumento combinado específico de las sPLA2 hGIIF y hGV en el plasma de pacientes con parasitemia baja, puede contribuir a mantener la parasitemia bajo un umbral perjudicial, y puede ser predictivo de un resultado favorable en pacientes infectados con *Plasmodium*.

35 No se ha descrito la presencia de otras sPLA2 además de hGIIA en el suero de sujetos normales (sanos) o pacientes con choque séptico (Nevalainen y col., 2005). Por lo tanto, estos resultados sugieren que un aumento en el nivel plasmático de las sPLA2hGIIF y/o hGV es inducido específicamente por el parásito de la malaria.

Basándose en estos resultados que muestran una función de las sPLA2 GIIF, GV y GX humanas en la infección por 40 *P. falciparum* y un mayor nivel plasmático de las sPLA2 hGIIF y hGV en los pacientes infectados por *P. falciparum*, el diagnóstico de la infección de malaria se puede llevar a cabo midiendo específicamente las concentraciones en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX: indicando un aumento de la actividad enzimática (o nivel plasmático) de al menos una de estas sPLA2 en el suero de un sujeto, la presencia de *Plasmodium* en dicho sujeto.

45 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico *in vitro* de una infección por *Plasmodium*, preferiblemente una infección por *P. falciparum*, en un sujeto, comprendiendo dicho método las siguientes etapas:

a) medir la concentración en el suero de al menos una fosfolipasa A2 secretada (sPLA2) seleccionada del grupo que 50 consiste en las sPLA2 GIIF, GV y GX, preferiblemente GIIF y GX, o más preferiblemente las sPLA2 GIIF y GV, en dicho sujeto, en una muestra de sangre,

b) comparar la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX obtenida en la etapa a) con la concentración de referencia en suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX en sujetos no infectados con *Plasmodium* (sujetos sanos) 55 respectivamente, en el que una concentración superior en el suero de sPLA2 GIIF, GV y/o GX en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparado con la concentración de referencia en el suero de sPLA2 GIIF, GV y/o GX en sujetos no infectados con *Plasmodium*, es indicativa de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium*.

Un "sujeto" se refiere a un mamífero, preferiblemente un ser humano. Ventajosamente, dicho sujeto tiene fiebre.

Como se usa en el presente documento, "*Plasmodium*" se refiere a un parásito del género *Plasmodium*, preferiblemente *P. falciparum*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. vivax*, y más preferiblemente *P. falciparum*.

- 5 En una realización preferida de dicho método, además de la medición de la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX, también se mide la concentración en el suero de la sPLA2 GIIA, y se compara con la concentración de referencia en el suero de la sPLA2 GIIA en sujetos no infectados con *Plasmodium*, en el que una concentración superior en el suero de sPLA2 GIIF, GV y/o GX y sPLA2 GIIA en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparada con la concentración de referencia en el suero de sPLA2 GIIF, GV y/o GX y sPLA2 GIIA en sujetos no infectados con *Plasmodium* es indicativa de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium*.

La medición de la concentración en el suero de las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX, se puede llevar a cabo *in vitro* midiendo la actividad catalítica de estas cuatro sPLA2 respectivamente o por inmunoanálisis. A modo de ejemplo, la concentración en el suero se puede determinar por ELISA como se describe en Vadas y col., 1992 y 1993 para la sPLA2 GIIA o por fluoroinmunoanálisis resuelto en el tiempo (TR-FIA) como se describe en Nevalainen y col., 2005 para las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX.

En una realización preferida, se mide la concentración en el suero de GIIF y GX, o GIIF y GV, o GV y GX.

- 20 En otra realización preferida, se mide la concentración en el suero de GIIF, GV y GX.

En otra realización preferida, se mide la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF y/o GV, preferiblemente sPLA2 GIIF y GV, y opcionalmente además la sPLA2 GIIA. Una concentración superior en el suero de sPLA2 GIIF y/o GV, y opcionalmente de sPLA2 GIIA, en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparada respectivamente con la concentración de referencia en el suero de sPLA2 GIIF, GV y/o GIIA en sujetos no infectados con *Plasmodium*, es indicativa además de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium* con baja parasitemia.

Como se usa en el presente documento, "baja parasitemia" se refiere a una parasitemia inferior a 0,5 %, que significa un número de glóbulos rojos infectados por *Plasmodium* inferior a 0,5 por 100 glóbulos rojos totales de la sangre de dicho sujeto (Warhurst y Williams, 1996).

Para determinar el porcentaje de parasitemia de malaria, los glóbulos rojos infectados por el parásito de la malaria se cuentan de forma rutinaria frente a 1000 eritrocitos de frotis de sangre.

- 35 En otra realización preferida, una concentración superior en el suero de sPLA2 GIIF y/o GV, preferiblemente sPLA2 GIIF y GV, y opcionalmente además sPLA2 GIIA, en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparada respectivamente con la concentración de referencia en el suero de sPLA2 GIIF, GV y/o GIIA en sujetos no infectados con *Plasmodium*, es indicativa además de que dicho sujeto está en remisión (es decir, la parasitemia está disminuyendo).

40 A modo de ejemplo, dicha remisión puede ser consecutiva a un tratamiento para la malaria de dicho sujeto.

Normalmente, las concentraciones en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y GX en un ser humano sano (es decir, no infectado con *Plasmodium*) están por debajo de sus límites de detección cuando se usa el método TR-FIA para la detección, es decir, respectivamente 4 µg/l, 11 µg/l y 2 µg/l, y la concentración en el suero de GIIA es < 10 µg/l (Nevalainen y col., 2005).

En una realización preferida del método de la presente invención llevado a cabo en un ser humano, una concentración en el suero de sPLA₂ GIIF superior a 4 µg/l, y/o una concentración en el suero de sPLA₂ GV superior a 11 µg/l y/o una concentración en el suero de sPLA₂ GX superior a 2 µg/l, y opcionalmente además una concentración en el suero de sPLA₂ GIIA superior a 10 µg/l, p. ej. medidas por inmunoanálisis, preferiblemente por TR-FIA, es indicativo de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium* como se ha definido antes.

En otra realización preferida del método de la presente invención, una concentración en el suero de sPLA₂ GIIF y/o una concentración en el suero de sPLA₂ GV y/o una concentración en el suero de sPLA₂ GX respectivamente superiores a 7, 20 y 4 µg/l y opcionalmente además una concentración en el suero de sPLA₂ GIIA respectivamente superior a 15 µg/l, y en orden de preferencia creciente, respectivamente superior a 20 µg/l, respectivamente superior a 50 µg/l o respectivamente superior a 100 µg/l, en un ser humano, p. ej., medidas por inmunoanálisis, preferiblemente por TR-FIA, es indicativo de que dicho ser humano está infectado con *Plasmodium*, preferiblemente

con *P. falciparum*, como se ha definido antes.

La presente invención también se refiere a un kit para el diagnóstico de una infección por *Plasmodium*, preferiblemente una infección por *P. falciparum*, en un sujeto, preferiblemente un ser humano, que comprende:

- 5
- anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIF de mamífero, preferiblemente la sPLA2 GIIF humana, anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GV de mamífero, preferiblemente la sPLA2 GV humana y/o anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GX de mamífero, preferiblemente la sPLA2 GX humana,
 - 10 - opcionalmente, anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIA de mamífero, preferiblemente la sPLA2 GIIA humana,
 - al menos un control positivo, preferiblemente un suero de referencia o muestra de sangre de un mamífero infectado con *Plasmodium*, preferiblemente un mamífero infectado por *P. falciparum*, y
 - 15 - al menos un control negativo, preferiblemente un suero de referencia o muestra de sangre de un mamífero no infectado con *Plasmodium*, preferiblemente *P. falciparum*.

En una realización preferida de dicho kit, comprende anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIF de mamífero (p. ej. humana) y anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GX de mamífero (p. ej., humana).

20 En otra realización preferida de dicho kit, comprende anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIF de mamífero (p. ej. humana) y anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GV de mamífero (p. ej., humana).

En otra realización preferida de dicho kit, comprende anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIF de mamífero (p. ej. humana) y anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIA de mamífero (p. ej., humana).

30 Los anticuerpos dirigidos contra las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX de un mamífero dado (p. ej., ser humano) se pueden obtener usando métodos conocidos para los expertos en la materia, incluyendo la inmunización de un mamífero no humano, preferiblemente un conejo, rata o ratón, con las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX recombinantes de dicho mamífero dado (p. ej., ser humano).

El término "recombinante" se refiere al uso de procedimientos de ingeniería genética (clonación, amplificación) para producir dichas sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX. Las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX de mamífero recombinantes se pueden preparar usando métodos conocidos para los expertos en la materia. A modo de ejemplo, las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX humanas o de ratón recombinantes se pueden preparar como se describe en Singer y col., 2002.

40 La invención también se refiere al uso de un anticuerpo dirigido contra una sPLA2 GIIF, sPLA2 GV y/o sPLA2 GX de mamífero, preferiblemente ser humano, y opcionalmente además un anticuerpo dirigido contra una sPLA2 GIIA de mamífero, para un diagnóstico *in vitro* de una infección con *Plasmodium*, preferiblemente *P. falciparum*, en un sujeto.

45 Los autores de la invención describen una sPLA2 recombinante de mamífero seleccionada del grupo que consiste en las sPLA2 GIIF, GV y GX, preferiblemente sPLA2 GIIF y GX, y lo más preferiblemente la sPLA2 GX, para usar para tratar o prevenir la malaria, preferiblemente la malaria por *P. falciparum*.

Los autores de la invención describen una composición farmacéutica que comprende al menos dos sPLA2 recombinantes de mamífero seleccionadas del grupo que consiste en las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX, para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de la malaria.

50 Los autores de la invención describen el uso de una sPLA2 recombinante de mamífero seleccionada del grupo que consiste en las sPLA2 GIIF, GV y GX, preferiblemente sPLA2 GIIF y GX, y lo más preferiblemente la sPLA2 GX, para preparar un medicamento para tratar o prevenir la malaria, preferiblemente la malaria por *P. falciparum*.

55 En una realización preferida de este aspecto, dicho mamífero es un ser humano o un ratón, preferiblemente un ser humano.

Como se usa en el presente documento, el término "tratar" se refiere a la administración de una sPLA2 GIIA, GIIF, GV y/o GX recombinante de mamífero, a un paciente que tiene malaria o un síntoma de malaria, preferiblemente malaria por *P. falciparum*, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, superar, o

afectar a la enfermedad o los síntomas de dicha enfermedad.

