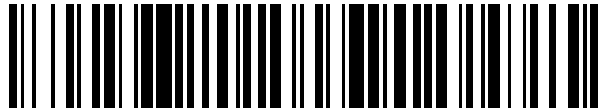


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 371**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/92** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012** **E 12169517 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015** **EP 2667197**

54 Título: **Biomarcadores sensibles, eficaces e inocuos, para la inhibición de la Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina de tipo 9 (PCSK9)**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.11.2015**

73 Titular/es:

**ZORA BIOSCIENCES OY (100.0%)**  
**Biologinkuja 1**  
**02150 Espoo, FI**

72 Inventor/es:

**REIJO, LAAKSONEN**

74 Agente/Representante:

**ZEA CHECA, Bernabé**

**ES 2 552 371 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

Biomarcadores sensibles, eficaces e inocuos, para la inhibición de la Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina de tipo 9 (PCSK9)

5

**Campo técnico**

La presente invención se refiere a métodos que implican la medición de los niveles de Cer(d18:1/16:0) para medir la eficacia de fármacos y la especificidad de tratamientos que se dirigen a la Proproteína Convertasa Subtilisina/Kexina de tipo 9 (PCSK9). La invención es aplicable, entre otras cosas, para determinar si un tratamiento que se dirige a PCSK9 está funcionando eficazmente y si un compuesto que se dirige a PCSK9 presenta efectos distintos a los esperados. La invención también es útil para evaluar el cumplimiento, por parte de los pacientes, a tratamientos que se dirigen a PCSK9. Los métodos incluyen analizar niveles biomarcadores de Cer(d18:1/16:0) de una muestra biológica y compararlos con los de una muestra de control.

15

**Antecedentes de la invención**

El colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) en plasma es un factor de riesgo establecido para enfermedades vasculares coronarias. Generalmente, los niveles altos de colesterol en sangre se tratan con estatinas. Sin embargo, incluso dosis altas de estatinas podrían no ser suficientemente eficaces como para disminuir satisfactoriamente los niveles de colesterol si los pacientes tienen valores iniciales altos de colesterol en plasma o presentan resistencia al tratamiento con estatinas. Además, dosis altas de estatinas podrían aumentar el riesgo de producir efectos secundarios. Por consiguiente, se requieren nuevas intervenciones que reduzcan el colesterol para prevenir y tratar la enfermedad coronaria vascular (ECV).

25

En Kaddurah-Daouk T. *et al.*, 2010 (*Metabolomics*. 6: 191-201) y en el documento WO 2007/127192 A2 se identifican firmas de lípidos en sujetos que respondieron o que no respondieron significativamente al tratamiento con estatinas.

Los documentos EP 2 385 374 A1 y WO 2011/161062 A2 desvelan marcadores lipídicos, marcadores de proporción lípido:lípido y marcadores de proporción de concentración lípido:clínico con la finalidad de identificar a un sujeto que está en riesgo de desarrollar, o que padece, aterosclerosis o enfermedad cardiovascular (ECV), de evaluar la eficacia de un tratamiento para la aterosclerosis o la ECV, y de seleccionar un tratamiento apropiado para la aterosclerosis o la ECV.

35

El documento WO 2011/0627243 A1 desvela biomarcadores para el diagnóstico de esclerosis múltiple en un sujeto.

Estudios genéticos realizados en seres humanos indican que la PCSK9 desempeña una función principal en la regulación de los niveles plasmáticos de LDL (Abifadel, M. *et al.* 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34: 154-156). La PCSK9 pertenece a una familia de serina proteasas, la proproteína convertasa (Seidah, N.G. *et al.* 2003. The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 928-933). Sin embargo, con independencia de su actividad enzimática, ésta disminuye el número de receptores de LDL (LDL-R) expresados en la superficie del hepatocito uniéndose al LDL-R extracelular y facilitando su degradación lisosomal, inhibiendo de este modo el reciclado de LDL-R de nuevo en la superficie celular (Horton, J. D. *et al.* 2009. PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. *J. Lipid Res* 50 Suppl: S172-177). Los individuos con mutaciones de pérdida de función en el gen de PCSK9 tienen niveles de colesterol LDL en plasma reducidos y están protegidos de ECV (Cohen, J. *et al.* 2005. Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. *Nat Genet* 37: 161-165; Abifadel, M. *et al.* 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat Genet* 34: 154-156). Por otro lado, se ha demostrado que las mutaciones de ganancia de función en el gen de PCSK9 están asociadas con niveles de LDL en plasma y ECV prematura (Abifadel, M. *et al.* 2003). Además, expresando en ratones la mutación D374Y de ganancia de función de PCSK9 de ser humano, se ha descubierto que la actividad reducida del LDL-R podría no ser la única causa de hipercolesterolemia ya que se ha demostrado que los ratones con la mutación D374Y secretan más lipoproteínas ricas en triacilglicerol en la circulación, al compararlo con los ratones de tipo de silvestre (no mutados) ((Herbert, B. *et al.* 2010. Increased secretion of lipoproteins in transgenic mice expressing human D374Y PCSK9 under physiological Genetic control. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30: 1333-1339). Estas observaciones posicionan a la PCSK9 como una posible diana en el tratamiento de hipercolesterolemia.

En el ratón, la PCSK9 se expresa predominantemente en el hígado, en el intestino delgado y en el riñón (Zaid, A. *et al.* 2008. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 48: 646-654). Se ha demostrado que la genosupresión completa de PCSK9 en ratón produce una reducción de aproximadamente un 40 % en los niveles de colesterol de LDL en la circulación (Rashid, S. *et al.* 2005. Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5374-5379). Se demostró que la administración de

65

estatinas, inhibidores de la HMG-coenzima A reductasa, disminuye los niveles de LDL incluso más, indicando el potencial del uso simultáneo de las estatinas y de la inhibición de la PCSK9 en el tratamiento de ECV. Además, se ha demostrado que la PCSK9 desempeña una función en la regeneración hepática de ratón (Zaid, A. *et al.* 2008. Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. *Hepatology* 48: 646-654). Por lo tanto, la inhibición completa de la función de PCSK9 podría aumentar el riesgo de complicaciones e incluso muerte después producirse una lesión hepática. Por otro lado, en el mismo estudio, en ratones genosuprimidos heterocigotos PCSK9, se demostró que una disminución del 50% en la actividad de PCSK9 no es perjudicial y no produce alteración en la regeneración hepática.

10

Recientemente, en seres humanos, se ha demostrado que las estatinas y otros fármacos hipolipemiantes elevan los niveles de la proteína PCSK9 en suero a través de la activación de la proteína-2 de unión al elemento regulador de esterol (SREBP-2) (Careskey, H. E. *et al.* 2008. Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. *J Lipid Res* 49: 394-398 y Konrad, R. J. *et al.* 2011. Effects of currently prescribed LDL-C-lowering drugs on PCSK9 and implications for the next generation of LDL-C- lowering agents. *Lipids Health Dis* 10: 38). Estas observaciones indican que para obtener el resultado del tratamiento más eficaz se necesitaría la inhibición de PCSK9 en combinación con estatinas u otras medicaciones reductoras de LDL.

15

Dado que la PCSK9 es una posible diana para el tratamiento de la dislipidemia, el inventor investigó el efecto del déficit de PCSK9 en lipiomas plasmáticos en ratones genosuprimidos heterocigotos y homocigotos PCSK9 usando aplicaciones de espectrometría de masas cuyo objetivo es identificar cambios en la homeostasis de los lípidos a nivel de lípidos moleculares. Dichos cambios se investigaron también en seres humanos aprovechando el conocimiento existente acerca de la funcionalidad de variantes genéticas conocidas en el gen de PCSK9. Brevemente, el perfil lipídico de sujetos portadores de una mutación de pérdida de función conocida se compara con el perfil de sujetos portadores del alelo principal. Dicha lectura de eficacia específica será de utilidad al mismo tiempo que se desarrollan y se seleccionan nuevos compuestos que actúan sobre PCSK9 y se controla la eficacia clínica de los inhibidores de PCSK9. Una lectura de eficacia exacta y típica también puede usarse para controlar efectos inespecíficos no deseados distintos a los esperados, ya que las desviaciones del perfil de eficacia predeterminado pueden ser indicativas de dichos efectos farmacológicos potencialmente dañinos inespecíficos.

20

Steinberg D, *et al.*, 2009 (PNAS. 106(24): 9546-9547) desvelan que un bloqueo de la unión de PCSK9 con el receptor de LDL puede disminuir los niveles de LDL en plasma.

De acuerdo con la presente invención, el lípido Cer(d18:1/16:0) puede analizarse mediante diversas técnicas. En el contexto de la presente invención, la lipidómica basada en espectrometría de masas de ionización por electropulverización es la tecnología preferida. La calidad y especificidad superiores de los métodos de análisis globales (en inglés “*shotgun*”) y dirigidos cumplirán con los patrones reguladores estrictos, tales como los principios de las buenas prácticas de laboratorio (GLP, *Good Laboratory Practice*), cuando se constituyen en el entorno adecuado.

25

En comparación con la técnica anterior, los biomarcadores identificados en el presente documento pueden analizarse a partir de cantidades de muestras incluso más pequeñas, debido tanto a la alta sensibilidad como especificidad de la tecnología.

La presente invención identifica a Cer(d18:1/16:0) como un biomarcador indicativo de la eficacia y especificidad de fármacos inhibidores de PCSK9. El biomarcador Cer(d18:1/16:0) facilitará la misión de garantizar que el individuo recibe el fármaco inhibidor de PCSK9 correcto al momento y a la dosis correctas, abriendo de este modo este campo terapéutico hacia otra manera de personalizar medicamentos y/o regímenes de tratamiento más generalmente aplicados. El biomarcador Cer(d18:1/16:0) también puede usarse por creadores de nuevos agentes farmacológicos contra PCSK9 para seleccionar compuestos principales específicos entre agentes candidatos.

30

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona, entre otras cosas, Cer(d18:1/16:0) como un biomarcador indicativo de inhibición de PCSK9. Esto se basa en datos de animales genosuprimidos (*knock-out*) y en datos de traducción de seres humanos de mutaciones de pérdida de función que muestran una composición de lípidos equivalente analizada con plataformas lipidómicas. Los lípidos identificados pueden usarse para controlar el grado de inhibición de PCSK9 y su especificidad. Esto ofrece una nueva y mejorada forma de estudiar la inhibición de PCSK9, que normalmente se basa en las lecturas de colesterol LDL. Sin embargo, la medición del colesterol LDL no proporciona ninguna información acerca de si la inhibición de PCSK9 también reduce los lípidos que son beneficiosos y esenciales, lo que pueden ocasionar que se produzcan efectos secundarios no deseados. La cuestión es también saber si se puedan producir efectos perjudiciales en el paciente si el nivel de colesterol LDL se reduce demasiado. El biomarcador Cer(d18:1/16:0) proporciona un mayor comprensión acerca de la eficacia de la inhibición de PCSK9 y su especificidad.

35

Al ser la PCSK9 una posible diana para el tratamiento de la dislipidemia, el inventor investigó el efecto del déficit de PCSK9 en lipídomas plasmáticos en ratones genosuprimidos heterocigotos y homocigotos PCSK9, usando aplicaciones de espectrometría de masas, con el objetivo de identificar cambios en la homeostasis de los lípidos a nivel de lípidos moleculares. Se generaron perfiles lipídicos de ratones de tipo silvestre, genosuprimidos  
5 heterocigotos y homocigotos PCSK9, a los que se proporcionó pienso regular o pienso Western, para investigar el efecto del déficit de PCSK9 y la diferencia en los biomarcadores lipídicos causada por una dieta rica en grasas en ratones que carecían de un alelo de PCSK9 o de los dos. Dichos cambios se identificaron también en seres humanos aprovechando el conocimiento existente acerca de la funcionalidad de las variantes genéticas conocidas del gen de PCSK9. Brevemente, los perfiles lipídicos de muestras de sujetos portadores de una mutación de  
10 pérdida de función conocida se compararon con los perfiles lipídicos de muestras de sujetos portadores del alelo principal. Dicha lectura de eficacia específica será de utilidad al mismo tiempo que se desarrollan y seleccionan nuevos compuestos que actúan sobre PCSK9 y se controle la eficacia clínica de los inhibidores de PCSK9. Una lectura de eficacia exacta y típica también puede usarse para controlar efectos distintos no deseados, ya que las desviaciones del perfil de eficacia predeterminado pueden ser indicativas de dichos efectos farmacológicos  
15 potencialmente dañinos inespecíficos.