Como se usa en el presente documento, el término “prevenir” se refiere a la reducción o la inhibición de un riesgo de malaria, preferiblemente malaria por *P. falciparum*, en un sujeto que no padece malaria, o que la aparición de la malaria se retrasa o elimina, en un sujeto que ha estado expuesto (es decir, en contacto con) a un *Plasmodium*.

Los autores de la invención describen un método de tratamiento o prevención de la malaria, preferiblemente malaria por *P. falciparum*, en un sujeto, que comprende administrar una sPLA2 GIIF, GV y/o GX recombinante de mamífero como se ha definido antes, a dicho sujeto que lo necesite.

10 Para mejorar la eficacia de dichas sPLA2, estas sPLA2 se pueden combinar con PAF (factor activador de plaquetas).

Los autores de la invención describen una composición farmacéutica que comprende el factor activador de plaquetas (PAF) y al menos una fosfolipasa A2 recombinante de mamífero, seleccionada del grupo que consiste en sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX, preferiblemente la sPLA2 GX.

La composición farmacéutica como se ha definido antes, también puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a cualquiera y todos los disolventes, adyuvantes, excipientes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington’s Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en este campo. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la materia.

Los autores de la invención describen una composición farmacéutica que comprende el factor activador de plaquetas (PAF) y al menos una fosfolipasa A2 recombinante de mamífero seleccionada del grupo que consiste en las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX, para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento o prevención de la malaria, preferiblemente malaria por *P. falciparum*.

Los autores de la invención describen el uso de una sPLA2 GIIF, GV o GX recombinante de mamífero, preferiblemente de origen humano, para seleccionar *in vitro* o en mamíferos no humanos, compuestos (p. ej., fármacos) que inhiban o reduzcan el desarrollo de *Plasmodium*, preferiblemente *P. falciparum*.

35 A modo de ejemplo, puede implicar poner en contacto un compuesto candidato con un glóbulo rojo o con suero y después determinar cualquier efecto modulador (inhibición o reducción) en el desarrollo de *Plasmodium*, que resulte de dicho compuesto candidato comparado con dichas sPLA2 GIIF, GV o GX recombinantes de mamífero.

40 Además de las características precedentes, la invención comprende además otras características que surgirán a partir de la siguiente descripción, que se refiere a los ejemplos que ilustran la presente invención, así como a las figuras adjuntas:

- La figura 1 muestra la hidrólisis enzimática del plasma humano por la sPLA2 GX. El plasma humano bruto se incubó con sPLA2 GX recombinante humana 3 nM (○), sPLA2 GIIF recombinante humana de longitud entera (■) o troncada (□) 15 nM, y sPLA2 de veneno de abeja 15 pM (◆), durante 48 h a 37 °C. Se tomaron partes alícuotas en los tiempos de 0 h, 6 h, 22 h, 30 h y 48 h de incubación. Se midieron los NEFA en cada parte alícuota usando el kit NEFA-C (WAKO);

50 - La figura 2 muestra la toxicidad anti-*Plasmodium* de lipoproteínas oxidadas. Se ensayó la toxicidad anti-*Plasmodium* en las lipoproteínas purificadas en estado natural o después de oxidación por aire-luz. Se cultivó un cultivo asíncrono de la cepa colombiana FcB1 de *P. falciparum* resistente a cloroquina (1 % de parasitemia, 2 % de hematocrito) en presencia de concentraciones decrecientes de cada preparación de lipoproteína. El crecimiento de parásitos se evaluó por la incorporación de [³H]-hipoxantina en ácidos nucleicos. CM/VLDL natural (○), CM/VLDL oxidada (◆); LDL natural (○), LDL oxidada (●); HDL natural (□), HDL oxidada (■);

- La figura 3 muestra la hidrólisis de lipoproteínas por sPLA2 GX y GIIF, comparado con sPLA2 del veneno. CM/VLDL, LDL y HDL se purificaron de plasma humano y se usaron recientes (F) o después de oxidación mínima por aire y luz (Ox). Después de la determinación del contenido de fosfolípidos en el plasma, el LDL y HDL se

- ajustaron a una concentración final de 1,6 mg PL/ml en PBS con calcio. Debido a que estaban disponibles cantidades pequeñas, la fracción de CM/VLDL se ajustó a 1,0 mg PL/ml. Cada muestra se incubó durante 15 h a 37 °C, sola o en presencia de sPLA2 GX humana recombinante (hGX PLA2; 25 nM), sPLA2 GIIIF humana recombinante (HGIIIF PLA2; 125 nM), sPLA2 de veneno de abeja (bvPLA2; 0,18 nM) y sPLA2 de veneno de *Naja mossambica* (Naja PLA2; 0,05 nM). Los NEFA se cuantificaron usando el kit NEFA-C (WAKO). Los valores son la media \pm DT de mediciones por triplicado. Se normalizaron restando la cantidad de NEFA en ausencia de enzima. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes con lipoproteínas de diferentes plasmas que dieron resultados cualitativos similares. Se muestran los resultados de un experimento.
- 10 - La figura 4A muestra la inhibición por LY329722 del efecto anti-*Plasmodium* de la sPLA2 GX. Se cultivó un cultivo enriquecido en esquizontes durante 24 h en presencia de sPLA2 GX humana recombinante (hGX) 50 mM o sPLA2 GX humana 50 nM más LY329722 37,5 mM (hGX + LY); los controles eran LY329722 solo (LY) y condiciones de cultivo normales (control). La parasitemia (%) en t 0 h y t 24 h se determinó a partir de los frotis teñidos con DiffQuick. El eje Y indica el aumento de parasitemia (Δ parasitemia (%)), expresado como parasitemia en t 24 h -
 15 parasitemia en t 0 h;
- La figura 4B muestra la sensibilidad de las fases en la sangre del parásito a la sPLA2 GX humana. Se sincronizó un cultivo de parásito en una ventana de 4 h. Se incubaron parásitos envejecidos 0-4 h postinvasión (p.i.) (anillos, R), 18-22 h p.i. (trofozoitos, T), y 34-38 h p.i. (esquizontes, S) durante 15 h en condiciones de cultivo con (■) o sin (□) sPLA2 GX recombinante 100 nM. Después, las células se lavaron y se dejaron crecer en condiciones de cultivo normales hasta la reinvasión. La actividad inhibidora de sPLA2 GX en el ciclo del parásito completo se evaluó incubando parásitos de 0-4 h p.i. durante 48 h con sPLA2 GX. (ciclo). La parasitemia en cada muestra se determinó a partir de frotis teñidos con DiffQuick. Para cada fase, el 100 % de parasitemia se estableció a partir del crecimiento del parásito en ausencia de enzima;
 20
 25
- La figura 5 muestra la actividad membranolítica dependiente de la fase de sPLA2 GX humana. Se analizó en un cultivo semisincrónico de *P. falciparum* (2,5 % de parasitemia) la sensibilidad a sPLA2 GX en las fases temprana y tardía del desarrollo. La parasitemia y distribución de fases se determinaron a partir de frotis teñidos con DiffQuick. Las fases tempranas se procesaron en t 0 h y las fases tardías se procesaron 24 h más tarde (t 24 h). Los cultivos se lavaron y las células se volvieron a suspender al 50 % de hematocrito en RPMI con BSA al 0,05 %, y después se distribuyeron en pocillos de una microplaca de 96 pocillos en presencia o ausencia respectivamente de sPLA2 GX 30,0 nM y sPLA2 de veneno de abeja 0,2 nM. Los eritrocitos no infectados y el suero humano se procesaron de forma similar, después de ajustar todas las muestras para el mismo contenido de fosfatidilcolina (PC). La microplaca se incubó en un recipiente con vela durante 5 h a 37 °C. El plasma y los líquidos sobrenadantes celulares se reservaron y se prepararon fantasmas a partir de eritrocitos. Los NEFA en cada muestra se midieron por triplicado usando el kit NEFA-C (WAKO). A. Distribución de fases (% de parasitemia) en los tiempos 0 h y 24 h. Anillos: barras de puntos; trofozoitos: barras rayadas. Esquizontes: barra negra. B. Actividades membranolíticas de sPLA2 GX recombinante humana (hGX) y sPLA2 de veneno de abeja (bvPLA2) en el plasma (barra blanca), eritrocitos no infectados (barra de puntos), eritrocitos de cultivo enriquecido con parásitos jóvenes (barra rayada) y enriquecido con parásitos maduros (barra negra). La concentración de NEFA en las muestras de células es la suma de los NEFA de los líquidos sobrenadantes y fantasmas emparejados. Los valores se normalizaron restando los NEFA del control sin enzima. Los valores son la media \pm DT de la determinación por triplicado;
 30
 35
 40
 45
- La figura 6 muestra el análisis comparativo de la actividad membranolítica de sPLA2 GX humana en un cultivo de *P. falciparum* cultivado en suero o en Albumax II®. Los parásitos se cultivaron en medio que contenía suero humano al 8 % (iRBC/S) o Albumax II® al 0,5 % (iRBC/A). Los cultivos se semisincronizaron de modo que contenían principalmente parásito maduros en el momento del experimento. Después se lavaron ambos cultivos (2,5-3 % de parasitemia) y las células se volvieron a suspender al 50 % de hematocrito en RPMI con BSA al 0,05 % con o sin sPLA2 GX recombinante 50 mM, y se incubaron durante 6 h en condiciones de cultivo. Los RBC (glóbulos rojos) no infectados y el suero humano se procesaron de forma similar. Los líquidos sobrenadantes celulares y el suero se congelaron a -20 °C; se prepararon fantasmas de eritrocitos y se congelaron. Se midieron los NEFA en cada muestra por duplicado tras descongelar usando el kit NEFA-C (WAKO). La cantidad de NEFA en RBC sanos (RBC) y cultivos infectados (iRBC) se expresa como la suma de los NEFA de fantasmas y líquidos sobrenadantes emparejados. Los valores son la media de las mediciones por duplicado, con los valores en ausencia de enzima restados. El experimento se repitió dos veces y dio resultados cuantitativos similares. Se muestran los resultados de un experimento;
 50
 55
- La figura 7 muestra la potenciación inducida por PAF del efecto anti-*Plasmodium* de la sPLA2 GX. Se evaluaron *in vitro* los efectos de concentraciones seriadas de PAF (factor activador de plaquetas) en la susceptibilidad de la cepa

de *P. falciparum* FcB1 a sPLA2 GX. Se incubó un cultivo de *P. falciparum* (1 % de parasitemia, 2 % de hematocrito) en una microplaca de 96 pocillos con concentraciones decrecientes de sPLA2 GX recombinante en presencia de una concentración fija subinhibidora de PAF. Se representa el índice de modificación de respuesta (RMI) en función de la concentración de PAF. El RMI es una relación de las concentraciones inhibitoras de 50 % (CI₅₀) para sPLA2 GX más la concentración de PAF y sPLA2 GX sola. Un RMI de 1,0 representa que no hay cambio en la CI₅₀ para la sPLA2 GX cuando se combina con PAF. Los valores de RMI < 1,0 representan el grado de potenciación o sinergia.

Ejemplo 1: Evaluación de las actividades anti-*Plasmodium* de las sPLA2 humanas

10 1) Materiales y métodos

1.1) Materiales

Se prepararon sPLA2 recombinantes humanas purificadas como se describe en Singer y col. (2002). El número de acceso en la base de datos de GenBank de los ARNm que codifican las diferentes sPLA2 se dan a continuación:

Grupos de sPLA2 recombinantes humanas	Número de acceso en GenBank o referencia:
IB	gi 38016927
IIA	gi 239915981
IID	gi 21314652
IIE	gi 7657460
IIF (longitud completa)	gi 145553988
IIFΔC (IIF que carece de la extensión C-terminal de 23 aminoácidos)	Singer y col., 2002
III	gi 142976883
V	gi 113722111
X	gi 4505844
XIIA	gi 195539345
XIIB	gi 45505134

La sPLA2 de veneno de *Apis mellifera* (abeja), sPLA2 de veneno de *Naja mossambica mossambica* y los reactivos bioquímicos de alta calidad usados a lo largo de este trabajo, se adquirieron en Sigma (St Quentin Fallavier, Francia). Plasmion era de Fresenius Kabi France (Sèvres, Francia). Albumax II® era de Invitrogen (Cergy Pontoise, Francia).

El kit NEFA-C y el kit Phospholipids B usados para la determinación cuantitativa de ácidos grasos no esterificados (NEFA) y fosfolípidos (PL) respectivamente eran de WAKO Chemicals GmbH (Neuss, Alemania). La 3H-hipoxantina (37 MBq/ml) era de GE Healthcare (Francia). El colorante Diff-Quick® se adquirió en Medion Diagnostics GmbH (Düdingen, Suiza). LY329722 (sodio, ácido [3-aminoxalil-1-bencil-2-etil-6-metil-1H-indol-4-iloxi]-acético) (Smart y col., 2006).

1.2) Métodos

1.2.1) Cultivo y sincronización de *P. falciparum*

Se usó la cepa colombiana FcB1 de *P. falciparum* resistente a cloroquina. En las siguientes condiciones de cultivo, el ciclo de vida *in vitro* de la cepa FcB1 era 48 h. Los cultivos se cultivaron en medio completo que consistía en RPMI 1640 (Life Technologies, Inc.) complementado con glucosa 11 mM, NaHCO₃ 27,5 mM, penicilina 100 UI/ml, estreptomycin 100 µg/ml, ajustado a pH 7,4 antes de la adición de suero humano inactivado con calor (grupo sanguíneo A+, final 8 %) o Albumax II® (final 0,5 %), de acuerdo con el procedimiento de Trager y Jensen (1976). Los parásitos se cultivaron de forma rutinaria a 37 °C en RBC A+ humanos (glóbulos rojos) con 2% de hematocrito y 2-6 % de parasitemia, en una atmósfera de 3 % de CO₂, 6 % de O₂ y 91 % de N₂. Los cultivos semisincronizados se establecieron por tratamiento con sorbitol (Lambros). Los cultivos altamente sincronizados (ventana de sincronización de 4 h) se obtuvieron por tratamiento sucesivos de Plasmion (Pasvol) y sorbitol. La parasitemia y la distribución de fases se determinaron por examen óptico de frotis de cultivos teñidos con Diff-Quick. La parasitemia (expresada en porcentaje) es cien veces el número de eritrocitos parasitados dividido entre el número total de eritrocitos.

1.2.2) Ensayo de actividad enzimática en membranas de *E. coli*

Se comprobó de forma rutinaria en las sPLA2 recombinantes la actividad enzimática por hidrólisis de *E. coli* marcada con ³H-ácido oleico, tratada con autoclave (Franson y col., 1974).

5

1.2.3) Ensayo de actividad anti-*Plasmodium* (ensayo de dosis-respuesta)

Preparaciones secas de las sPLA2 recombinantes humanas purificadas se volvieron a suspender en concentración alta (normalmente 50 μM) en RPMI con BSA al 0,05 %, y después se ensayó individualmente su capacidad para inhibir el desarrollo intraeritrocitario *in vitro* de *P. falciparum*. Los ensayos de dosis-respuesta basados en la incorporación de ³H-hipoxantina por los parásitos en crecimiento se llevaron a cabo como en Guillaume y col. (2004). La radiactividad se midió con un contador 1450 Microbeta (Wallac, Perkin Elmer). Se calculó el porcentaje de inhibición a partir de la radiactividad asociada al parásito comparado con el control sin sPLA2. Se determinaron los valores de CI₅₀ a partir de las curvas de dosis-respuesta.

15

1.2.4) Purificación y oxidación mínima de fracciones de lipoproteínas

Los procedimientos de purificación, oxidación e hidrólisis enzimática se llevaron a cabo en condiciones estériles. Plasma humano no procedente de ayuno, se dividió en partes alícuotas y se congeló a -20 °C justo después de la extracción de sangre. Tres semanas antes del experimento de hidrólisis enzimática, se descongeló una parte alícuota de plasma para la purificación de las fracciones de CM (quilomicrones)/VLDL (lipoproteína de muy baja densidad), LDL (lipoproteína de baja densidad) y HDL (lipoproteína de alta densidad) por centrifugación diferencial, de acuerdo con el procedimiento descrito en Havel y col. (1955). Las fracciones de lipoproteínas se dializaron extensamente a 4 °C contra disolución salina tamponada con fosfato (PBS: NaCl 0,15 M, tampón de fosfato sódico 10 mM, pH 7,2).

25

Para preparar lipoproteínas mínimamente oxidadas, se indujo oxidación con aire/luz por almacenamiento de las fracciones en un matraz transparente a temperatura ambiente y con intercambio de aire estéril durante 18-20 días.

Las lipoproteínas naturales se prepararon a partir de otra parte alícuota del plasma justo antes del ensayo de hidrólisis. Cuando era necesario, las fracciones de lipoproteína se almacenaron a 4 °C en atmósfera de N₂ y en la oscuridad después de añadir gentamicina 50 μg/ml.

30

Se midió el contenido de fosfatidilcolina (PC) de cada fracción de lipoproteína usando el kit de dosificación Phospholipid B (WAKO Chemicals), siguiendo las instrucciones del fabricante.

35

1.2.5) Evaluación de la toxicidad anti-*Plasmodium* de las lipoproteínas oxidadas

Se ensayaron concentraciones decrecientes de cada fracción de lipoproteína natural y oxidada siguiendo el procedimiento en ensayo de dosis-respuesta como se ha descrito antes. El control positivo para el cultivo del parásito era sin lipoproteína.

40

1.2.6) Lipólisis de plasma y lipoproteínas por sPLA2

a) Actividades específicas de las sPLA2 en el plasma:

45

El análisis cinético de la hidrólisis del plasma humano por las sPLA2 se llevó a cabo mezclando sobre hielo 50 μl de plasma bruto con sPLA2 recombinante con diferentes concentraciones finales (respectivamente 2x, 5x y 10x el valor de CI₅₀). En el tiempo cero, la mezcla se transfirió a 37 °C. Se tomaron muestras (7 μl) después de 5, 15, 30 y 60 min de incubación y se congelaron rápidamente a -20 °C. Se procesó una parte alícuota de plasma sin enzima de forma similar. La concentración de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en cada muestra se midió por un procedimiento enzimático discontinuo usando el kit de ensayo NEFA-C de WAKO, siguiendo las instrucciones del fabricante. De la cantidad de NEFA en cada muestra de plasma que contiene enzima se restó los NEFA en la muestra de plasma sin enzima. La actividad específica para cada una de las sPLA2 se determinó a partir de la parte lineal de la curva [NEFA] = f(t). El experimento se repitió tres veces con plasmas de diferentes donantes y diferentes lotes de sPLA2.

50

55

b) Hidrolisis de 48 h del plasma

Se incubó plasma humano bruto con sPLA2 GX recombinante humana 3 nM, sPLA2 GIIIF recombinante humana de longitud entera o la forma truncada (IIFΔC) 15 nM, y sPLA2 de veneno de abeja 15 μM, durante 48 h a 37°C. Se tomaron partes alícuotas (7 μl) en los tiempos 0 h, 6 h, 22 h, 30 h y 48 h de incubación. Se midieron los NEFA en cada parte alícuota usando el kit NEFA-C (WAKO). El experimento se repitió dos veces con diferentes plasmas.

5

c) Hidrólisis enzimática de lipoproteínas purificadas

Plasma y LDL y HDL purificadas se ajustaron a una concentración final de 1,67 mg de fosfolípidos (PL)/ml en PBS. Debido a que la purificación dio una cantidad baja de CM/VLDL, la fracción de CM/VLDL se ajustó a 1,00 mg PL/ml.

10 Se añadió CaCl₂ (final 1 mM) a las fracciones de lipoproteínas. Se depositaron 200 μl de cada fracción en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 15 h a 37 °C, solas o en presencia de sPLA2 GX recombinante humana (hGX PLA₂, 25,0 nM), sPLA2 GIIIF recombinante humana (hGIIIF PLA₂, 125,0 nM), sPLA2 de veneno de abeja (bvPLA₂, 0,18 nM) y sPLA2 de veneno de *Naja mossambica mossambica* (Naja PLA₂, 0,05 nM). Los NEFA se midieron por triplicado usando el kit NEFA-C (WAKO). Se normalizó el valor de cada fracción restando la cantidad de NEFA en la

15 correspondiente fracción sin enzima. Se llevaron a cabo dos experimentos independientes con lipoproteínas de diferentes plasmas, que dieron resultados cualitativos similares. De acuerdo con el experimento, la hidrólisis máxima alcanzó 50 % o 65 % de los PL totales en la fracción.

1.2.7) Implicación de la actividad enzimática en la inhibición inducida por sPLA2 GX del crecimiento del parásito

20

Un cultivo *P. falciparum* enriquecido en esquizontes se cultivó durante 24 h en presencia de sPLA2 GX recombinante humana 50 nM, o sPLA2 GX 50 nM más LY329722 37,5 μM, un potente inhibidor de la actividad enzimática de sPLA2 GX (CI₅₀ 75 nM, Smart y col., 2006); los controles en condiciones de cultivo normales y en presencia de LY329722 solo (LY) se procesaron en paralelo. La parasitemia (%) antes de incubación y después de

25 24 h de incubación, se determinó a partir de frotis teñidos con DiffQuick. El crecimiento de parásitos se expresó como el delta de porcentaje de parasitemia, usando la siguiente fórmula:

$$\Delta P = [(P_x - P_0)/(P_{100} - P_0)] \times 100;$$
 donde ΔP está en porcentaje, P₀ es la parasitemia (%) en el cultivo inicial, P₁₀₀ es la parasitemia (%) después de 24 h en condiciones de cultivo normales, y P_x es la parasitemia (%) después de 24 h en

30 condiciones experimentales.