La inhibición natural de PCSK9 por la mutación genética de pérdida de función produce un cambio lipídico molecular favorable en el plasma que puede explicar, al menos en parte, qué portadores de esta mutación tienen menor riesgo de enfermedad arterial coronaria (EAC). Por tanto, el biomarcador Cer(d18:1/16:0), puede usarse como un indicador  
20 específico para cualquier terapia que se dirija a PCSK9 ya que las desviaciones de los cambios que se producen por la pérdida de función de PCSK9 podrían deberse a efectos inespecíficos no deseados distintos a los esperados. La Figura 1 muestra que la inhibición de PCSK9 disminuye los lípidos que aumentan el riesgo de EAC. Adicionalmente, la inhibición de PCSK9 se comparó con los efectos hipolipemiantes del tratamiento con estatinas. Los fármacos de la clase de las estatinas reducen los lípidos en plasma mediante la regulación positiva del receptor de LDL hepático y  
25 por tanto aumentan la eliminación de lípidos, mediada por el receptor de LDL, de la circulación. La inhibición de PCSK9 también aumenta la expresión de los receptores de LDL hepáticos y produce hipolipidemia debido a un aumento de la eliminación de lípidos, mediada por el receptor de LDL, de la circulación. Por lo tanto, en teoría, estas dos modalidades de tratamiento deberían producir cambios de lípidos en plasma similares. La Figura 1 muestra que los cambios de lípidos específicos producidos por la pérdida de función de PCSK9 pueden usarse como lecturas de  
30 eficacia y especificidad para terapias que se dirigen a PCSK9. En este sentido, la Figura 2 muestra que las estatinas afectan al nivel de muchos biomarcadores lipídicos de un modo distinto que la pérdida de función de PCSK9, lo que indica que tienen un efecto más amplio, menos específico, sobre la reducción de los lípidos plasmáticos que un inhibidor/silenciador de PCSK9 específico.

La invención se refiere a métodos que implican niveles para medir la eficacia y especificidad del fármaco de  
35 tratamientos que se dirigen a PCSK9. La invención es aplicable entre otras cosas para determinar si un tratamiento que se dirige a PCSK9 está funcionando eficazmente y para determinar si un compuesto que se dirige a PCSK9 tiene efectos distintos a los deseados. Además, puede usarse para evaluar el cumplimiento por parte de los pacientes sobre los tratamientos que se dirigen a PCSK9. Los métodos incluyen analizar niveles de una muestra  
40 biológica y compararlos con los de un control.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la  
45 concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que, cuando se compara con una muestra de control, una concentración disminuida en dicha muestra indica una alta eficacia de dicho tratamiento.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para predecir en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un inhibidor/silenciador PCSK9 que comprende determinar en una muestra de dicho sujeto la  
50 concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que, cuando se compara con una muestra de control, una concentración aumentada en dicha muestra indica que dicho tratamiento será eficaz.

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para determinar el cumplimiento del sujeto del tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, que comprende determinar en una muestra de dicho  
55 sujeto la concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que, cuando se compara con una muestra de control, una concentración disminuida en dicha muestra indica un buen cumplimiento del tratamiento.

En otro aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un método para identificar compuestos que son útiles como inhibidores/silenciadores de PCSK9, que comprende determinar la concentración de Cer(d18:1/16:0) en  
60 una muestra de dicho sujeto que se somete a tratamiento con dicho compuesto, en el que, cuando se compara con una muestra de control, una concentración disminuida en dicha muestra, es indicativa de utilidad como un fármaco hipolipemiante.

En el presente documento también se describen marcadores lipídicos, agentes, tales como anticuerpos y kits para analizar funciones de nuevos compuestos farmacológicos, así como para detectar la eficacia y especificidad de  
65 los fármacos en pacientes con tratamientos que se dirigen a PCSK9.

Los métodos de acuerdo con la invención pueden comprender, por ejemplo, las etapas de: a) proporcionar una muestra biológica de un sujeto o de un animal de ensayo que se esté tratando, que vaya a tratarse, o que se haya tratado, con un fármaco inhibidor de PCSK9; b) determinar la concentración de Cer(d18:1/16:0) de acuerdo con la invención en dicha muestra y c) comparar dicha concentración de lípidos determinada con la concentración de lípidos correspondiente en una muestra de control.

El marcador Cer(d18:1/16:0) de la presente invención permite efectuar una detección sensible y específica de la eficacia y especificidad de los fármacos inhibidores de PCSK9. Esto facilitará la mejora en cuanto al cuidado del paciente y el éxito en cuanto al resultado del tratamiento, la reducción de desarrollo y padecimiento de síntomas de toxicidad y la obtención de una reducción de morbilidad/mortalidad asociada con efectos distintos a los esperados inducidos por los fármacos. Por tanto, el marcador Cer(d18:1/16:0) reivindicado en el presente documento permite ajustar individualmente la intervención farmacológica con respecto a los pacientes tratados, o a tratar con fármacos inhibidores de PCSK9. Además, la invención es aplicable a experimentos en animales en los que también se ensayan los compuestos inhibidores de PCSK9. La invención permitirá hacer una valoración con mejor especificidad de nuevos medicamentos hipolipemiantes.

En el presente documento se describe un método para determinar en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante, comprendiendo dicho método determinar, en una muestra de dicho sujeto una o más concentraciones de uno o más lípidos, en el que (a) una o más concentraciones disminuidas o aumentadas en dicha muestra, cuando se comparan con una muestra de control, indican alta eficacia de dicho tratamiento, en el que uno o más lípidos cuya concentración disminuye cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre los lípidos con concentración disminuida indicados en las **Tablas 2 a 5**, y en el que uno o más lípidos, cuya concentración aumenta cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre los lípidos con concentración aumentada indicados en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe un método para determinar en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto una o más proporciones de concentración lípido-lípido, en el que (a) una o más proporciones de concentración lípido-lípido disminuidas o aumentadas en dicha muestra, cuando se comparan con una muestra de control, indican alta eficacia de dicho tratamiento, en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido cuya concentración disminuye cuando se comparan con la muestra de control, se seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido con concentración disminuida indicadas en las **Tablas 2 a 5**, y en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido cuya concentración aumenta cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido aumentada indicadas en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe un método para predecir en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante (es decir, en un sujeto que ya ha recibido un tratamiento hipolipemiante), comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto una o más concentraciones de uno o más lípidos, en el que (a) una o más concentraciones aumentadas o disminuidas en dicha muestra, cuando se comparan con una muestra de control, indican que dicho tratamiento será eficaz, en el que uno o más lípidos, cuya concentración aumenta cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre los lípidos con concentración disminuida indicados en las **Tablas 2 a 5**; y en el que uno o más lípidos, cuya concentración disminuye cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre los lípidos con concentración aumentada indicados en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe un método para predecir en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante (es decir, en un sujeto que ya ha recibido un tratamiento hipolipemiante), comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto una o más proporciones de concentración lípido-lípido, en el que (a) la proporción de concentración lípido-lípido aumentada o disminuida en dicha muestra, cuando se compara con una muestra de control, indica que dicho tratamiento será eficaz, en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido cuya concentración aumenta cuando se compara con la muestra de control se seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido disminuidas indicadas en las **Tablas 2 a 5**; y en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido cuya concentración disminuye cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido aumentadas indicadas en las **Tablas 2 a 5**.

El método anterior es útil para sujetos que aún no han recibido dicho tratamiento con un fármaco hipolipemiante.

En el presente documento también se describe un método para determinar el cumplimiento de un sujeto con un tratamiento farmacológico hipolipemiante, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto una o más concentraciones de uno o más lípidos, en el que (a) una o más concentraciones aumentadas o disminuidas en dicha muestra, cuando se comparan con una muestra de control, indican buen cumplimiento del tratamiento, en el que uno o más lípidos, cuya concentración disminuye cuando se compara con una muestra de control, se seleccionan entre los lípidos cuya concentración disminuye indicados en las **Tablas 2 a 5**; y en el que uno

o más lípidos cuya concentración aumenta cuando se compara con una muestra de control se seleccionan entre los lípidos cuya concentración aumenta indicados en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe un método para determinar el cumplimiento de un sujeto con un  
5 tratamiento farmacológico hipolipemiante, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto una o más proporciones de concentración lípido-lípido, en el que (a) una o más proporciones de concentración lípido-lípido disminuida o aumentada en dicha muestra, cuando se comparan con una muestra de control, indican buen cumplimiento de tratamiento, en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido, cuya  
10 concentración disminuye cuando se comparan con una muestra de control, se seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido disminuidas indicadas en las **Tablas 2 a 5**; y en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido, cuya concentración aumenta se compara con una muestra de control, se seleccionan de las proporciones de concentración lípido-lípido aumentadas indicadas en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe un método para identificar compuestos que son útiles como  
15 fármacos hipolipemiantes o para el tratamiento de enfermedad cardiovascular y sus complicaciones, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto que se somete a tratamiento con dicho compuesto, una o más concentraciones de uno o más lípidos, en el que (a) una o más concentraciones disminuidas o aumentadas en dicha muestra, cuando se compara con una muestra de control, indica la utilidad como fármaco hipolipemiante, en el que uno o más lípidos, cuya concentración disminuye cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan  
20 entre los lípidos cuya concentración disminuye indicados en las **Tablas 2 a 5**, y en el que uno o más lípidos, cuya concentración aumenta cuando se compara con la muestra de control, se seleccionan entre los lípidos cuya concentración aumenta indicados en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe un método para identificar compuestos que son útiles como  
25 fármacos hipolipemiantes o para el tratamiento de enfermedad cardiovascular y sus complicaciones, comprendiendo dicho método determinar en una muestra de dicho sujeto una o más proporciones de concentración lípido-lípido, en el que (a) una o más concentraciones disminuidas o aumentadas en dicha muestra, cuando se comparan con una muestra de control, indican la utilidad como fármaco hipolipemiante, en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido, cuya concentración disminuye cuando se comparan con una muestra de control, se  
30 seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido cuya concentración disminuye indicadas en las **Tablas 2 a 5**; y en el que una o más proporciones de concentración lípido-lípido, cuya concentración aumenta cuando se compara con una muestra de control, se seleccionan entre las proporciones de concentración lípido-lípido aumentadas indicadas en las **Tablas 2 a 5**.

35 De acuerdo con la presente invención, el fármaco hipolipemiante es un inhibidor/silenciador de PCSK9.

Los métodos de la invención pueden comprender adicionalmente medir el nivel de LDL en la circulación. Si el nivel de LDL aumenta después de la administración, esto indica que el compuesto no es útil como inhibidor/silenciador de PCSK9. A la inversa, si el nivel de LDL disminuye después de la administración, esto indica que el compuesto es útil  
40 como inhibidor/silenciador de PCSK9.

Como alternativa, los métodos de la invención también pueden comprender medir la capacidad del compuesto para impedir que PCSK9 se una a receptores de LDL. Si el compuesto no impide la unión de PCSK9 a receptores de LDL después de la administración, esto indica que el compuesto no es útil como inhibidor/silenciador de PCSK9. Si el  
45 compuesto impide la unión de PCSK9 a receptores de LDL después de la administración, esto indica que el compuesto es útil como inhibidor/silenciador de PCSK9.

En el presente documento también se describe un método para determinar la especificidad de un inhibidor/silenciador de PCSK9, comprendiendo dicho método comparar la concentración o concentraciones de uno  
50 o más lípidos o una o más proporciones de concentración lípido-lípido, en una muestra de un sujeto, con una muestra de control, en el que dicho uno o más lípidos o una o más proporciones de concentración lípido-lípido se seleccionan entre los lípidos y proporciones de concentración lípido-lípido indicados las **Tablas 2 a 5**; y en el que la muestra de control es una muestra o un valor, obtenido de uno o más sujetos que tienen una mutación de pérdida de función en PCSK9.