1.2.8) Sensibilidad de las fases en la sangre de *P. falciparum* a sPLA2 GX

Un cultivo se sincronizó de parásitos en una ventana de 4 h. Los parásitos envejecidos 0-4 h postinvasión (anillos),

35 18-22 h postinvasión (trofozoitos), y 34-38 h postinvasión (esquizontes) se ajustaron a 1 % de parasitemia y 2 % de hematocrito en medio completo, y después se incubaron en una placa de 96 pocillos en un recipiente con llama a 37 °C, con o sin sPLA2 GX recombinante 100 nM. Después de 15 h, las células se centrifugaron a 900xg durante 2 min, se lavaron en RPMI y se volvieron a suspender a un 2 % de hematocrito en medio completo reciente para el cultivo adicional. Cuando se produjo la reinvasión (*P. falciparum* invade nuevos RBC cuando su ciclo de desarrollo de 48 h

40 se ha completado), se determinó la parasitemia (%) en cada pocillo a partir de frotis teñidos con DiffQuick. La actividad inhibitoria de sPLA2 GX en el ciclo completo del parásito se evaluó incubando anillos con la enzima recombinante durante 48 h.

1.2.9) Lipólisis por sPLA2 GX de glóbulos rojos infectados

45

a) Determinación del contenido de fosfatidilcolina (PC) en eritrocitos y plasma

Se lavaron 100 μl de concentrado de RBC no infectados (1,1 x 10⁹ RBC) en PBS a temperatura ambiente, después se lisaron en 10 volúmenes de tampón 5P8 helado (fosfato sódico 5 mM, pH 8,0) y se centrifugaron a x14.000 g

50 durante 15 min a 4 °C. Los fantasmas sedimentados se lavaron varias veces en 5P8 helado para eliminar completamente la hemoglobina, y se volvieron a suspender en 5P8 al volumen de RBC inicial (100 μl). Se midieron los fosfolípidos (PC) en los fantasmas usando el kit de Phospholipids B de WAKO, siguiendo las instrucciones del fabricante. El contenido de PC también se midió en el plasma bruto. A partir de al menos cuatro mediciones independientes (eritrocitos y plasma de diferentes donantes), se calculó que el contenido de PC era 1,45 g/l

55 (volumen de concentrado de eritrocitos) en los RBC y 2,20 g/l en el plasma.

b) Tratamiento enzimático de RBC infectados

i) Hidrólisis de fases jóvenes y maduras:

Un cultivo de parásitos se enriqueció en fases de parásitos jóvenes (anillos + trofozoitos tempranos) por tratamiento con sorbitol. La parasitemia (2,5-3 %) y la distribución de fases se determinaron a partir de tinción con DiffQuick de frotis de cultivos. Una mitad del cultivo se procesó inmediatamente como se describe más adelante. La otra mitad se mantuvo en condiciones de cultivo normales durante un periodo de 24 h adicionales para que los parásitos alcanzaran la fase de esquizontes, y después el cultivo se procesó de forma similar. Los eritrocitos se centrifugaron durante 2 min a x900 g. Se lavó un volumen (100 µl) de concentrado de eritrocitos en RPMI y se volvieron a suspender en 1 vol de RPMI con BSA al 0,05 %. Se distribuyeron 50 µl de la suspensión en 3 pocillos de una microplaca de 96 pocillos. Los eritrocitos no infectados que se habían mantenido en condiciones de cultivo durante 24 h antes del experimento, se procesaron de forma similar. También se distribuyeron en pocillos 25 µl de plasma diluido x 4,4 en RPMI. Se añadió un volumen máximo de 2 µl de sPLA2 GX recombinante y sPLA2 de veneno de abeja en PBS con BSA al 0,02 % respectivamente a concentraciones finales 30 nM y 0,2 nM. Los pocillos control para la generación endógena de NEFA no tenían enzima. La microplaca se incubó en un recipiente con vela durante 5 h a 37 °C. Las muestras de plasma y los líquidos sobrenadantes celulares se recogieron y se congelaron a -20 °C. Se prepararon los fantasmas a partir de eritrocitos sedimentados y se congelaron a -20 °C. Las muestras se descongelaron sobre hielo justo antes de la medición por triplicado de los NEFA usando el kit NEFA-C de WAKO. Los NEFA en las muestras de eritrocitos se expresan como la suma de los NEFA de los fantasmas y el correspondiente líquido sobrenadante.

20 ii) Hidrólisis de cultivos de parásitos derivados de suero y derivados de Albumax II®

Se cultivaron parásitos durante varios ciclos en medio de cultivo complementado con suero humano al 8 % o con Albumax II® al 0,5 %. Los cultivos se semisincronizaron por tratamiento con sorbitol 2-3 días antes del experimento. Cuando contenían principalmente parásitos maduros y habían alcanzado 2,5-3 % de parasitemia, las células de ambos cultivos se lavaron en RPMI, se volvieron a suspender en RPMI con BSA al 0,05 % a un 50 % de hematocrito, y se distribuyeron en pocillos de una microplaca de 96 pocillos en presencia o ausencia de sPLA2 GX recombinante 50 nM. La microplaca se incubó a 37 °C durante 6 h en un recipiente con vela. Las incubaciones de los RBC no infectados y suero se llevaron a cabo en paralelo como controles positivo y negativo respectivamente de la actividad de la sPLA2 GX. Se recogieron los líquidos sobrenadantes y se prepararon fantasmas a partir de las células. Los NEFA se midieron usando el kit NEFA-C (WAKO). Los valores para los RBC sanos (RBC) y los cultivos infectados (iRBC) son la suma de los NEFA de fantasmas y líquidos sobrenadantes emparejados.

1.2.10) Evaluación de la actividad de quimiosensibilización *in vitro* del factor activador de plaquetas (PAF)

Se hizo el análisis cuantitativo de la mayor actividad de la sPLA2 hGX recombinante cuando se combinaba con PAF comparando las curvas de concentración-respuesta para sPLA2 hGX sola y en presencia de varias concentraciones subinhibidoras fijadas de PAF. Los efectos de cada concentración fijada de PAF en la respuesta de los parásitos (CI₅₀) a sPLA2 hGX se expresaron como el índice de modificación de la respuesta (RMI) (Oduola y col., 1998). El RMI se calculó mediante la siguiente fórmula: $RMI = CI_{50}(A,B)/CI_{50}(A)$, donde el fármaco A es sPLA2 hGX y B es PAF. Un RMI de 1,0 representa que no hay cambio en la CI₅₀ para la sPLA2 hGX recombinante combinada con PAF. Los valores de RMI < 1,0 representan quimiosensibilización (incluyendo posible sinergia). Las concentraciones subinhibidoras de PAF en el ensayo eran: 25 µM, 37,5 µM y 50 µM.

2 Resultados

45

2.1) Actividades anti-Plasmodium de sPLA2 humanas

Se ensayó en sPLA2 recombinantes humanas de los grupos IB, IIA, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA y XIIB la inhibición del desarrollo de *P. falciparum in vitro*. Los resultados se muestran en la siguiente tabla I.

50

Tabla I: Actividades anti-*P. falciparum* de sPLA2 humanas. Los valores de CI₅₀ son la media de los ensayos de dosis-respuesta independientes usando glóbulos rojos y suero humanos de diferentes donantes para el cultivo de *P. falciparum*. Se llevaron a cabo al menos dos ensayos con las sPLA2 no tóxicas GIB, GIIA, GIID, GIIE, GIII, GXIIA y GXIIB. Los valores de CI₅₀ para las sPLA2 GX y GIIF son la media de cuatro determinaciones independientes.

55

Grupo de sPLA2	IB	IIA	IID	IIE	IIF	IIFΔC	III	V	X	XIIA	XIIB
CI ₅₀ ± DT (nM)	>1250	>1250	>250	>250	14,3±10,4	>250	±250	162,5±90,9	2,9±2,4	>250	>250

Se encontró que el grupo de enzimas X y IIF eran inhibitoras, con valores de CI_{50} de $2,9 \pm 2,4$ nM y $14,3 \pm 10,4$ nM, respectivamente. El grupo de sPLA2 V presentaba una actividad inhibitora baja, con valores de CI_{50} de $162,5 \pm 90,9$. Es de destacar que la sPLA2 inflamatoria, es decir sPLA2 GIIA, cuyo nivel se ha mostrado que aumenta en el plasma de pacientes con malaria, era claramente inactiva contra el parásito.

El grupo de sPLA2 IIF es estructuralmente único entre las sPLA2, en cuanto que tiene una extensión C-terminal rica en prolina, inusualmente larga (Valentin y col., 2000b). Esta extensión media la unión de la sPLA2 GIIF a células de mamífero (Wijewickrama y col., 2006). A diferencia de la forma de longitud completa, la forma truncada del extremo C de la sPLA2 GIIF (GIIFAC), aunque es catalíticamente activa (Singer y col., 2002), no inhibe los *Plasmodium*, sugiriendo que la unión de la sPLA₂ GIIF truncada a la membrana de eritrocitos y/o superficie de lipoproteínas debe estar impedida, conduciendo a una disminución de la toxicidad.

2.2) Actividades de las sPLA2 humanas en componentes del suero

15

2.2.1) Las actividades anti-*Plasmodium* de las sPLA2 humanas disminuyen en ausencia de suero

La toxicidad de las sPLA2 de veneno frente a *P. falciparum* se ha atribuido principalmente a la hidrólisis enzimática de los fosfolípidos del suero porque esas sPLA2 son en gran medida ineficaces para matar *P. falciparum* en presencia de Albumax II®, un sustituto de suero pobre en fosfolípidos (Guillaume y col., 2004). Por lo tanto, se ensayaron las actividades anti-*Plasmodium* de las sPLA2 GX y GIIF en Albumax II® para evaluar su requisito de PL exógenos. Se encontró que los valores de CI_{50} de ambas enzimas aumentaban en Albumax II®. El valor de CI_{50} del grupo X de sPLA2 presentaba un aumento variable de acuerdo con el experimento, que variaba de 25 veces a 150 veces su valor en el suero. El valor de CI_{50} de la sPLA2 GIIF aumentaba en aproximadamente 17,5 veces. Por lo tanto, parecía que las toxicidades de las sPLA tanto GX como GIIF disminuían en presencia de Albumax II®, sugiriendo que sus mecanismos de acción se basan en cierta medida en la presencia de PL extracelulares.