55 En una alternativa de este método, la muestra de control es una muestra o un valor obtenido de uno o más sujetos que tienen un perfil lipídico del tipo pérdida de función de PCSK9. Un perfil lipídico de tipo pérdida de función de PCSK9 puede generarse determinando la concentración o concentraciones de uno o más lípidos o proporciones de concentraciones lípido-lípido procedente de una muestra de control.

60 En otra alternativa adicional de este método, la muestra de control es una muestra o un valor, obtenido de uno o más sujetos tratados con un inhibidor/silenciador de PCSK9 específico conocido.

La ausencia de una diferencia entre dicho uno o más lípidos o proporciones de concentración lípido-lípido en la  
65 muestra y en la muestra de control de acuerdo con este método, indica la especificidad del tratamiento con dicho

inhibidor/silenciador de PCSK9. A la inversa, la presencia de una diferencia entre dicho uno o más lípidos o una o más proporciones de concentración lípido-lípido en la muestra y en la muestra de control, indica efectos no específicos, tal como uno o más efectos secundarios adversos, causados por dicho inhibidor/silenciador de PCSK9 o compuesto.

5

En relación con todos los aspectos y realizaciones de la invención y con lo que se describe en el presente documento, dicho sujeto, con respecto al cual se realiza la comparación, puede ser (a) un paciente que se somete a un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 u otro compuesto que se dirige a PCSK9; (b) un animal de ensayo que se somete a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 u otro compuesto que se dirige a PCSK9; o (c) un paciente o un animal de ensayo que no se ha sometido y que no se está sometiendo a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, con otro compuesto que se dirige a PCSK9 o con un fármaco hipolipemiente que no sea un inhibidor/silenciador de PCSK9.

Para los métodos desvelados en el presente documento, para determinar la eficacia o predecir la eficacia de un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, para determinar el cumplimiento de un sujeto con un inhibidor/silenciador de PCSK9 o para identificar compuestos que son útiles como inhibidores/silenciadores de PCSK9, el control con el cual se realiza la comparación, puede ser una muestra de control obtenida del mismo sujeto antes del tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 o durante la interrupción de dicho tratamiento.

Para los fines de la presente invención, una muestra de control también puede obtenerse de un grupo de pacientes, por ejemplo, mezclando varias muestras de una población. Si se usa un grupo de pacientes, entonces se combinan diversos perfiles lipídicos de una población y el marcador lipídico se crea a partir de esta combinación. Para los fines de los métodos reivindicados, el nivel o la cantidad del lípido Cer(d18:1/16:0) en la muestra de un sujeto, se comparan con el nivel o con la cantidad presente en la muestra de control.

25

En una realización, el control con el que se realiza la comparación, puede ser un valor de control establecido de uno o más sujetos sanos, no previamente tratados con un inhibidor/silenciador de PCSK9. También puede ser una muestra que represente una combinación de muestras de una población de pacientes. Como alternativa, el control puede ser un valor de control establecido de uno o más sujetos sanos no sometidos a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9. Como una alternativa adicional, el control puede ser un conjunto de datos concernientes a la concentración del marcador Cer(d18:1/16:0), en una muestra cuando se toma de una muestra de control de uno o más sujetos que son portadores de alguna mutación de pérdida de función en el gen de PCSK9, tal como R46L (rs11591147). Como otra alternativa, el control puede ser un valor de control establecido de uno o más sujetos en tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 y sin síntomas o antecedentes de efectos distintos a los deseados inducidos por el fármaco.

Dicha información, y por tanto el conjunto de datos correspondiente, puede haberse determinado, calculado o extrapolado previamente, o incluso puede haberse determinado, calculado o extrapolado, o también puede extraerse de la bibliografía.

40

Preferentemente, la muestra de control es sangre, plasma, suero, orina o tejido, o una fracción de lipoproteína de los mismos.

En relación con todos los aspectos y realizaciones de la invención, cualquiera de métodos comprende adicionalmente determinar o evaluar el nivel de colesterol LDL en dicho sujeto o en una muestra de dicho sujeto. En una realización, el sujeto tiene niveles de colesterol LDL reducidos.

De acuerdo con los métodos de la invención, la muestra puede ser sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina. La muestra también puede ser una fracción de sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo u orina, por ejemplo, una fracción de lipoproteína. Se puede preparar una muestra de sangre, y el plasma o suero, o las fracciones de las mismas, se pueden separar de ahí usando técnicas bien conocidas para el experto en la materia. Como alternativa, tanto la muestra del sujeto como la muestra de control pueden ser también de una muestra de tejido, (por ejemplo, una biopsia de tejido) o una fracción de lipoproteína del mismo. En una alternativa adicional, la muestra puede ser cualquier célula de mamífero (por ejemplo, eritrocitos).

55

La recogida de información del marcador Cer(d18:1/16:0) de la invención y de los marcadores lipídicos descritos en el presente documento, de la muestra del sujeto, y también de la muestra de control, puede realizarse mediante diversas técnicas analíticas y químicas de alta resolución. Particularmente, las técnicas analíticas adecuadas incluyen, pero sin limitación, espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. De hecho, cualquier técnica de alta resolución que pueda resolver lípidos individuales o clases de lípidos y proporcionar información estructural de los mismos, puede usarse para determinar el marcador lipídicos de la muestra del sujeto y también de la muestra de control. Para los fines de los métodos de la presente invención la concentración lipídica de Cer(d18:1/16:0) se determina preferentemente usando espectrometría de masas. Sin embargo, en este sentido, son también útiles la espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la espectroscopía de fluorescencia o la interferometría de polarización dual, los métodos de separación de alto rendimiento, tales como HPLC o UPLC, un

65

inmunoensayo, tal como ELISA y/o el uso de una fracción de unión que pueda unirse específicamente al analito lipídico.

Como se ha indicado anteriormente, de acuerdo con una realización alternativa o adicional de los métodos de la invención, un analito lipídico en una muestra puede detectarse y/o cuantificarse combinando el analito con una fracción de unión que pueda unirse específicamente al analito. La fracción de unión puede incluir, por ejemplo, un miembro de un par ligando-receptor, es decir, un par de moléculas que pueden tener una interacción de unión específica. La fracción de unión también puede incluir, por ejemplo, un miembro de un par de unión específico, tal como el par anticuerpo-antígeno, enzima-sustrato, ligandos basados en ácidos nucleicos, otros ligandos proteicos u otros pares de unión específicos conocidos en la materia.

En una realización particularmente preferida, el marcador Cer(d18:1/16:0) de la presente invención se determina con espectrometría de masas (MS, *mass spectrometry*), donde el instrumento MS se acopla opcionalmente a métodos de infusión directa y a métodos de separación de alto rendimiento, tales como HPLC o UPLC. Cuando el perfil lipídico recogido se compara con un control, en los marcadores lipídicos recogidos se usa la cantidad de lípidos individuales o de clases de lípidos.

En el presente documento también se describe un inhibidor/silenciador PCSK9 para su uso en terapia, como tratamiento de hipercolesterolemia o para reducir el riesgo de, o tratar, una enfermedad cardiovascular, tal como aterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, infarto de miocardio agudo y/o ictus. Como se describe en el presente documento, dicho inhibidor/silenciador de PCSK9 puede disminuir en un sujeto la concentración de uno o más lípidos seleccionados entre los lípidos con concentración disminuida indicados en las **Tablas 2 a 5**. Del mismo modo se describe un método de tratamiento correspondiente.

En el presente documento también se describe que dicho inhibidor/silenciador de PCSK9 puede aumentar en un sujeto uno o más lípidos seleccionados entre los lípidos con concentración aumentada indicados en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe que dicho inhibidor/silenciador de PCSK9 puede disminuir una o más proporciones de concentración lípido-lípido seleccionadas de las proporciones de concentración lípido-lípido con concentración disminuida indicada en las **Tablas 2 a 5**.

En el presente documento también se describe que dicho inhibidor/silenciador de PCSK9 puede aumentar una o más proporciones de concentración lípido-lípido seleccionadas de las proporciones de concentración lípido-lípido con concentración aumentada indicada en las **Tablas 2 a 5**.

Para los fines de la presente invención, un inhibidor/silenciador de PCSK9 puede seleccionarse de (a) un anticuerpo contra PCSK9, (b) un inhibidor farmacológico de PCSK9, (c) una molécula pequeña que inhibe la interacción del receptor de LDL con PCSK9; (d) un péptido que imita el dominio de interacción del receptor de LDL con PCSK9, (e) un ARNip específico para PCSK9 y/o (f) un oligonucleótido antisentido específico para PCSK9. Particularmente, para los fines de la presente invención, como fármaco hipolipemiente se prefiere un anticuerpo contra PCSK9, o un inhibidor/silenciador de PCSK9.

En el presente documento también se describe el uso de un anticuerpo contra uno cualquiera de los lípidos o contra uno cualquiera de los lípidos en las proporciones de concentración lípido-lípido que se definen en las **Tablas 2 a 5** para predecir o determinar la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiente. Del mismo modo se describe un método de tratamiento correspondiente.

En el presente documento también se describe el uso de un anticuerpo contra uno cualquiera de los lípidos o contra uno cualquiera de los lípidos en las proporciones de concentración lípido-lípido que se definen en las **Tablas 2 a 5** para prevenir o tratar uno o más efectos secundarios adversos debidos al tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 en un sujeto. Del mismo modo también se describe un método de tratamiento correspondiente.

Para los fines de la presente invención, un efecto secundario adverso debido a, u ocasionado por, un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 puede ser toxicidad hepática.

En el presente documento también se describe un kit para realizar los métodos descritos y/o reivindicados en el mismo, comprendiendo el kit reactivos y compuestos de referencia. Los compuestos de referencia pueden ser, pero sin limitación, uno o más de los siguientes compuestos: (a) uno o más patrones lipídicos seleccionados de los lípidos en las **tablas 2 a 5**, (b) uno o más marcadores de control (por ejemplo, un lípido o lípidos, preferentemente un lípido correspondiente a cualquiera de los marcadores lipídicos descritos y/o reivindicados en el presente documento, o uno o más lípidos distintos, por ejemplo, PC total, u otra molécula, por ejemplo, una proteína); (c) controles positivos y/o negativos; (d) patrones internos y/o externos; (e) controles de línea de calibración; (f) un anticuerpo u otra fracción de unión que pueda unirse a uno cualquiera de los lípidos que se definen en las **Tablas 2 a 5**. Los reactivos son una o más soluciones, disolventes y/o tampones, útiles para realizar dichos métodos o usos.



En el presente documento también se describe un kit para realizar los métodos descritos y/o reivindicados en el mismo, comprendiendo el kit reactivos y compuestos de referencia. Los compuestos de referencia pueden ser, pero sin limitación, uno o más de los siguientes compuestos: (a) uno o más patrones lipídicos seleccionados de los lípidos definidos en las **Tablas 2 a 5**; y opcionalmente uno o más compuestos de referencia adicionales seleccionados de:

5 (b) uno o más marcadores de control (por ejemplo, uno o más lípidos, preferentemente un lípido correspondiente a cualquiera de los marcadores lipídicos descritos y/o reivindicados en el presente documento, u uno o más lípidos distintos (por ejemplo, PC total, u otra molécula, por ejemplo, una proteína); (c) controles positivos y/o negativos; (d) patrones internos y/o externos, que pueden o no modificarse, marcarse químicamente o moléculas que se producen endógenamente en seres humanos; (e) controles de línea de calibración; (f) un agente, opcionalmente un

10 anticuerpo, que pueda unirse a uno cualquiera de los lípidos indicados en las **Tablas 2 a 5** y (g) uno o más reactivos para realizar dichos métodos o usos.