2.2.2) Actividad enzimática en el plasma humano

La hidrólisis del suero por sPLA2 humanas se ha descrito para las sPLA2 GV y GIIA: la sPLA2 GV se encontró activa, la sPLA2 GIIA se encontró inactiva (Rosengren y col., 2006). Las actividades específicas de las sPLA2 GX, GIIF y GV en el plasma humano entero, se determinaron midiendo los NEFA liberados tras incubación con diferentes concentraciones de enzima y tiempos de incubación. Se midieron para la comparación las actividades de las sPLA2 del veneno de abeja (*Apis mellifera*) y veneno de *Naja mossambica mossambica* (respectivamente bvPLA₂ y *Naja* PLA₂). Los resultados se muestran en la tabla II.

Tabla II: Actividades específicas de sPLA2 en el plasma humano. La hidrólisis de los fosfolípidos del plasma por sPLA2 humanas y de veneno se ensayó usando diferentes tiempos de incubación y concentraciones de enzima. La hidrólisis se evaluó por medición de la cantidad de NEFA en las muestras usando el ensayo colorimétrico desarrollado por WAKO (kit NEFA-C). Se corrigió la producción enzimática de NEFA para la producción endógena de NEFA en ausencia de sPLA2. Se determinó la actividad específica para cada una de las sPLA2 a partir de la parte lineal de la curva cinética. Los valores son la media de tres experimentos independientes, DT: desviación típica. Se dan las actividades anti- *P. falciparum* (CI_{50}) de las respectivas sPLA2 para la comparación.

sPLA2	hGX	hGIIF	hGV	bvPLA2	<i>Naja</i> PLA2
Actividad específica \pm DT (μ mol NEFA/min x mg de enzima)	$8,23 \pm 0,92$	$0,92 \pm 0,30$	$0,33 \pm 0,09$	$515,36 \pm 72,52$	$674,68 \pm 77,51$
CI_{50} (nM)	$2,9 \pm 2,4$	$14,3 \pm 13,4$	$162,5 \pm 90,9$	$0,015 \pm 0,009$	$0,003 \pm 0,002$

45

Las enzimas humanas presentaban actividades menores en el plasma que las enzimas de veneno. Entre las sPLA2 humanas, la sPLA2 GX era 9 veces y 30 veces más activa que las sPLA2 GIIF y GV, respectivamente. En línea con lo que se había descrito para el suero, la concentración alta (1 μ M) de la sPLA2 GIIA era ineficaz en la hidrólisis del plasma (no se muestra). Hay que indicar que las actividades de las sPLA2 en el plasma están en línea con sus propiedades tóxicas contra *P. falciparum*, indicado por sus valores de CI_{50} .

Los NEFA liberados del plasma por concentraciones CI_{50} de sPLA2 GX, GIIF y de veneno de abeja, se midieron en una escala de tiempo relevante para el ensayo de dosis-respuesta, es decir 48 h. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes con plasmas de diferentes donantes que dieron resultados cualitativos similares. Los resultados de un experimento se presentan en la figura 1. Cada sPLA2 en su concentración CI_{50} hidrolizaba el

55

plasma a velocidad constante durante al menos 20 h, siendo la sPLA2 GX la más activa. Esto indicaba que en presencia de las sPLA2 humanas, el parásito es potencialmente sometido a la liberación continua de NEFA y lisofosfolípidos, lo más probablemente en el origen de la toxicidad, como se demuestra en el caso de la enzima de veneno de abeja. La forma truncada no tóxica de sPLA2 GIIF era en gran medida ineficaz en la hidrólisis del plasma, reforzando la idea de que está implicada la hidrólisis de PL en la actividad anti-*Plasmodium* de la sPLA2 GIIF natural.

2.2.3) Hidrólisis de lipoproteínas por sPLA2 GX y GIIF

10 Se sabe que las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y GX hidrolizan fácilmente LDL y HDL purificadas en su estado natural (Ishimoto, y col., 2003; Pruzanski y col., 2005, Sato y col., 2008), aunque se encontró que la sPLA2 GIIA era menos eficaz que las otras sPLA2 (Gesquière y col., 2002). Los pacientes con malaria presentan oxidación de lipoproteínas elevada comparado con sujetos normales (Sibmooch y col., 2004), y se sabe que dichas modificaciones pueden modular la susceptibilidad de las lipoproteínas a las sPLA2 (Eckey y col., 1997; Pruzanski y col., 1998). Se analizó la capacidad de las sPLA2 GX y GIIF recombinantes para hidrolizar lipoproteínas oxidadas *in vitro*.

Antes del experimento, debido a que se había descrito previamente (Guillaume y col., 2006) que las CM/VLDL oxidadas por la exposición prolongada al aire y la luz (lipoproteínas oxidadas mínimamente) son inhibitoras del desarrollo de *P. falciparum in vitro*, se analizó si las LDL y HDL oxidadas de forma similar serían también tóxicas.

20 Los resultados se muestran en la figura 2. Puede verse que las tres clases de lipoproteínas son inhibitoras cuando se oxidan, con los valores respectivos de CI_{50} de 85 μ g PL/ml (CM/VLDL), 200 μ g PL/ml (LDL), y 300 μ g/PL/ml (HDL). Es de destacar, que el crecimiento del parásito era potenciado en presencia de HDL natural, confirmando las propiedades nutrientes de esta lipoproteína particular (Grellier y col., 1990).

25 Suponiendo que la PC es el fosfolípido principal en cualquier clase de lipoproteínas, la hidrólisis enzimática de las lipoproteínas se llevó a cabo con una relación dada de enzima a PC después de la medición de PC en las lipoproteínas. Las sPLA2 de veneno de abeja y de *Naja* se ensayaron en paralelo con las enzimas humanas. Se usó aproximadamente 10x CI_{50} de cada sPLA2. El experimento se llevó a cabo dos veces con lipoproteínas de diferentes donantes y dio resultados cualitativos similares.

Los resultados de un experimento por triplicado se muestran en la figura 3:

- 35 - el grupo de enzimas X hidrolizaba las lipoproteínas en el orden de preferencia HDL > LDL > CM/VLDL;
- el grupo de sPLA2 IIF hidrolizaba las lipoproteínas en el mismo orden de preferencia que la sPLA2 GX, pero, a diferencia de la sPLA2 GX, hidrolizaba poco las lipoproteínas ricas en triglicéridos (CM/VLDL);
- 40 - a diferencia de las sPLA2 humanas, las enzimas de abeja y *Naja* hidrolizaban lipoproteínas en el siguiente orden de preferencia: LDL > HDL > CM/VLDL.
- excepto en el caso de las lipoproteínas ricas en triglicéridos (TG), se generaron cantidades sustanciales de NEFA por cualquiera de las enzimas a partir de las lipoproteínas oxidadas. Sin embargo, se observó que la cantidad era menor que la generada a partir de las lipoproteínas en su estado natural.

45

2.3) Propiedades de la sPLA2 hGX anti-*Plasmodium*

2.3.1) La actividad catalítica de la sPLA2 GX está implicada en el mecanismo anti-*Plasmodium*

50 La inhibición del crecimiento del parásito se eliminó en presencia de LY329722, un potente inhibidor de la sPLA2 GX recombinante (Smart y col., 2006) (figura 4A), estableciendo la prevalencia de la actividad enzimática en la actividad anti-*Plasmodium* de sPLA2 GX. De acuerdo con esto, concentraciones altas del mutante H48Q de sPLA₂ GX catalíticamente inactivo, inhibían poco el desarrollo de *P. falciparum* (30 % de inhibición con 1,25 μ M). En la medida que el mutante H48Q presenta capacidades de unión interfaciales inafectadas, esto confirmaba que la hidrólisis de fosfolípidos es esencial para el mecanismo tóxico de la sPLA2 GX.

55

2.3.2) Todas las fases en la sangre de *P. falciparum* son sensibles a la sPLA2 GX.

Como puede verse en la figura 4B, un tratamiento de 15 h con sPLA2 GX recombinante es inhibidor de cualquiera

de las fases del parásito. La inhibición era en gran medida irreversible. Entre las fases tratadas con sPLA2 GX, solo los anillos consiguieron una reinvasión de 25 %, mientras que menos de 10 % de trofozoitos y esquizontes completaron el ciclo.

5 2.3.3) La sPLA2 GX presenta actividad membranolítica contra eritrocitos infectados

Es bien conocido que la alteración de la membrana de eritrocitos del hospedante ocurre durante la maduración intracelular de parásitos (Maguire y col., 1991). Los cambios inducidos por *Plasmodium* pueden modular la actividad membranolítica de las sPLA2 (Moll y col., 1990).

10

Se analizó la actividad membranolítica de la sPLA2 GX recombinante en los RBC infectados por parásitos jóvenes (anillo/trofozoitos jóvenes) o maduros (trofozoitos tardíos/esquizontes). Debido a que se mostró previamente que la sPLA2 de veneno de abeja no interacciona con los eritrocitos infectados (Guillaume y col., 2006), esta enzima se usó como un testigo negativo de la hidrólisis de PL de eritrocitos. Los cultivos de parásitos se incubaron con sPLA2 GX en ausencia de suero durante 5 h y después se midió la producción de NEFA. Los valores se normalizaron de acuerdo con la liberación de NEFA no específica en ausencia de enzima.

15

El grupo de sPLA2 X inducía la liberación de NEFA del cultivo de parásitos con predominancia para las fases esquizontes (figura 5, A y B). La liberación aumentaba con la maduración de los parásitos. Los eritrocitos sanos se dejaron intactos. Como se esperaba, y en contraste con la enzima humana, la sPLA2 de veneno de abeja hidrolizaba poco los eritrocitos, infectados o no.