Los kits pueden comprender, por ejemplo, las siguientes combinaciones de los constituyentes indicados anteriormente: (a) y (b), y opcionalmente (g); (a) y (c), y opcionalmente (g); (a) y (d), y opcionalmente (g); (a) y (e), y

15 opcionalmente (g); (a) y (f), y opcionalmente (g); (a), (b) y (c), y opcionalmente (g); (a), (b) y (d), y opcionalmente (g); (a), (b) y (e), y opcionalmente (g); (a), (b) y (f), y opcionalmente (g); (a), (c) y (d), y opcionalmente (g); (a), (c) y (e), y opcionalmente (g); (a), (c) y (f), y opcionalmente (g); (a), (d) y (e), y opcionalmente (g); (a), (d) y (f), y opcionalmente (g); o (a), (e) y (f), y opcionalmente (g);

20 Uno o más marcadores de control del kit reivindicado pueden ser una o más moléculas que se miden regularmente en un entorno clínico. Por ejemplo, uno o más marcadores de control pueden ser apoA, apoB, albúmina o PC total, o una combinación de los mismos.

El kit puede usarse para cualquiera de los fines descritos y/o reivindicados en el presente documento, en el que una

25 o más concentraciones de lípidos, una o más proporciones de lípidos o una o más combinaciones de lípidos de las mismas en una muestra de un sujeto se determinan usando espectrometría de masas. La muestra puede someterse a purificación y/o a una o más etapas de preparación previa de muestras antes del análisis de espectrometría de masas. La etapa de purificación puede ser, pero sin limitación, cromatografía, por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, *high performance liquid chromatography*), cromatografía líquida de ultra resolución (UPLC,

30 *ultra performance liquid chromatography*) y/o cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC, *ultra high performance liquid chromatography*). La etapa de preparación previa de muestras puede ser, pero sin limitación, extracción en fase sólida (SPE, *solid-phase extraction*), derivatización, extracción líquido-líquido y/o fraccionamiento de lipoproteínas. Dicha determinación por espectrometría de masas puede realizarse por espectrometría de masas en tándem.

35 También puede usarse el kit, en el que una o más concentraciones de lípidos, una o más proporciones de lípidos o una o más combinaciones de lípidos de las mismas, en una muestra de un sujeto, se determinan usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

40 En el presente documento también se describe un kit que puede usarse en un inmunoensayo para realizar los métodos de la invención. Un kit ejemplar comprende, pero sin limitación: (a) uno o más anticuerpos que puedan unirse a uno cualquiera de los lípidos indicados en las **Tablas 2 a 5**; y opcionalmente uno o más de los siguientes constituyentes:

45 (b) un sustrato específico para dicha enzima;  
 (c) una solución de terminación;  
 (d) una placa de ensayo cubierta con uno o más anticuerpos que puedan unirse a cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**;  
 (e) uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración; y

50 (f) tampones y/o reactivos necesarios para realizar el ensayo.

Otro kit descrito en el presente documento comprende, pero sin limitación:

(a) uno o más anticuerpos que puedan unirse a uno cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**, conjugado o conjugados con una enzima; y opcionalmente uno o más de los siguientes constituyentes:

55 (b) un sustrato específico para dicha enzima;  
 (c) una solución de terminación;  
 (d) una placa de ensayo cubierta con uno o más anticuerpos que puedan unirse a cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**;

60 (e) uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración; y  
 (f) tampones y/o reactivos necesarios para realizar el ensayo.

Un kit adicional descrito en el presente documento comprende, pero sin limitación:

65 (a) uno cualquiera de uno o más de los lípidos indicados en las **Tablas 2 a 5**, conjugado, o conjugados, con una

enzima; y opcionalmente uno o más de los siguientes constituyentes:

- (b) un sustrato específico para dicha enzima;
- (c) una solución de terminación;
- 5 (d) una placa de ensayo cubierta con uno o más anticuerpos que puedan unirse a cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**;
- (e) uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración; y
- (f) tampones y/o reactivos necesarios para realizar el ensayo.

10 Un kit adicional descrito en el presente documento comprende, pero sin limitación:

(a) uno o más anticuerpos que puedan unirse a uno cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**, conjugado, o conjugados, con un marcador detectable, por ejemplo, biotina; y opcionalmente uno o más de los siguientes constituyentes:

- 15 (b) un sustrato específico para dicha enzima;
- (c) una solución de terminación;
- (d) una placa de ensayo cubierta con uno o más anticuerpos que puedan unirse a cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**;
- 20 (e) uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración; y
- (f) tampones y/o reactivos necesarios para realizar el ensayo.

Otro kit adicional descrito en el presente documento comprende, sin limitación:

25 (a) uno cualquiera de uno o más de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**, conjugado, o conjugados, con un marcador detectable; y opcionalmente uno o más de los siguientes constituyentes:

- (b) un sustrato específico para dicha enzima;
- (c) una solución de terminación;
- 30 (d) una placa de ensayo cubierta con uno o más anticuerpos que puedan unirse a cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**;
- (e) uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración; y
- (f) tampones y/o reactivos necesarios para realizar el ensayo.

35 Los kits descritos anteriormente pueden comprender, por ejemplo, las siguientes combinaciones de los constituyentes indicados anteriormente: (a) y (b); (a) y (c); (a) y (d); (a) y (e); (a) y (f); (a), (b) y (c); (a), (b) y (d); (a), (b) y (e); (a), (b) y (f); (a), (c) y (d); (a), (c) y (e); (a), (c) y (f); (a), (d) y (e); (a), (d) y (f); (a), (e) y (f); (a), (b), (c) y (d); (a), (c), (d) y (e); (a), (d), (e) y (f); (a), (b), (c), (d) y (e); o (a), (c), (d), (e) y (f).

40 El kit descrito puede comprender adicionalmente un anticuerpo que se conjuga con una enzima y que puede unirse al anticuerpo del punto (a) de las realizaciones anteriores.

El kit descrito puede comprender adicionalmente un anticuerpo que se conjuga con un marcador detectable; por ejemplo, biotina o un marcador fluorescente y que puede unirse al anticuerpo del punto (a) de las realizaciones  
45 anteriores.

El kit descrito puede comprender adicionalmente una enzima conjugada con una proteína, que es específica para el marcador detectable en el anticuerpo del punto (a) de las realizaciones anteriores, por ejemplo, fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina.

50 En el presente documento también se describe el uso de los kits descritos para realizar los métodos descritos y reivindicados en el presente documento. El kit que se usa en este sentido puede ser un kit para un ensayo ELISA competitivo, y puede comprender

- 55 (a) uno o más anticuerpos o antisuero contra uno cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**;
- (b) uno cualquiera de uno o más de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**, conjugado, o conjugados, con una enzima;
- (c) uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración;
- (d) una placa de ensayo cubierta con un anticuerpo que pueda unirse con un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo  
60 que pueda unirse a una Ig de conejo, una Ig de cabra, una Ig de ratón, una Ig de cobaya, una Ig de rata o a una Ig de oveja;
- (e) un sustrato específico para dicha enzima;
- (f) una solución de terminación; y
- (g) uno o más reactivos para realizar dichos métodos o usos.

65

En un ejemplo, uno o más patrones y/o uno o más patrones de línea de calibración son patrones lipídicos seleccionados de los lípidos definidos en uno cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**.

Un uso descrito de este kit para un ensayo ELISA competitivo es el siguiente:

- 5 1. Cubrir los pocillos de una placa de ensayo con un anticuerpo que pueda unirse a un anticuerpo de conejo.
2. Añadir las muestras a los pocillos, y opcionalmente (a) añadir uno o más patrones de línea de calibración a los pocillos restantes.
- 10 3. Añadir una solución de uno cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**, conjugados con fosfatasa alcalina, seguido de un anticuerpo policlonal de conejo que pueda unirse a uno cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**.
4. Durante la incubación de la muestra el anticuerpo policlonal de conejo se une de una manera competitiva a uno  
15 cualquiera de los lípidos que se indican en las **Tablas 2 a 5**, en las muestras o conjugados.
5. Lavar la placa dejando tan solo en las muestras o en el conjugado el lípido unido.
6. Añadir una solución de sustrato específica, que produzca una reacción de color cuando se cataliza a través de la  
20 fosfatasa alcalina en el conjugado lipídico.
7. Detener la reacción mediante una solución de detención específica y leer el revelado del color en cada pocillo a una longitud de luz apropiada, por ejemplo, a 450 nm.
- 25 8. En un ensayo ELISA competitivo, la intensidad de color es indirectamente proporcional a la cantidad de lípido existente en la muestra.

Todos los kits descritos en el presente documento pueden ir acompañados de instrucciones para el uso de los mismos (i) para determinar en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante; (ii) para  
30 predecir en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante; (iii) para determinar el cumplimiento del tratamiento, por parte del sujeto, con un fármaco hipolipemiante, (iv) para identificar compuestos que son útiles como fármacos hipolipemiantes o para el tratamiento de enfermedad cardiovascular y sus complicaciones, o (v) para determinar la especificidad de un inhibidor/silenciador de PCSK9, todo ello como se define en el presente documento.

- 35 La determinación de la concentración de Cer(d18:1/16:0) de acuerdo con la invención o de una o más concentraciones lipídicas o de una o más proporciones lipídicas descritas en el presente documento se realiza típicamente usando un ensayo. La tecnología y la manera en que fue aplicada en el contexto de la enseñanza inventiva presentada en el presente documento se distancian de los esfuerzos similares en el sector, entre otras  
40 cosas, debido a los siguientes criterios. En la preparación de la muestra, las muestras se controlan estrictamente y se tratan de manera idéntica para evitar artefactos potenciales que pudieran aparecer por una incorrecta manipulación. En relación con la presente invención, las muestras se descongelaron cuidadosamente en hielo y después se sometieron directamente a una extracción de lípidos automatizada hecha a medida que actualmente posee una precisión muy alta en la manipulación de líquidos, minimizando de esta manera posibles errores.
- 45 Además, los ciclos de congelación y descongelación de la muestra se controlaron estrictamente ya que esto puede afectar considerablemente a la estabilidad de los lípidos. La extracción de lípidos automatizada se basa en el método de Folch y colaboradores (Folch J, et al: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957, 226 (1):497-509) que utiliza cloroformo y metanol. Este método es preferido cuando se va a extraer una amplia serie de clases de lípidos, desde polares a no polares, con recuperaciones  
50 óptimas, previniendo de esta manera la pérdida de especies de lípidos. Los lípidos no endógenos específicos de la clase de lípidos se usaron, cuando fue posible, como patrón interno para conseguir una mayor precisión en la identificación (minimizando los positivos falsos) y la cuantificación de especies lipídicas moleculares controladas. De esta manera, se determinaron cantidades absolutas o semiabsolutas de lípidos moleculares endógenos con la mayor precisión que se puede conseguir con las tecnologías de hoy en día. Los lípidos endógenos y sus respectivos  
55 patrones se controlaron a nivel de lípido molecular. De esta manera, no solo se minimizaron identificaciones de positivos falsos, sino que los lípidos moleculares se pudieron determinar y cuantificar de manera precisa. La calidad del análisis se controló estrictamente usando un nuevo sistema de control de calidad. Esto se controló principalmente mediante patrones internos (PI), patrones externos (PE), relaciones PI/PE múltiples, y muestras de control instrumental. Controlando de manera estricta estos componentes, los valores atípicos técnicos y biológicos  
60 se identificaron fácilmente y se rechazaron del análisis adicional. Para obtener una mayor precisión en sensibilidad, selectividad y cuantificación, se usaron, para cada lípido molecular diferente, plataformas dirigidas. Algunos lípidos se analizaron mejor usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía líquida de ultra resolución (HPLC) o cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) combinada con espectrometría de masas basada en la monitorización de reacción múltiple (MRM) mientras que otros se analizan mejor mediante  
65 infusión directa en combinación con la espectrometría de masas basada en técnicas de escaneo del ion precursor y

pérdida neutral.

#### Breve descripción de las Figuras

##### 5 **Figura 1.**

Porcentaje promedio de cambios en las concentraciones de lípidos entre pacientes que murieron debido a complicaciones por ECV (enfermedad cardiovascular) frente a pacientes con EAC (enfermedad de las arterias coronarias) estable (A), transportadores de la mutación de pérdida de función R46L frente a control (B), pacientes después del tratamiento con atorvastatina frente a los mismos pacientes antes del tratamiento (C), y pacientes después del tratamiento con simvastatina frente a los mismos pacientes antes del tratamiento (D). Cer, ceramida; LacCer, lactosilceramida.