20

2.3.4. El efecto anti-*Plasmodium* de la sPLA2 GX es mediado principalmente por la hidrólisis de PL exógenos

Se encontró que la sPLA2 GX no inhibe de forma eficaz el *Plasmodium* cultivado en Albumax II®, en relación con su capacidad para hidrolizar eritrocitos infectos en el cultivo (véase el ejemplo 2.2.1). Para comprobar la posible inhibición de la enzima por Albumax II®, se llevó a cabo la hidrólisis de membranas de *E. coli* en presencia de Albumax II®. La hidrólisis se produjo a la misma velocidad en Albumax II® y en el testigo sin Albumax II®, (no se muestra), indicando que Albumax II®, no previene la actividad enzimática de la sPLA2 GX. Se examinó además si el cultivo en ausencia de suero podía inducir modificaciones de la membrana de eritrocitos que a su vez evitarían su hidrólisis por la sPLA2 GX. Se analizó la actividad membranolítica de sPLA2 GX en un cultivo de parásitos enriquecido con esquizontes mantenido en Albumax II®. Como se ilustra en la figura 6, los NEFA se liberaron a la misma velocidad del cultivo derivado de Albumax II® y del cultivo de parásitos derivado de suero, demostrando que los eritrocitos mantenidos en Albumax II® no experimentan modificaciones de membrana inhibitorias de sPLA2 GX. Considerados juntos, estos resultados indican que ni la inhibición enzimática ni la alteración de la membrana de eritrocitos pueden explicar la caída de toxicidad inducida por Albumax II®.

30

35

2.4) Evaluación de las propiedades de quimiosensibilización *in vitro* de PAF en la actividad anti-*Plasmodium* de sPLA2 GX

40

El fosfolípido acetilado factor activador de plaquetas (PAF) es un potente mediador proinflamatorio que presenta múltiples acciones fisiológicas y patológicas. Es producido por diferentes células inflamatorias y por células endoteliales. Las acciones de PAF son abolidas por hidrólisis del resto acetilado, una reacción catalizada por la PAF acetilhidrolasa (PAF-AH), una sPLA2 atípica asociada con las lipoproteínas del plasma. Se mostró que la sPLA2 GX recombinante hidroliza eficazmente PAF (Gora y col; 2006), y se ha propuesto que la enzima está implicada en la neutralización del PAF recién sintetizado durante la oxidación de LDL, eliminando así su actividad biológica.

45

Se evaluaron los efectos de PAF en la actividad anti-*Plasmodium* de sPLA2 GX. Primero se examinó si PAF y/o sus productos de degradación (liso-PAF y acetato) podían afectar el desarrollo intraeritrocitario del *Plasmodium*. Se encontró que PAF presentaba valor alto de CI_{50} ($82,0 \pm 1,2 \mu M$) en condiciones de cultivo estándar. En condiciones donde el PAF-AH del suero era inhibido por Pefabloc, el valor de CI_{50} de PAF no variaba ($95,0 \pm 2,8 \mu M$), haciendo improbable que PAF o los productos de PAF generados en las condiciones plasmáticas normales puedan tener cualquier efecto en el desarrollo del parásito.

50

Los efectos de PAF en la actividad anti-*Plasmodium* de la sPLA2 GX se evaluaron por estudios de interacción de sPLA2 GX y PAF, en los que se combinaron concentraciones subinhibidoras fijas de PAF con sPLA2 GX previamente diluida de forma seriada. Se compararon las curvas de concentración-respuesta para la sPLA2 GX sola y en presencia de PAF. Los datos se expresaron como el índice de modificación de la respuesta (RMI) (como en Oduola y col., 1998). Se encontraron valores de $RMI < 1$ (figura 7), indicando que PAF potencia la actividad de

55

sPLA2 GX contra *Plasmodium*.

Ejemplo 2: Diagnóstico de una infección por *Plasmodium* en un paciente usando un fluoroinmunoanálisis resuelto en el tiempo (TR-FIA)

5

Se analiza una muestra de sangre de un paciente que tiene enfermedad febril no específica para determinar la concentración en el suero de las sPLA2 GIIIF, GV y GX por TR-FIA

10 El TR-FIA para las sPLA2 GIIIF, GV y GX humanas se usa como se describe en Nevalainen y col., 2005. Se obtienen las IgG dirigidas contra sPLA2 GIIIF, GV y GX aisladas de un conejo y después se marcan. Se usan las sPLA2 GIIIF, GV y GX recombinantes humanas como referencia en el TR-FIA.

Una concentración en el suero de las sPLA2 GIIIF, GV y/o GX respectivamente superior a 4, 11 y 2 µg/l es indicativa de que el paciente está infectado con *Plasmodium*.

15

Ejemplo 3: Identificación y cuantificación de isoformas de sPLA2 individuales incluyendo hGIIA, hGIIIF, hGV, y hGX en el plasma de pacientes con malaria, perfil de isoformas de sPLA2 y relación con la parasitemia y actividad de la enfermedad

20 **1) Métodos**

1.1) Ensayo de actividad de sPLA2

25 La actividad enzimática de sPLA2 se midió usando membranas de *E. coli* radiomarcadas como sustrato, como se describe en Rouault y col., 2007. Brevemente, se incubaron de 2 a 3 µl de plasma durante 30 min en 60 µl de tampón de actividad de sPLA2 (Tris 0,1 M pH 8,0, CaCl₂ 10 mM y BSA al 0,1 %) que contenía 100.000 dpm de membranas de *E. coli* radiomarcadas con [3H]-oleato. Las reacciones se detuvieron por adición de 80 µl de tampón de parada (EDTA 0,1 M pH 8,0 y BSA exento de ácidos grasos al 0,5 %). Las mezclas se centrifugaron a 10.000 g durante 5 min y se hizo el recuento en los líquidos sobrenadantes que contenían [3H]oleato liberado en un contador microbeta Wallac PerkinElmer.

30

1.2) Fluoroinmunoanálisis resuelto en el tiempo (TR-FIA)

35 El TR-FIA se llevó a cabo como se describe en Nevalainen y col., 2005. Brevemente, se diluyeron de 3 a 5 µl de plasma en 100 µl de tampón de ensayo Delfia (Perkin Elmer Wallac) y se añadieron a pocillos de microvaloración recubiertos con IgG contra sPLA2 GIIA, GIIIF, GV y GX previamente lavados con disolución de lavado de TR-FIA (TBS pH 7,8, NaN₃ al 0,04 %, Tween 20 al 0,02 %). Después de incubación a temperatura ambiente con agitación constante durante 30 min, los pocillos se lavaron 4 veces con disolución de lavado de TR-FIA, se incubaron con 100 µl de trazador de IgG de sPLA2 humana marcado con Eu (0,5 µg/m diluido en tampón de ensayo Delfia) y se lavaron de nuevo 4 veces como antes. Después se añadieron 100 µl de disolución de potenciación de Delfia a los pocillos, se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min con agitación y después durante 10 min sin agitación. La fluorescencia resuelta en el tiempo se midió usando un lector de placa Wallac Envision Perkin Elmer y módulos ópticos optimizados para ensayos DELFIA.

40

45 **1.3) Análisis estadístico**

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el software GraphPad InStat 3.

2) Resultados

50

Se analizó la actividad total de sPLA2 de plasma de pacientes infectados con *Plasmodium falciparum* (n = 26, parasitemia en el intervalo de 0,01 % a 4,0 %) en membranas de *E. coli* y la presencia de isoformas individuales de sPLA2 incluyendo hGIIA, hGIIIF, hGV y hGX por TR-FIA. Se llevó a cabo en paralelo el análisis de 15 plasmas de sujetos no infectados (grupo testigo).

55

La actividad enzimática en membranas de *E. coli* era mayor en el plasma de pacientes infectados que en el grupo testigo (P = 0,0284, usando el P valor de una prueba bilateral de Mann-Whitney). Sin embargo, el nivel de actividad enzimática no era predictivo de la parasitemia o actividad de la enfermedad.

El análisis TR-FIA de sPLA2 hGIIA mostró un aumento significativo del nivel de masa enzimática en el plasma de pacientes con parasitemia baja (<0,5 %) o alta (>0,5 %) (P = 0,0148 y P = 0,0170, respectivamente, usando el P valor de una prueba bilateral de Mann-Whitney). Por lo tanto, el nivel de masa de sPLA2 hGIIA no es predictivo de parasitemia o actividad de la enfermedad. El nivel de masa de sPLA2 hGIIA medido por TR-FIA estaba claramente asociado con el nivel de actividad enzimática total (Spearman r = 0,6327, P <0,0001).

Independiente de estas mediciones, se encontraron aumentos significativos de las sPLA2 hGV y hGIIF en pacientes con parasitemia baja (P = 0,0285 y P = 0,0113, respectivamente, usando el P valor de una prueba bilateral de Mann-Whitney), pero no en pacientes con niveles mayores de parásitos, comparado con el grupo control.

10 No se vio aumento de hGX en ningún grupo. Esto se debe probablemente a la pequeña cohorte de pacientes en el presente estudio.

15 Es interesante que los estudios de correlación entre las concentraciones en el plasma de diferentes sPLA2 mostraron una correlación muy fuerte entre los respectivos niveles de sPLA2 hGV y hGIIF (Spearman r = 0,5412, P = 0,0003) y una correlación pequeña pero importante entre los niveles de sPLA2 hGIIA y hGIIF (Spearman r = 0,3889, P = 0,0120). No se encontró correlación entre los niveles de sPLA2 hGIIA y hGV.

3) Comentarios

20 Los resultados anteriores indican que la cuantificación específica de las isoformas individuales de sPLA2 en el plasma de pacientes con malaria, puede proporcionar un conjunto de datos independientes y/o un conjunto de datos combinados (perfil de isoformas de sPLA2) que se asocia con el nivel de parasitemia. Por lo tanto la definición de un perfil de isoformas de sPLA2 puede ser útil para el diagnóstico de actividad de la enfermedad, seguimiento
25 terapéutico o predicción de la evolución del paciente.

Se encontró que tres isoformas de sPLA2, en concreto hGIIA, hGIIF y hGV eran significativamente mayores en pacientes infectados con *P. falciparum*.

30 No se ha descrito que otra sPLA2 distinta de hGIIA está presente en el plasma de sujetos normales o pacientes con choque séptico (Nevalainen y col., 2005). Aunque de forma preliminar, los resultados anteriores indican que los niveles de sPLA2 hGIIF y hGV son específicamente mayores después de infección con el parásito de la malaria, y por lo tanto que estas isoformas de sPLA2 individuales pueden constituir nuevos biomarcadores de la actividad de la enfermedad, en especial en pacientes con parasitemia baja.

35 La correlación observada entre los niveles en el plasma de las sPLA2 hGIIF y hGV así como la observada entre las sPLA2 hGIIA y hGIIF sugiere que la medición combinada de las isoformas de sPLA2 (perfil de isoformas de sPLA2) representa un biomarcador altamente específico de la actividad de la enfermedad de la malaria. Por ejemplo, se puede especular que un aumento combinado específico de las enzimas sPLA2 hGIIF y hGV en el plasma de
40 pacientes con parasitemia baja puede contribuir a mantener la parasitemia por debajo de un umbral dañino, y puede ser predictivo de la evolución de un paciente. De forma similar, la correlación entre los niveles de sPLA2 hGIIA y hGIIF puede ser predictiva de la actividad de la enfermedad.