##### **Figura 2.**

Cambios de lípidos causados por inhibición específica de PCSK9 (los pacientes tienen un gen de pérdida de función PCSK9). También se muestran los cambios de lípidos causados por los fármacos hipolipemiantes, atorvastatina y simvastatina).

##### 20 **Figura 3.**

Diferencias de porcentaje en las concentraciones promedio de lípidos moleculares en plasma de ratones PCSK9<sup>-/-</sup> (A) y PCSK9<sup>+/-</sup> (B) con dieta de pienso regular o con dieta Western (C y D, respectivamente) en comparación con el tipo silvestre (TS). La significación es conforme a la prueba de la t de Student. Cada símbolo corresponde a una molécula de lípido de una determinada categoría medida por aplicación MS.

##### **Figura 4.**

Diferencias de porcentaje en las concentraciones promedio de lípidos moleculares en plasma de pacientes varones con EAC que llevan la variante R46L en el gen de PCSK9 en comparación con pacientes con EAC sin la mutación R46L. La significación es conforme a la prueba de la t de Student. Cada punto corresponde a una molécula de lípido medida por aplicación MS o mediante un kit clínico.

#### Descripción detallada de la invención

Definiciones:

Algunas abreviaturas usadas en el presente documento tienen el siguiente significado: *ADR (Adverse Drug Reaction)* es reacción adversa a un medicamento, *MS (Mass Spectrometry)* es espectrometría de masas, *HPLC (High Performance Liquid Chromatography)* es cromatografía líquida de alta resolución y *UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography)* es cromatografía líquida de ultra alta resolución.

La enfermedad coronaria vascular / enfermedad cardiovascular (ECV) tiene su significado general en la técnica y se usa para clasificar numerosas afecciones que afectan al corazón, a las válvulas cardíacas, a la sangre y a la vasculatura del organismo. Las enfermedades cardiovasculares incluyen disfunción endotelial, enfermedad de las arterias coronarias, angina de pecho, infarto de miocardio, aterosclerosis, insuficiente cardíaca congestiva, hipertensión, enfermedad cerebrovascular, ictus, ataques isquémicos transitorios, trombosis de vena profunda, enfermedad arterial periférica, cardiomiopatía, arritmia, estenosis aórtica y aneurisma. Dichas enfermedades frecuentemente implican aterosclerosis. En una realización preferida de la invención, la enfermedad cardiovascular es una enfermedad cardiovascular asociada con aterosclerosis.

EAC es enfermedad de las arterias coronarias, IMA es infarto de miocardio agudo, SCS es síndrome coronario agudo, CAC es calcificación de las arterias coronarias, TCI es transporte de colesterol inverso, LDL es lipoproteína de baja densidad, HDL es lipoproteína de alta densidad, LDL-C es colesterol de lipoproteína de baja densidad, HDL-C es colesterol de lipoproteína de alta densidad, ApoA es Apolipoproteína A, ApoB es Apolipoproteína B, ApoC es apolipoproteína C, MS es espectrometría de masas, HPLC es cromatografía líquida de alta resolución y UPLC es cromatografía líquida de ultra alta resolución.

Para los fines de la presente invención, un fármaco o una medicación hipolipemiente es un inhibidor o un silenciador de PCSK9.

De la manera en la que se usa en el presente documento, un *sujeto* incluye todos los mamíferos, incluyendo sin limitación, seres humanos, pero también primates no humanos, perros, gatos, caballos, ovejas, cabras, vacas, conejos, y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). Un sujeto particularmente preferido de acuerdo con la presente invención es un ser humano.

De la manera en la que usa en el presente documento un *sujeto con alto riesgo* es típicamente un sujeto, particularmente un ser humano, con una dosis de fármaco alta y/o con múltiples medicaciones (que causan el riesgo de que se produzcan interacciones farmacológicas), que tiene una enfermedad que puede afectar a la eficacia del fármaco o aumentar el riesgo de producirse acontecimientos adversos (por ejemplo, hipotiroidismo, insuficiencia renal o enfermedad hepática).

De la manera en la que usa en el presente documento, una *muestra* es cualquier muestra biológica obtenida de un sujeto o de un grupo o de una población de sujetos. Para los fines de la presente invención, la muestra biológica puede ser sangre entera, suero sanguíneo o plasma sanguíneo, prefiriéndose el suero sanguíneo y el plasma sanguíneo. Tomar una muestra de sangre de un paciente es parte de la práctica clínica normal. La muestra de sangre se puede tomar con respecto a, por ejemplo, medición de niveles de colesterol en los pacientes. Se puede preparar la muestra de sangre recogida y se puede separar el suero o plasma mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Las muestras de sangre venosa se pueden recoger de los pacientes usando una aguja y tubos de plástico BD Vacutainer® o tubos de plástico Vacutainer® Plus (los tubos de plástico BD Vacutainer® SST™ contienen sílice por recubrimiento con pulverización y un gel polímero para la separación del suero). El suero se puede separar por centrifugación a 1300 RCF durante 10 min a temperatura ambiente y conservar en tubos pequeños de plástico a -80°C. La muestra también puede ser una fracción de sangre entera, plasma sanguíneo o suero sanguíneo, por ejemplo, una fracción de lipoproteína. En otra realización preferida, la muestra también puede ser una muestra de tejido, por ejemplo, tejido de biopsia de músculo, u orina, o una fracción de los mismos (por ejemplo, una fracción de lipoproteína).

En el presente documento, los lípidos u otras moléculas en el control con el que se realiza la comparación de acuerdo con la presente invención también reciben el nombre de *marcadores de control*.

De la manera en la que usa en el presente documento, un control puede ser una muestra de control o simplemente un valor de control. En el caso de que sea un valor de control, se apreciará que ya puede haberse determinado, calculado o extrapolado antes de iniciar los métodos de la invención. Como alternativa, el valor de control puede determinarse, calcularse o extrapolarse después de realizar la determinación de la concentración de Cer(d18:1/16:0) de acuerdo con los métodos de la presente invención. Por tanto, se apreciará que un valor de control adecuado de acuerdo con la presente invención bien puede ser uno que se extraiga de la bibliografía.

De la manera en la que usa en el presente documento, la referencia a una muestra de control *del mismo sujeto o de un sujeto (o de otro sujeto)* puede significar que la muestra de control se ha obtenido directamente de dicho sujeto. Sin embargo, como alternativa, también puede significar que se ha obtenido como resultado de un tratamiento físico o químico de una muestra directamente obtenida o extraída de dicho sujeto, tal como centrifugación, fraccionamiento, digestión enzimática, precipitación y similar. Esto mismo se aplica a cualquier referencia en el presente documento con respecto a una muestra *de control de uno o más sujetos, de un grupo de sujetos o de una población de sujetos*.

Las expresiones, *muestra de control de uno o más sujetos, o muestra de control de un grupo de sujetos o muestra de control de una población de sujetos*, de la manera en la que se usan en el presente documento, adicionalmente implica preferentemente que la muestra de control sea representativa de dicho más de un sujeto, grupo de sujetos o población de sujetos. En este contexto, *representativa* significará que la concentración del lípido Cer(d18:1/16:0) en dicha muestra de control con la cual se hace la comparación en el contexto de la presente invención corresponde a la concentración promedio de dicho lípido en muestras individuales correspondientes de los sujetos de dicha población o grupo. Preferentemente, la concentración del lípido en dicha muestra de control corresponde a la concentración promedio de dicho lípido en muestras individuales correspondientes de los sujetos de dicha población o grupo. Del mismo modo, cuando se hace una comparación como se describe en el presente documento, con una o más moléculas distintas, por ejemplo, con otros lípidos o proteínas, tales como PC total, o apoA, apoB o albúmina, respectivamente, una muestra de control *representativa* es una en la que la concentración(es) de dicha molécula(s) se corresponde con la concentración(es) promedio de dicha molécula(s) en muestras individuales correspondientes de los sujetos de dicho grupo o población. En una realización preferida, una *muestra de control de uno o más sujetos*, una *muestra de control de un grupo de sujetos* o una *muestra de control de una población de sujetos* en el sentido de la presente invención se obtiene mezclando las mismas cantidades de muestras directamente obtenidas o extraídas de los sujetos de dichos más de un sujeto, un grupo o una población, o mezclando las mismas cantidades de fracciones, constituyentes o productos de reacción (por ejemplo, productos de reacción enzimática o precipitados) de los mismos.

De la manera en la que se usa en el presente documento, una muestra de control *corresponde* a la muestra del sujeto si esta se ha obtenido del mismo tipo de tejido biológico o fuente de la misma manera, o esencialmente de la misma manera. Por ejemplo, si la muestra del sujeto es una muestra de sangre entera, de plasma sanguíneo o de suero sanguíneo, o de una fracción de los mismos, una muestra de control correspondiente será igualmente una muestra de sangre entera, de plasma sanguíneo o de suero sanguíneo, o de una fracción de los mismos, respectivamente. Se apreciará que dicha muestra de control correspondiente incluiría muestras de sangre entera, de plasma sanguíneo o de suero sanguíneo, o de fracciones de los mismos, obtenidas mezclando las muestras de

sangre entera, de plasma sanguíneo o de suero sanguíneo, o de determinadas fracciones de los mismos, de un grupo o de una población de sujetos (véanse también las explicaciones adicionales del presente documento y las reivindicaciones en lo que respecta a las muestras de control adecuadas de acuerdo con la invención). Esto mismo se aplica, con los cambios debidos, por ejemplo, a muestras de tejido y de orina.

5

Se entenderá que la expresión “*comparado con una muestra de control*”, del modo en que usa en el presente documento, incluye realizaciones en las que las muestras de control se analizan realmente con respecto al marcador lipídico de interés, es decir, Cer(d18:1/16:0). Sin embargo, se apreciará, que la expresión anterior también incluye realizaciones en las que la información correspondiente sobre dicho marcador lipídico en dicha muestra de control se extrae simplemente de la bibliografía, o se ha determinado, calculado o extrapolado previamente, o que aún debe determinarse, calcularse o extrapolarse.

10

Un *lípid*o, de la manera en la que se usa en el presente documento, se define como una molécula pequeña hidrófoba o anfífila.

15

De la manera que se usa en el presente documento, los lípidos se denominan de acuerdo con la siguiente nomenclatura: CE es éster de colesterol, DAG es diacilglicerol, TAG es triacilglicerol, PC es fosfatidilcolina, PC O es PC ligada a alquilo, PC P es PC ligada a alqueno, LPC es lisofosfatidilcolina, PE es fosfatidiletanolamina, PE O es PE ligada a alquilo, PE P es PE ligada a alqueno, PI es fosfatidilinositol, Cer es ceramida, Glc/GalCer es galactosil- o glucosilceramida, LacCer es lactosilceramida, Gb3 es Globotriaosilceramida, SM es esfingomielina, S1P es esfingosina-1-fosfato, SPH es esfingosina, SA1P es esfingonina-1-fosfato, SPA es esfingonina.

20

La nomenclatura X:Y indica, X el número total de átomos de carbono en las partes de ácido(s) graso(s) de la molécula, e Y es el número total de enlaces dobles en la parte(s) de ácido graso de la molécula.

25

La nomenclatura A/B indica, para una molécula de DAG y PC, los tipos A y B de fracciones de ácido graso unidas a la estructura glicerol de la molécula.

La nomenclatura (dC/A) indica, para una molécula de Cer, Gb, GlcCer, LacCer y SM, C el tipo de base de cadena larga con una amida unida, A, una fracción de ácido graso.

30

Un “*aumento*”, una “*disminución*”, o una “*diferencia*” en comparación con un control, de la manera en la que usa en la realizaciones reivindicadas y/o descritas en el presente documento, es uno(a) que (i) indica la eficacia del tratamiento con un fármaco hipolipemiante en un sujeto, (ii) predice la eficacia de un tratamiento con un fármaco hipolipemiante en un sujeto, (iii) indica el cumplimiento de un sujeto que está en tratamiento con un fármaco hipolipemiante, (iv) indica compuestos que son útiles como fármacos hipolipemiantes o para el tratamiento de enfermedad cardiovascular y sus complicaciones, o (v) indica especificidad de un inhibidor/silenciador de PCSK9, respectivamente. Preferentemente, se trata de un aumento, una disminución o una diferencia de al menos 5%. Más preferentemente, se trata de un aumento, una disminución o una diferencia de al menos 10%. Otros aumentos, disminuciones o diferencias, preferidos en comparación con el control, de acuerdo con la invención, son aumentos, disminuciones o diferencias de al menos 15%, más preferentemente de al menos 20%, e incluso más preferentemente de al menos 25%, 50%, 75% o 100%. Asimismo los aumentos, las disminuciones o diferencias de más del 100% se prefieren de una manera particularmente preferida.

35

40

Para los fines de la presente invención, un inhibidor/silenciador de PCSK9 es una molécula que impide la unión de PCSK9 con el receptor de LDL, particularmente con los receptores de LDL presentes en el hígado. Como se observa al inicio del presente documento, el inhibidor/silenciador de PCSK9 es preferentemente (a) un anticuerpo contra PCSK9; (b) un inhibidor farmacológico de PCSK9; (c) una molécula pequeña que inhibe la interacción del receptor de LDL con PCSK9; (d) un péptido que imita el dominio de interacción del receptor de LDL con PCSK9, (e) un ARNip específico de PCSK9, particularmente un ARNm de PCSK9; o (f) un oligonucleótido antisentido específico de PCSK9, particularmente ARNm de PCSK9.

50

En una realización preferida, el inhibidor/silenciador de PCSK9 es un anticuerpo que impide que PCSK9 se una al receptor de LDL. Dichos anticuerpos son muy conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos W02009/055783, W02008/063382, W02009/100297, W02008/125623 o W02009/026558) o pueden usarse adecuadamente en el contexto de la presente invención.

55

Del modo en que se usa en el presente documento, el término *anticuerpo* incluye anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos enteros, fragmentos de anticuerpo y subfragmentos de anticuerpo, que presentan unión específica con dicho lípido. Por tanto, dichos anticuerpos adecuados pueden ser inmunoglobulinas enteras de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, anticuerpos quiméricos o anticuerpos híbridos con especificidades antigénicas o epitópicas duales o múltiples, o fragmentos, por ejemplo, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', Fab y similares, incluyendo fragmentos híbridos y adicionalmente incluye una inmunoglobulina o cualquier proteína natural, sintética o modificada por ingeniería genética, que actúe como un anticuerpo uniéndose a un antígeno específico para formar un complejo. El término *anticuerpo* incluye fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos

65

monocatenarios, anticuerpos de dominio variable monocatenarios, fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fd, un fragmento Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos. Por ejemplo, pueden expresarse moléculas Fab y ensamblarse en un hospedador genéticamente transformado como *E. coli*. Un sistema de vector lambda está disponible por tanto, para expresar una población de fragmentos Fab con un potencial de diversidad igual o superando al del sujeto que genera el anticuerpo predecesor. Véase Huse WD, *et al.*, *Science* 1989, 246: 1275-81. Dichos Fab' se incluyen en la definición de *anticuerpo*. La capacidad de una molécula determinada, incluyendo un fragmento o subfragmento de anticuerpo, para actuar como un anticuerpo y unirse específicamente a un antígeno específico puede determinarse mediante ensayos de unión conocidos en la técnica, por ejemplo, usando el antígeno de interés como el compañero de unión.

10 Pueden prepararse anticuerpos contra lípidos de acuerdo con la presente invención por métodos muy conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, pueden inmunizarse ratones con un lípido con adyuvante. Los esplenocitos se recogen, como un conjunto, de los ratones que recibieron una administración de 3 inmunizaciones a intervalos de 2 semanas, realizando las extracciones de sangre del ensayo durante semanas alternativas para las titulaciones de los anticuerpos en suero. Los esplenocitos se preparan como 3 alícuotas que bien se usan inmediatamente en experimentos de fusión o se conservan en nitrógeno líquido para su uso en futuras fusiones.

Después, los experimentos de fusión que se realizan de acuerdo con el procedimiento de Stewart & Fuller, J. *Immunol. Methods* 1989, 123: 45-53. Los sobrenadantes de los pocillos con híbridos en crecimiento se exploran mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) para secretores de anticuerpos monoclonales (MAb) en placas de 96 pocillos ELISA recubiertas con dicho lípido. Los cultivos ELISA positivos se clonan mediante diluciones limitantes, típicamente obteniendo hibridomas establecidos de colonias sencillas después de experimentos de clonación de 2 series.

25 De la manera en la que se usa en el presente documento la expresión *molécula pequeña* se refiere a un compuesto orgánico de bajo peso molecular. Preferentemente, el límite superior de peso molecular para una molécula pequeña de acuerdo con la presente invención es de 2.500 Dalton, más preferentemente de 1.500 Dalton y prefiriéndose particularmente 800 Dalton. El tamaño y la carga de las moléculas pequeñas de la presente invención serán preferentemente tales que se permita la posibilidad de difundirse rápidamente a través de las membranas de la célula, de tal manera que las moléculas pequeñas puedan alcanzar sitios de acción intracelular.

Un *inhibidor farmacológico* de PCSK9, del modo en que se usa en el presente documento, puede ser una molécula pequeña. Sin embargo, también puede ser un polímero, por ejemplo, un polipéptido distinto de un anticuerpo, una glucoproteína, un proteoglicano, un ácido nucleico, por ejemplo, un aptámero, un carbohidrato o un lípido.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

#### 40 Materiales y métodos

Para realizar los análisis lipídicos se usaron muestras de plasma de animales de tipo silvestre (Ts), genosuprimidos homocigotos (Pcsk9<sup>-/-</sup>) y genosuprimidos heterocigotos (Pcsk9<sup>+/-</sup>) para el gen de PCSK9. Cada grupo tenía 18 ratones macho de 3 meses de vida. Hasta los 3 meses de vida los ratones se alimentaron con una dieta de pienso regular (día 0). Después de esto, los ratones se alimentaron primero con una dieta de pienso regular (2018 Teklad Global, Harlan Laboratories) durante dos semanas, después de las cuales 3 ratones de cada grupo se sacrificaron para realizar el muestreo de tejidos (día 15). La dieta del resto de los ratones se cambió a una dieta Western convencional (TD.88137 Harlan Teklad) durante un periodo de dos semanas, después del cual todos los ratones restantes se sacrificaron (día 30). La dieta Western contenía 34%, 21% y 0,2% de azúcar, grasa y colesterol, respectivamente, mientras que la dieta de pienso regular contenía 5%, 6% y 10% de estos ingredientes, respectivamente.

Antes de realizar la extracción sanguínea, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 4 h. Se extrajeron 250 µl de sangre de las mejillas, usando micro recipientes (BD) de 500 µl que contenían EDTA. Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4 °C. Los sobrenadantes (50 a 100 µl) se transfirieron a tubos Eppendorf transparentes. Las muestras se congelaron inmediatamente después del muestreo y se conservaron a -80 °C antes de realizar el análisis lipídico.

Para los análisis lipídicos globales (en inglés “*shotgun*”), se usaron 10 µl de plasma de ratón para la extracción de lípidos. Para la cuantificación de ceramidas y cerebrosidos, se usaron 50 µl de plasma de ratón para la extracción de lípidos. Este diseño del estudio permitió a los inventores determinar un perfil lipídico típico inducido por la inhibición de PCSK9 total (-/-) o parcial (+/-), con una dieta de pienso tanto regular como de tipo Western.

## Ejemplo 2

### Materiales y métodos

- 5 Este estudio es una sub-cohorte del estudio de LURIC que es un estudio prospectivo a gran escala sobre epidemiología cardiovascular. La base de datos LURIC contiene información clínica de más de 3.000 pacientes, que incluye datos iniciales de angiografía coronaria y datos clínicos habituales de laboratorio. En este estudio, los inventores compararon el perfil lipídico de sujetos portadores de una mutación conocida de pérdida de función (R46L, rs11591147, Abifadel, M. *et al.* 2003. Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hipercolesterolemia. *Nat. Genet* 34: 154-156) con el perfil lipídico de sujetos portadores del alelo principal con la función normal de PCSK9. Esta comparación permitió a los inventores determinar un perfil lipídico típico inducido por déficit parcial de PCSK9. En la Tabla 1 se describen las características clínicas.

**Tabla 1.** Características de fondo de pacientes LURIC analizados con lipídica

15

Variable	Controles (n=541)	Casos (n=12)
Edad (promedio)	65,1	66,3
LDL-C (mg/dl)	116,8	108,3
HDL-C (mg/dl)	36,8	38,2
Usuarios de hipolipemiantes	248	2

### Métodos analíticos

#### Espectrometría de masas dirigida a Lipídica

20

Se utilizó infusión directa acoplada a espectrometría de masas en tándem, es decir, lipídica global, lipídica de triacilglicerol y una estrategia de espectrometría de masas en tándem con cromatografía líquida (LC-MS/MS), es decir, lipídica de ceramidas y cerebrósidos y lipídica de esfingosinas para identificar el efecto de la concentración de PCSK9 disminuida analizando las especies lipídicas moleculares en suero humano y de ratón. Los métodos aplicados se optimizaron especialmente para la cuantificación de ésteres de colesterol (CE), colesterol libre (FC), fosfatidilcolinas (PC), lisofosfatidilcolinas (LPC) y otros lisofosfolípidos (LPL), fosfatidilcolinas ligadas a alquilo y a alqueno (PC O y PC P, respectivamente) y otros fosfolípidos ligados a alquilo o alqueno (PL O y PL P, respectivamente), fosfatidilserinas (PS), fosfatidiletanolaminas (PE), fosfatidilgliceroles (PG), fosfatidilinositoles (PI), ácidos fosfatídicos (PA), diacilgliceroles (DAG), triacilgliceroles (TAG), ceramidas (Cer), glucosil/galactosilceramidas (Glc/GalCer), latosilceramidas (LacCer) globotriaosilceramidas (Gb3), esfingosinas (SPH), esfingosina-1-fosfatos (S1P), esfingoninas (SPA) y espinganina-1-fosfatos (SA1P).

Se usaron los siguientes materiales de acuerdo con los métodos. El cloroformo, el metanol, el agua, el acetonitrilo, el ácido fórmico, el isopropanol, el acetato de amonio, el ácido acético, el cloruro de potasio y el hidroxitolueno butilado (BHT) de calidad para cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o LS-MS se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

En la lipídica de ceramidas y cerebrósidos, la columna (Acquity BEH C18, 2,1 x 50 mm id. 1,7  $\mu$ m) de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC) se adquirió en Waters (Milford, MA, USA). La pre-columna HPLC (Widopore C18 a x 2,0 mm) se adquirió en Phenomenex (Torrance, CA, USA). En la lipídica de esfingosina y esfingosina-1-fosfato, la columna de cromatografía líquida de interacción hidrófila (HILIC) (Atlantis HILIC 3 mm 2,1 x 50 mm) y la columna protectora de HPLC (Atlantis HILIC 3 mm 2,1 x 10 mm) se adquirieron en Waters (Milford, MA, USA). Todo el material de laboratorio usado para la extracción era resistente a cloroformo. Las puntas con filtro, resistentes a pulverización (Molecular BioProducts) y los tubos Eppendorf de 2 ml con cierre de seguridad, las placas de PCR twin-tec de 96 pocillos y las láminas de termosellado Pierce-it-lite se adquirieron en VWR International (West Chester, PA, USA). Las puntas con filtro CO-RE y las Uniplacas Whatman de 2 ml de 96 pocillos se adquirieron en Hamilton Robotics (Bonaduz, Suiza). Los patrones lípidos sintéticos se adquirieron en Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA), Matreya (Pleasant Gap, PA, USA) y Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA).

Los lípidos se extrajeron en cloroformo:metanol de acuerdo con los siguientes protocolos. Las muestras se adicionaron con cantidades conocidas de patrones internos sintéticos no endógenos para la normalización de los datos y para la cuantificación de lípidos endógenos. Los patrones externos sintéticos no endógenos adicionados después de la extracción se usaron para el control de calidad. Se prepararon soluciones madre de patrones disolviendo apropiadamente en cloroformo:metanol (2:1, v/v) cantidades ponderadas de cada patrón, para obtener una concentración final de 500 o 1000  $\mu$ M. Se creó una mezcla de patrón interno que contenía cada una de las reservas patrón y se usó en la extracción lipídica.