45 Por consiguiente, a partir de estos resultados parece que los ensayos específicos de las isoformas de sPLA2 y/o la medición combinada de determinadas isoformas de sPLA2 individuales, incluyendo las sPLA2 hGIIA, hGIIF, hGV y hGX, son predictivos de la actividad de la enfermedad y del resultado clínico.

REFERENCIAS

- Ait-Oufella, H., et al.. 2010. Circulation Abstract 5459, ATVB meeting 2009.
- Boilard, E., et al.. 2010. EMBO Mol. Med 2: 172-187.
- 5 Bostrom, M.A., et al.. 2007. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27: 600-606.
- Chen J., et al.. 1994. J. Biol. Chem. 269: 2365-2368.
- Cupillard L., et al.. 1997. J. Biol. Chem. 272: 15745-15752.
- Deregnaucourt, C., and Schrével, J.. 2000. J. Biol. Chem. 275: 39973-39980.
- 10 Eckey, R., et al., 1997. Atherosclerosis 132: 165-176.
- Franson, R., et al.. 1974. J. Lipid Res. 15: 380-388.
- Gelb, M.H., et al., 2000. J. Biol. Chem. 275: 39823-39826.
- Gesquière, L., et al.. 2002. Biochemistry 41: 4911-4920.
- Gilroy, D. W., et al.. 2004. Faseb J. 18: 489-498.
- Gora, S., et al.. 2006. Biochim. Biophys. Acta 1761: 1093-1099.
- 15 Grellier, P., et al.. 1990. C. R. Acad. Sci. III.311: 361-367.
- Guillaume, C., et al.. 2004. Toxicon 43: 311-318.
- Guillaume, C., et al.. 2006. J. Lipid Res. 47: 1493-1506.
- Havel, R.J.,etal.. 1955. J.Clin. Invest. 34: 1345-1353.
- Ishimoto, Y., et al.. 2003. BBA. 1642: 129-138.
- 20 Ishizaki J., et al.. 1999. J. Biol. Chem. 274: 24973-24979.
- Jonsson-Rylander, A.C., et al.. 2008. Curr. Atheroscler. Rep. 10: 252-259.
- Kudo, I., and Murakami, M.. 2002. Prostaglandins Other Lipid Mediators. 68-69: 3-58.
- Koduri, R. S., et al.. 2002. J. Biol. Chem. 277: 5849-5857.
- Kramer, R.M., et al.. 1989. J. Biol. Chem. 264: 5768-5775.
- 25 Lambeau, G., and Gelb, M.H.. 2008. Annu. Rev. Biochem. 77: 495-520.
- Maguire, P. A., et al.. 1991. Parasitology. 102: 179-186.
- Moll, G. E., et al.. 1990. Biochim. Biophys. Acta 1024: 189-192.
- Murakami, M., et al.. 2010. Biochimie. 92: 561-582.
- Nakanishi, M., and Rosenberg, D.W..2006. Biochim. Biophys. Acta 1761: 1335-1343.
- 30 Nevalainen, T. J., et al., 2005. Biochim. Biophys. Acta 1733: 210-223.
- Nevalainen, T.J., et al.. 2008. Biochim. Biophys. Acta 1781: 1-9.
- Oduola, A. M., et al.. 1998. Am. J. Trop. Med. Hyg. 58: 625-629.
- Oufella, H., et al.. 2010. Circulation Abstract 5459, ATVB meeting 2009.
- 35 Pruzanski, W., et al.. 1998. J. Lipid Res. 39: 2150-2160.
- Pruzanski, W., et al.. 2005. Biochim. Biophys. Acta. 1736: 38-50.
- Rosengren, B., et al.. 2006. Biochim. Biophys. Acta 1761: 1301-1308.
- Rouault, M., et al..2003. Biochemistry 42: 11494-11503.
- Rouault, M., et al.. 2007. Biochemistry 46: 1647-1662.
- Rosengren, B.A., et al.. 2006. Biochim. Biophys. Acta 1761: 1301-1308.
- 40 Sato, H., et al., 2008. J. Biol. Chem. 283:33483-33497.
- Schaloske, R.H., and E. A. Dennis. 2006. BBA. 1761: 1246-1259.
- Seilhamer, J.J., et al.. 1986. DNA 5: 519-527.
- Seilhamer, J.J., et al.. 1989. J. Biol. Chem. 264: 5335-5338.
- Sibmooh, N., et al., 2004. Lipids Health Dis. 3: 15.
- 45 Singer, A.G., et al.. 2002. J Biol. Chem. 277: 48535-48549.
- Six, D.A., and Dennis, E.A.. 2000. Biochim. Biophys. Acta 1488: 1-19.
- Smart, B.P., et al.. 2006. J. Med. Chem. 49: 2858-2860.
- Sun, G.Y., et al.. 2007. J. Neurochem. 103: 1-16.
- Suzuki, N., et al.. 2000. J. Biol Chem. 275: 5785-5793.
- 50 Talvinen, K.A., and Nevalainen, T.J.. 2002. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 132: 571-578.
- Trager, W., and Jensen, J.B.. 1976. Science. 193: 673-677.
- Triggiani, M., et al.. 2005. J. Allergy Clin. Immunol. 116: 1000-1006.
- Vadas, P., et al.. 1992. Infect. Immun. 60: 3928-3931.
- Vadas, P., et al.. 1993. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49: 455-459.
- 55 Valentin E., et al.. 1999. J. Biol. Chem. 274: 31195-31202.
- Valentin E., et al.. 2000a. J. Biol. Chem. 275: 7492-7496.
- Valentin, E., et al.. 2000b. Biochem. Bioph. Res. Co. 279: 223-228.
- Valentin, E., et al.. 2000c. Biochim. Biophys. Acta. 1488: 59-70.
- Van der Heyde, H.C., et al.. 2006. TRENDS in Parasitol. 22: 503-508.

- Venable, M.E., et al.. 1993. *J. Lipid Res.* 34: 691-702.
Verheij, H.M., et al.. 1981. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 91: 91-203.
Von Allmen, C.E., et al.. 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 11673-11678.
Warhurst, D.C., and Williams, J.E.. 1996. *J. Clin. Pathol.* 49: 533-538.
Webb, N.R., et al.. 2003. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23: 263-268.

5

REIVINDICACIONES

1. Un método de diagnóstico *in vitro* de una infección por *Plasmodium* en un sujeto, **caracterizado porque** comprende las siguientes etapas:
 - a) medir la concentración en el suero de al menos una fosfolipasa A2 secretada (sPLA2) seleccionada del grupo que consiste en sPLA2 GIIF, GV y GX, en dicho sujeto, en una muestra de sangre,
 - b) comparar la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX obtenida en la etapa a) con la concentración de referencia en suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX en sujetos no infectados con *Plasmodium* respectivamente, en el que una concentración superior en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparado con la concentración de referencia en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX en sujetos no infectados con *Plasmodium*, es indicativa de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium*.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** además de la medición de la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX, también se mide la concentración en el suero de la sPLA2 GIIA, en el que una concentración superior en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX y sPLA2 GIIA en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparada con la concentración de referencia en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX y sPLA2 GIIA en sujetos no infectados con *Plasmodium* es indicativa de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium*.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2, **caracterizado porque** la medición de la concentración en el suero de las sPLA2 GIIA, GIIF, GV y/o GX, se lleva a cabo *in vitro* midiendo la actividad catalítica de dichas sPLA2 o por inmunoanálisis.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** dicho sujeto es un ser humano y **porque** dicha concentración en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX en dicha muestra de sangre, es respectivamente superior a 4, 11 y 2 µg/l, preferiblemente respectivamente superior a 8, 20 y 4 µg/l, medido con un inmunoanálisis adecuado.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado porque** dicho sujeto es un ser humano y **porque** dicha concentración en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GX en dicha muestra de sangre, es respectivamente superior a 4, 11 y 2 µg/l, y dicha concentración en el suero de GIIA en dicha muestra de sangre es superior a 10 µg/l, medido con un inmunoanálisis adecuado.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado porque** la infección por *Plasmodium* es una infección por *P. falciparum*.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3 a 6, **caracterizado porque** se mide la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF y GX, o sPLA2 GIIF, GV y GX.
8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se mide la concentración en el suero de las sPLA2 GIIF y/o GV, y opcionalmente además la sPLA2 GIIA, y **porque** una concentración superior en el suero de las sPLA2 GIIF y/o GV, y opcionalmente la sPLA2 GIIA, en dicha muestra de sangre de dicho sujeto comparada respectivamente con la concentración de referencia en el suero de las sPLA2 GIIF, GV y/o GIIA en sujetos no infectados con *Plasmodium*, es indicativa además de que dicho sujeto está infectado con *Plasmodium* con baja parasitemia.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 u 8, **caracterizado porque** dicha concentración superior en el suero de las sPLA2 GIIF y/o GV, y opcionalmente la sPLA2 GIIA, en dicha muestra de sangre de dicho sujeto es indicativa además de que dicho sujeto está en remisión.
10. Un kit para el diagnóstico de una infección por *Plasmodium*, preferiblemente una infección por *P. falciparum*, en un sujeto, que comprende:

- anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIF de mamífero, anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GV de mamífero, y/o anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GX de mamífero,
 - opcionalmente, anticuerpos dirigidos contra una sPLA2 GIIA de mamífero,
- 5
- al menos un suero de referencia o muestra de sangre de un mamífero infectado con *Plasmodium*, y
 - al menos un suero o muestra de sangre de un mamífero no infectado con *Plasmodium*.
11. Uso de un anticuerpo dirigido contra una sPLA2 GIIF, sPLA2 GV y/o sPLA2 GX de mamífero, y opcionalmente además un anticuerpo dirigido contra una sPLA2 GIIA de mamífero, para un diagnóstico *in vitro* de una infección con *Plasmodium* en un sujeto.
- 10