Se usaron 10  $\mu$ l de plasma humano y de ratón para la lipídica global y/o de triacilglicerol y/o cuantificación de colesterol libre y 10  $\mu$ l y 50  $\mu$ l de plasma humano y de ratón, respectivamente, para la lipídica de ceramidas y



cerebrósidos y/o de esfingosinas y de esfingosina-1-fosfato. No se analizaron muestras humanas para triacilglicérol, colesterol libre y bases esfingoides. Se realizaron extracciones lipídicas de una manera automática usando un sistema Hamilton MICROLAB STAR (Hamilton Robotics, Suiza). Las muestras bien mezcladas se dividieron en alícuotas en una Uniplaca Whatman de 2 ml de 96 pocillos que contenía metanol enfriado con hielo y BHT al 0,1%. Las muestras se mezclaron cuidadosamente después de cada etapa en el protocolo de extracción. La extracción se realizó a temperatura ambiente añadiendo un volumen apropiado de mezcla de patrón interno y cloroformo y metanol. En lipidómica global ("shotgun"), el triacilglicérol, la ceramida, el cerebrósido, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato, la separación de fase orgánica se facilitó añadiendo ácido acético 20 mM y centrifugando la placa durante 5 min a 500 x g. La fase orgánica se transfirió a una nueva Uniplaca Whatman de 2 ml de 96 pocillos.

10 La fase restante que contenía agua se lavó añadiendo un volumen apropiado de cloroformo seguido de centrifugación. Las dos fases orgánicas se agruparon y se evaporaron con N<sub>2</sub> hasta secarse completamente. Después, los extractos lipídicos volvieron a disolverse en cloroformo:metanol (1:2, v/v) incluyendo la adición del patrón externo sintético. Los extractos se conservaron en tubos Eppendorf de 2 ml con cierre de seguridad a una temperatura de -20 °C antes del análisis MS. Los volúmenes requeridos de los extractos de lípidos se dividieron en alícuotas en una placa PCR twin-tec de 96 pocillos Eppendorf y la placa se termoselló con un papel de aluminio para impedir la evaporación.

En la lipidómica global y en la de triacilglicérol, así como cuando se cuantifica el colesterol libre, los extractos lipídicos se analizaron en un espectrómetro de masas con trampa de iones híbrido triple cuadrupolo/lineal (QTRAP 5509, AB Sciex) equipado con una fuente iónica de nanoflujo robótica (NanoMate HD, Advion Biosciences). Los instrumentos funcionaron en modos de ion positivo y negativo. En modo ion positivo se estableció un voltaje de pulverización de 1,0 a 1,4 kV y en modo ion negativo fue de -1,0 a -1,4 kV. Se usó una presión de gas de 0,3-0,8 psi y el calentador de interfaz se estableció a 60 °C. La energía de colisión (EC) y el potencial de desagrupación (PD) se optimizaron para cada clase de lípido usando patrones sintéticos. El espectrómetro de masas funcionó en modo de resolución de unidad usando una velocidad de escaneo de 200 Da/s. Los lípidos moleculares se analizaron en modo ion, tanto positivo como negativo, usando escaneo de ion precursor múltiple (MPIS) y escaneo de pérdida neutral (NLS) como describen Stahlman y colaboradores (Stahlman M, *et al: High-throughput shotgun lipidomics by quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009). Los triacilglicérols se analizaron en modo ion positivo usando escaneo de pérdida neutral. El colesterol libre se derivatizó en CE 2:0 mediante cloruro de acetilo antes del análisis (Liebisch, G., *et al, High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS). Biochim Biophys Acta, 2006, 1761(1): p. 121-8*).

En la lipidómica de ceramidas y cerebrósidos, se realizaron análisis LC-EM/EM de la siguiente manera. El aparato cromatográfico consistió en un automuestreador CTC HTC PAL (CTC Analytics AG, Suiza), una bomba UHPLC Rheos Allegro (Flux Instruments AG, Suiza), un calentador de columna externa ajustado a 60 °C para la lipidómica de ceramidas y cerebrósidos y la columna C18 Acquity BEH con una pre-columna en línea. Las muestras extraídas, de 10 µl cada una, se inyectaron en la pre-columna seguido por la columna analítica y se suministraron al espectrómetro de masas a un caudal de 500 µl/min. En la lipidómica de ceramidas y cerebrósidos, se usó un gradiente para la separación de analitos lipídicos con disolvente A que comprendía acetato de amonio 10 mM en agua de calidad HPLC que contenía ácido fórmico al 0,1% y disolvente B de acetato de amonio 10 mM en acetonitrilo:isopropanol (4:3, v/v) que contenía ácido fórmico al 0,1%. El gradiente se construyó de la siguiente manera: 0 min – 65% B; 2 min – 65% B; 2,5 min – 75% B; 17,5 min – 100% B; 22,5 min – 100% B; 22,6 min – 65% B; 25 min – 65% B.

En la lipidómica de esfingosinas y esfingosina-1-fosfatos, se realizaron análisis LC-EM/EM se realizaron de la siguiente manera. El aparato cromatográfico consistió en un automuestreador CTC HTC PAL (CTC Analytics AG, Suiza), una bomba UHPLC de Rheos Allegro (Flux Instruments AG, Suiza), un calentador de columna externa ajustado a 50 °C y la columna HILIC de Atlantis con una columna protectora en línea. Las muestras extraídas, de 10 µl cada una, se inyectaron en la columna protectora seguido por la columna analítica y se suministraron al espectrómetro de masas a un caudal de 500 µl/min. En la lipidómica de esfingosinas y esfingosina-1-fosfatos, se usó un gradiente para la separación de analitos lipídicos con el disolvente A que comprendía formato de amonio 50 mmol/l en agua ultrapura con ácido fórmico al 0,2% y disolvente B de acetonitrilo con ácido fórmico al 0,2%. El gradiente se construyó de la siguiente manera: 0 min – 95% B; 0,70 min – 95% B; 1,50 min – 75% B; 1,51 min – 50% B; 1,70 min – 50% B; 1,71 min – 85% B; 3,00 min – 95% B; 4,00 min – 95% B.

En la lipidómica tanto de ceramidas y cerebrósidos como de esfingosinas y esfingosina-1-fosfatos, los extractos lipídicos se analizaron por LC-MS/MS. El análisis MS se realizó en un espectrómetro de masas con trampa de iones híbrido triple cuadrupolo/lineal equipado con la Fuente de iones Turbo V™ (4000 QTRAP, AB Sciex). El instrumento funcionó en modo ion positivo. El voltaje de la fuente de iones se estableció 5500 V y la fuente de temperatura a 400 °C. La energía de colisión (EC) y el potencial de desagrupación (PD) se optimizaron para cada clase de lípido usando patrones sintéticos. Para cada escaneo se aplicó un tiempo de permanencia de 20/25 s. Se aplicó el modo de escaneo de monitorización de reacción múltiple (MRM) y se basó en la descripción de Sullards y colaboradores (Sullards MC, *et al: Structure-specific, quantitative methods for análisis of sphingolipids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: "inside-out" sphingolipidomics. Methos Enzymol* 2007).

- El procesamiento de los datos se realizó de la siguiente manera: Inicialmente el tiempo de retención (en modo LC) y la identificación de cada pico se realizaron usando patrones endógenos y mediante experimentos de Adquisición Dependiente de Información (IDA) cuando fuera aplicable. Los datos originales se procesaron según el pico detectado y el tiempo de retención (en modo LC) de manera automática. Se aplicó un límite riguroso para la separación del ruido de fondo de los picos reales de lípidos. Cada muestra se controló y solamente se aceptó cuando se cumplían los criterios de aceptación rigurosos. Los recuentos del área pico (cps) de los picos detectados se convirtieron en un listado de nombres de lípidos correspondientes. Los lípidos se normalizaron a su patrón interno y volumen de muestra correspondientes para recuperar sus concentraciones.
- 10 La proporción de Estándares Internos (EI) sintéticos respecto a Estándares Externos (EE) adicionados post-extracto correspondientes, y los análisis MS de la matriz extraída y de disolventes sirvieron como controles de calidad (CC) del análisis. Además, las muestras plasmáticas de referencia extraídas se analizaron para monitorizar el rendimiento del instrumento, es decir, la variación intra e inter-ensayo.
- 15 Usando patrones sintéticos o aislados, antes del análisis de las muestras, se obtuvo una línea de calibración. Los patrones sintéticos se seleccionaron tomando como base su aplicación y tuvieron propiedades similares a las de los lípidos endógenos o analito(s) de interés. La línea de calibración consistía en un mínimo de cinco puntos de referencia que cubría el intervalo de cuantificación esperado. La línea de calibración se usó para determinar el intervalo dinámico de cuantificación para cada clase de lípido monitorizada, por ejemplo, los límites de cuantificación lineal. Dado que los patrones internos utilizados se comportaron de la misma manera que los lípidos endógenos, éstos se usaron para cuantificar las especies de lípidos endógenos. Las líneas de calibración se basaron en los mismos patrones internos que los que se usaron para la cuantificación de los lípidos endógenos.
- 20 Para cada plataforma, se aplicó un límite riguroso para separar el ruido de fondo de los picos de lípidos reales. Cada muestra se controló y solo se aceptó cuando se cumplían los criterios de aceptación. Las masas y los recuentos de los picos detectados se convirtieron en un listado de nombres de lípidos correspondientes. Los lípidos se normalizaron a su patrón interno y volumen de muestra correspondientes para recuperar sus concentraciones.

#### Análisis estadísticos

- 30 Los cambios de porcentaje en las concentraciones de los lípidos entre los grupos de control y de casos se calcularon de la siguiente manera:
- $$100 * (\text{PRM}[\text{C}] \text{ en el grupo de casos} - \text{PRM}[\text{C}] \text{ en grupo de control}) / \text{PRM}[\text{C}] \text{ en grupo de control.}$$
- 35 El significado estadístico se asignó tomando como base la prueba de la t.

#### Ética

- 40 El estudio de LURIC fue aprobado por el comité de revisión de ética del "Landesärztekammer Rheinland-Pfalz" (Mainz, Alemania). Se obtuvo el consentimiento informado por escrito de cada uno de los participantes. El comité de bioética de la IRCM para el cuidado de los animales dio su aprobación para realizar el estudio con ratones.

#### Resultados

- 45 Los biomarcadores lipídicos aparecieron como biomarcadores significativos de la actividad de PCSK9 disminuida. Una pérdida de un alelo de *Pcsk9* fue suficiente para inducir cambios significativos en las concentraciones de esfingolípidos, comparables a los cambios observados en ratones *Pcsk9*<sup>-/-</sup>. Los ácidos grasos 16:0 que contenían especies de esfingomielina [SM(d18:1/16:0)], ceramida [Cer(d18:1/16:0)], glucosil/galactosilceramida [Glc/GalCer(d18:1/16:0)], y lactosilceramida [LacCer(d18:1/16:0)] aparecían como las especies de lípidos más afectadas en ratones tanto *Pcsk9*<sup>-/-</sup> como *Pcsk9*<sup>+/-</sup> cuando los animales estaban con la dieta de pienso (Fig. 1A y 1B, y Tabla 2a y 2b, respectivamente). Por el contrario, se demostró que los triacilgliceroles (TAG) estaban significativamente más concentrados en el plasma de ratones *Pcsk9*<sup>-/-</sup> y *Pcsk9*<sup>+/-</sup> en comparación con los ratones de tipo silvestre (Ts).
- 55 En comparación con el estado de alimentación con la dieta de pienso regular, se registraron cambios claramente menos significativos en ratones *Pcsk9*<sup>-/-</sup> con una dieta Western (Fig. 1C, Tabla 2c). Cabe destacar que, los ratones *Pcsk9*<sup>+/-</sup> con dieta Western demostraron cambios más significativos en las concentraciones de lípidos que los ratones *Pcsk9*<sup>-/-</sup> (Fig. 1D, Tabla 2d). Apareció un cambio típico en el plasma de ratones deficientes en PCSK9 con dieta Western, que disminuía las especies de Cer, Glc/GalCer y LacCer con cadenas grasas de acilo largas, tales como Glc/GalCer(d18:1/24:0), Cer(d18:1/24:0) y LacCer(d18:1/24:0).
- 60

Se observó un cambio lipídico similar en seres humanos portadores de una mutación de pérdida de función de PCSK9. Las especies de lípidos más significativamente reducidas en seres humanos, portadores de la variante de pérdida de función conocida en el gen de PCSK9 (R46L), incluyeron las mismas especies de Glc/GalCer, LacCer y

65

SM, como ya se observó en los modelos de ratón *Pcsk9<sup>-/-</sup>* y *Pcsk9<sup>+/-</sup>* (Fig. 2, Tabla 3). Sin embargo, debido al número limitado de muestras humanas, la mayoría de los cambios observados no alcanzaron el nivel de significación estadística. Además, en muestras de plasma de seres humanos en ayunas, no pudo observarse separación de especies de lípidos tomando como base la longitud de la cadena grasa de acilo. A diferencia del plasma de ratón, las concentraciones de dos especies de colesterol éster, la CE 20:3 y la CE 20:4 se redujeron significativamente en plasma humano debido al déficit de PCSK9.