FIGURA 1

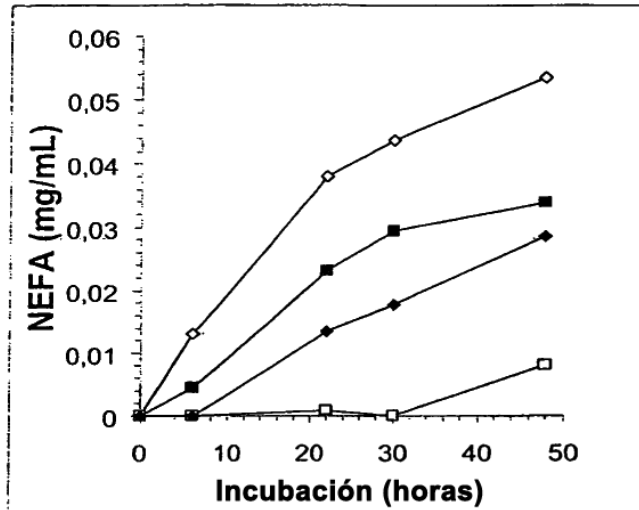
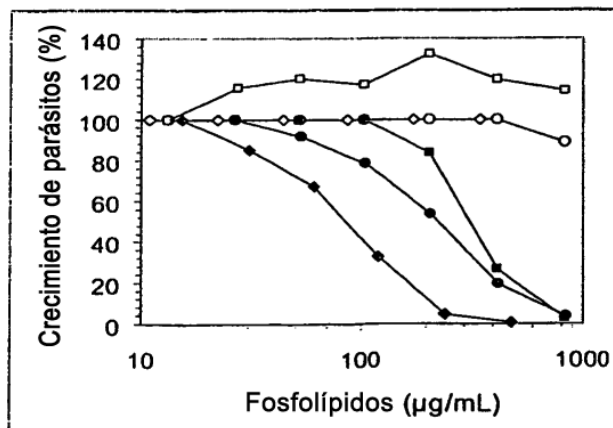


FIGURA 2



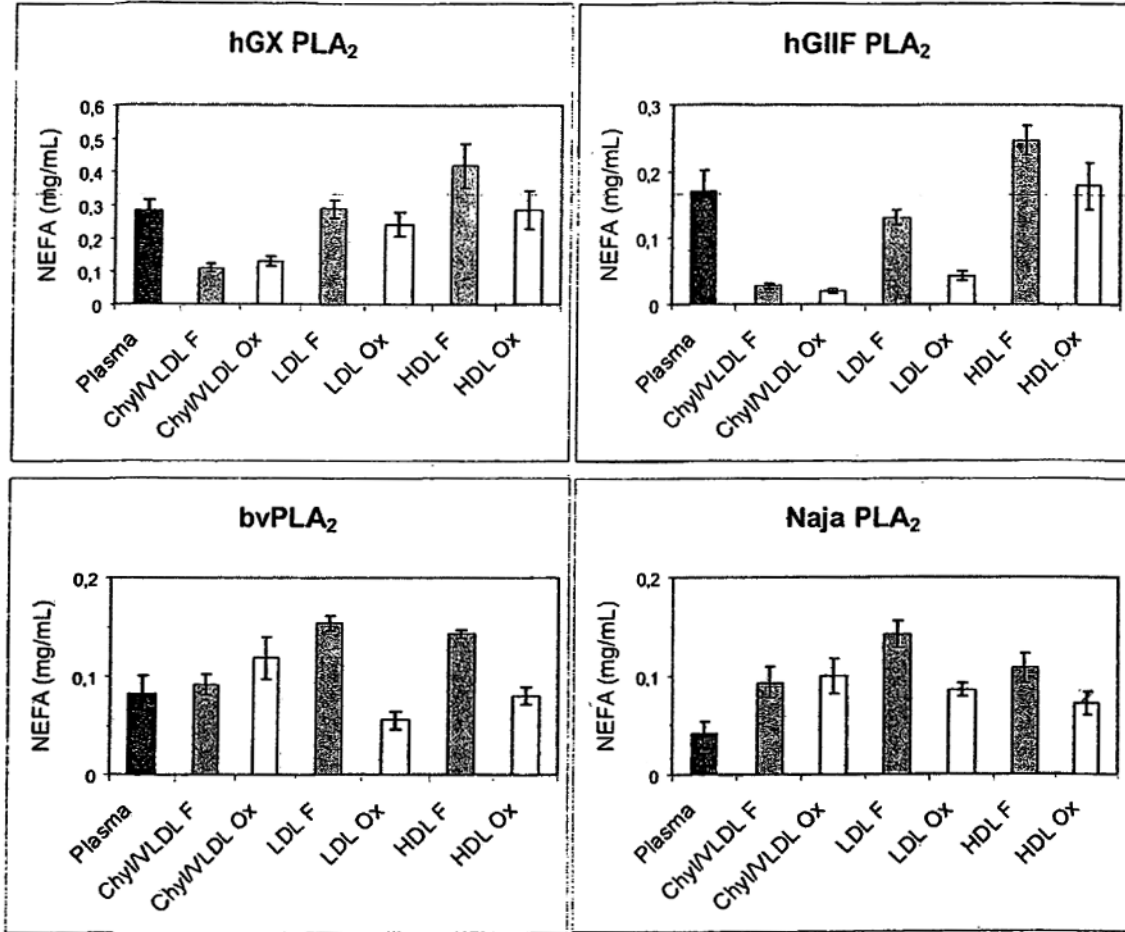


FIGURA 3

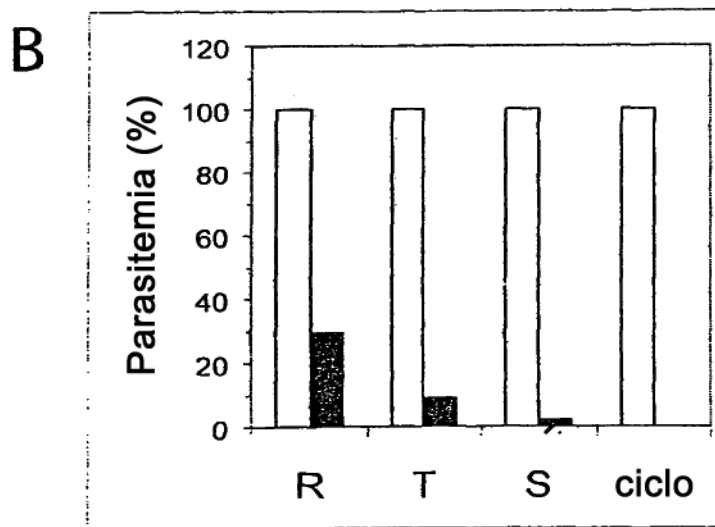
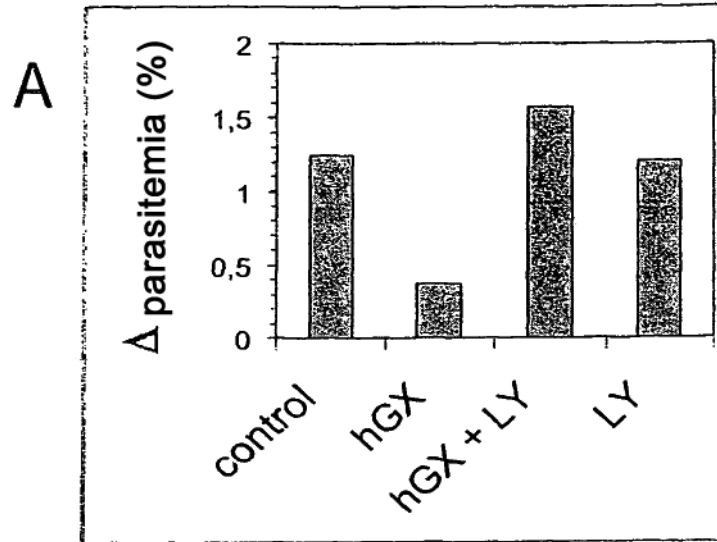


FIGURA 4

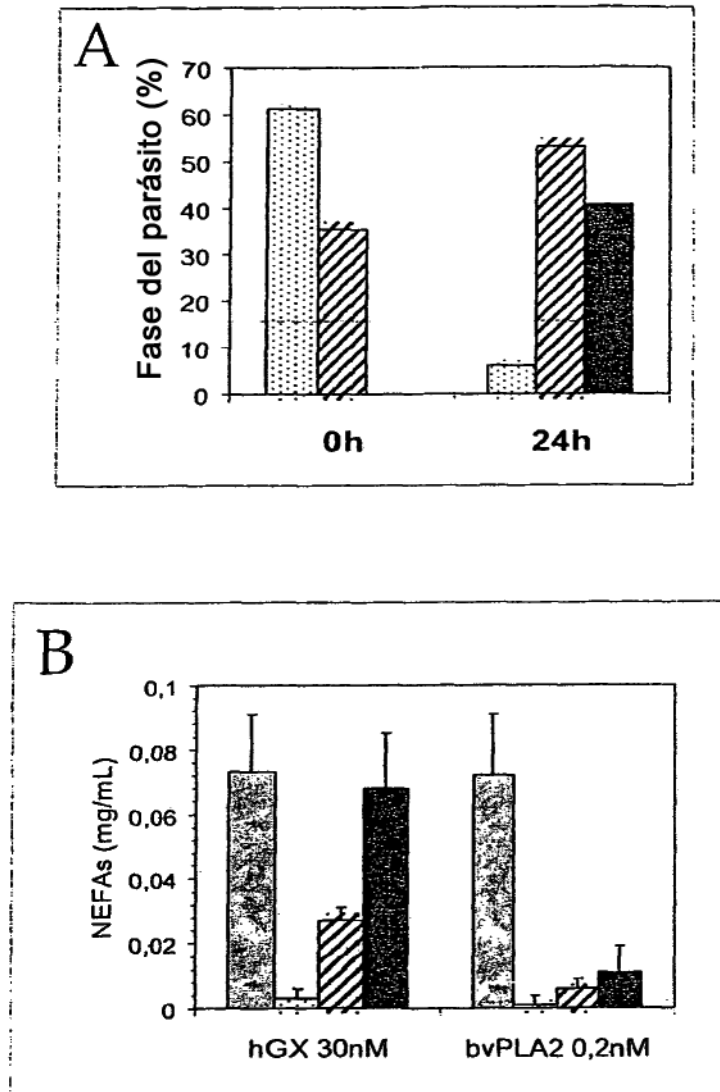


FIGURA 5

FIGURA 6

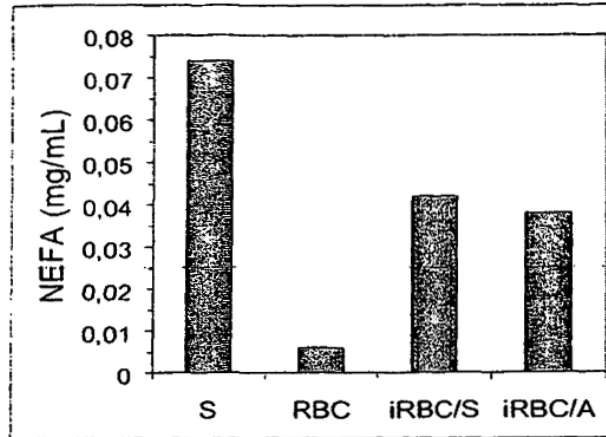


FIGURA 7