Como se ha descrito anteriormente, en este estudio se cuantificó un total de 190 lípidos moleculares y 257 ácidos grasos TAG. De estos, 63 lípidos moleculares y 105 ácidos grasos TAG eran biomarcadores significativos tomando como base los criterios establecidos. En las **Tablas 2 y 3** se presentan los candidatos biomarcadores significativos, tomando como base las concentraciones de lípidos moleculares. En seres humanos, los biomarcadores seleccionados tenían un rendimiento mejorado sobre los biomarcadores tradicionalmente usados, tales como colesterol LDL. Los lípidos individuales que tienen un rendimiento mejorado sobre los marcadores tradicionales se indican en la **Tabla 3a**. La **Tabla 3b** muestra una lista de proporciones de concentración lípido-lípido que tienen un rendimiento mejorado sobre los lípidos individuales.

En las **Tablas 4 y 5** también se indica una lista de biomarcadores.

La **Tabla 6** representa especies de TAG en bruto y las posibles combinaciones de ácidos grasos que contribuyen a cada especie en bruto. El TAG en bruto presenta la suma de los tres ácidos grasos y el número de enlaces dobles de una molécula TAG. La Tabla 6 representa algunos ejemplos de cada especie de TAG en bruto pero también puede haber otras combinaciones.

**Tabla 2a.** Biomarcadores significativos tomando como base la medición individual de lípidos y la proporción de concentración lípido-lípido detectada en ratones *PCSK9<sup>-/-</sup>* con una dieta de pienso regular en comparación con ratones de tipo silvestre. Se muestran los nombres de las especies, los valores *p* y la variación porcentual. En la Tabla 6 se describen las diferentes composiciones de ácidos grasos.

Ratones <i>PCSK9<sup>-/-</sup></i> en comparación con el tipo silvestre con una dieta de pienso regular					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
Disminución			Aumento		
TAG 60:12 FA 20:4	-64,990	2,508E-04	TAG 50:5	156,815	1,316E-02
TAG 60:12	-64,990	2,508E-04	TAG 55:3	152,265	2,968E-02
TAG 58:10 FA 20:4	-64,073	1,341E-03	TAG 51:4 FA 15:0	86,98016	1,780E-02
TAG 58:10	-22,734	1,905E-01	TAG 51:4	145,866	9,870E-03
LacCer(d18:1/24:0)	-61,734	1,802E-06	TAG 50:2 FA 18:2	76,248	7,679E-02
Glc/GalCer(d18:1/20:0)	-61,304	5,021E-07	TAG 50:2	123,880	1,296E-01
Glc/GalCer(d18:1/18:0)	-60,966	7,032E-14	TAG 50:4 FA 14:0	77,875	2,216E-02
Glc/GalCer(d18:1/22:0)	-58,750	2,897E-06	TAG 50:4	128,492	7,890E-02
TAG 56:9 FA 20:4	-57,499	4,513E-04	TAG 54:3 FA 16:0	62,577	3,325E-02
TAG 56:9 FA 18:3	-37,299	1,072E-02	TAG 54:3 FA 18:2	99,394	1,796E-02
TAG 56:9	-28,883	1,264E-01	TAG 54:3	106,898	3,787E-02
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-56,593	4,968E-12	TAG 53:4 FA 18:2	88,635	8,278E-03
Glc/GalCer total	-55,866	6,261E-07	TAG 53:4	106,150	6,500E-03
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	-54,947	2,058E-16	TAG 52:6	101,188	2,561E-02
LacCer(d18:1/16:0)	-54,523	8,517E-10	TAG 54:4 FA 18:2	84,418	2,500E-02
TAG 58:9 FA 20:4	-53,838	6,457E-04	TAG 54:4 FA 18:1	78,619	4,889E-02
TAG 58:9	-1,979	8,979E-01	TAG 54:4 FA 18:0	77,628	9,456E-03
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-53,028	6,967E-05	TAG 54:4	83,059	3,721E-02
LacCer total	-51,984	4,137E-08	TAG 52:4 FA 18:2	70,069	2,305E-02
CE 16:1	-51,509	3,221E-05	TAG 52:4 FA 16:0	64,013	2,820E-02
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-51,294	5,712E-05	TAG 52:4	73,643	2,485E-02
Glc/GalCer(d18:1/26:0)	-50,524	2,374E-04	TAG 56:4 FA 18:1	91,940	4,847E-02
Cer(d18:1/22:0)	-49,683	9,847E-08	TAG 56:4	89,544	5,546E-02
Cer(d18:1/20:0)	-48,392	2,989E-09	TAG 54:5 FA 18:1	75,955	1,000E-02
SM (d18:1/16:1) (d18:1/15:2-OH)	-47,581	6,693E-07	TAG 54:5 FA 18:2	74,494	4,962E-03
Cer(d18:1/18:0)	-46,286	3,817E-06	TAG 54:5	70,166	1,239E-02
CE 14:0	-45,541	3,299E-05	TAG 52:5 FA 18:2	71,092	4,892E-02
CE 16:0	-45,218	1,010E-12	TAG 52:5 FA 18:3	61,858	3,526E-02
LacCer(d18:1/24:1)	-44,119	1,054E-05	TAG 52:5	69,317	4,417E-02
CE 18:1	-42,857	1,547E-10	TAG 54:6 FA 18:2	78,005	2,522E-03
CE 18:2	-41,802	6,076E-11	TAG 54:6 FA 18:1	65,617	1,854E-02
FC	-41,774	1,139E-10	TAG 54:6 FA 18:3	57,726	3,365E-02
CE 18:3	-41,356	2,182E-10	TAG 54:6	52,606	1,530E-02
LacCer(d18:1/22:0)	-41,134	1,239E-03	TAG 56:5 FA 18:2	71,286	2,510E-02
TAG 56:8 FA 20:4	-40,099	9,167E-03	TAG 56:5 FA 20:1	68,247	2,564E-02
TAG 56:8	8,278	6,507E-01	TAG 56:5	71,820	4,739E-02
CE 22:5	-39,993	1,070E-02	TAG 56:6 FA 18:2	58,754	3,922E-02
CE total	-39,638	1,073E-09	TAG 56:6	30,327	2,893E-01
PC 16:0/16:0	-39,452	4,758E-06	TAG 54:7 FA 18:2	52,396	2,256E-02
CE 22:6	-39,271	2,050E-08	TAG 54:7 FA 18:3	50,258	4,750E-02
PC 16:0/18:1	-39,038	8,272E-06	TAG 54:7	40,748	4,048E-02

ES 2 552 371 T3

Cer total	-38,285	5,399E-06	TAG total	47,255	4,230E-02
LPE total	-38,219	3,272E-02			
Glc/GalCer(d18:1/26:1)	-37,439	1,426E-02			
TAG 56:7 FA 20:4	-36,094	2,192E-03			
TAG 56:7	4,516	8,23 IE-01			
PC 18:0/18:1	-35,534	2,324E-05			
CE 20:4	-34,208	1,783E-05			
CE 20:3	-33,966	3,821E-02			
SM (d18:1/24:1) (d18:1/23:2-OH)	-33,856	7,152E-04			
Cer(d18:1/24:1)	-33,646	9,245E-05			
CE 17:1	-33,524	4,173E-03			
PC 18:1/18:1	-33,350	1,936E-02			
Cer(d18:1/24:0)	-33,095	1,606E-03			
CE 20:5	-32,845	8,999E-03			
PC total	-32,432	1,481E-07			
PC 16:0/20:3	-32,324	1,542E-02			
PC 16:0/18:2	-32,309	2,042E-07			
PC 18:0/18:2	-32,095	1,116E-05			
PC 18:0/22:6	-30,973	2,463E-04			
PC 18:1/20:4	-30,513	1,352E-02			
PC 16:0/22:6	-30,321	1,159E-05			
PI 18:0/20:4	-29,759	3,149E-06			
CE 15:0	-27,608	1,578E-02			
Cer(d18:1/16:0)	-26,897	1,773E-03			
Cer(d18:1/26:1)	-30,721	7,786E-03			
LPC 16:0	-20,017	4,196E-04			
LPC total	-17,349	9,137E-04			
<b>Ratones PCSK9<sup>+/+</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta de pienso regular</b>					
<b>Proporción de concentración lípido-lípido</b>	<b>Variación porcentual</b>	<b>valor p</b>	<b>Proporción de concentración lípido-lípido</b>	<b>Variación porcentual</b>	<b>valor p</b>
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/LPC 18:2	-50,893	9,485E-10	Cer(d18:0/24:0)/ Glc/GalCer(d18:1/18:0)	185,871	3,695E-06
Cer(d18:1/18:0)/Esfingosina d16:1	-51,057	1,878E-06	Cer(d18:0/24:0)/ LacCer(d18:1/16:0)	141,343	2,425E-05
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/PC 18:2/18:2	-51,694	1,060E-06	TAG 58:10/TAG 60:12	139,279	6,521E-07
CE 16:1/LPC 20:4	-52,821	7,039E-06	Cer(d18:0/24:0)/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	138,225	1,317E-06
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/Esfinganina-1 - fosfato d18:0	-55,633	1,568E-07	Cer(d18:0/22:0)/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	119,864	1,274E-07
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/LPC 18:2 (d18:1/15:1-OH)	-55,805	2,189E-09	LPC 18:2/SM (d18:1/16:0)	98,384	7,626E-12
LacCer(d18:1/16:0)/Esfingosina d16:1	-57,265	5,627E-06	LPC 18:2/LacCer(d18:1/16:0)	94,112	3,915E-10
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)/Esfingosina d16:1	-58,151	3,565E-08	Cer(d18:0/24:0)/FC	89,233	0,000E+00
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/Esfingosina d16:1	-61,257	1,345E-07	Cer(d18:1/26:1)/ Glc/GalCer(d18:1/18:0)	89,153	3,214E-05
CE 18:1/TAG 54:7	-62,395	8,602E-05	Cer(d18:0/22:0)/ Cer(d18:1/22:0)	82,249	1,926E-07
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/Esfingosina d18:1	-66,767	4,53 8E-06	Cer(d18:1/26:1)/ Glc/GalCer(d18:1/16:0)	81,958	5,201E-05
Cer(d18:1/18:0)/TAG 52:5	-68,662	9,244E-05	LPC 16:0/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	79,420	2,663E-10
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)/TAG 54:6	-72,138	7,999E-05	PC 18:0/20:4/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	70,011	5,229E-08
Glc/GalCer(d18:1/20:0)/TAG 52:5	-79,327	9,153E-05	TAG 52:5/TAG 56:7	66,808	4,896E-07
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/TAG 54:6	-79,363	3,995E-05	Cer(d18:1/16:0)/Glc/GalCer(d18:1/16:0)	63,539	2,374E-09
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/TAG 52:3	-79,470	6,181E-05	CE 20:4/Glc/GalCer(d18:1/18:0)	62,767	2,045E-08
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/TAG 54:3	-79,758	5,002E-05	Cer(d18:0/24:0)/PC 16:0/18:2	59,693	0,000E+00
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/TAG 52:4	-79,855	3,166E-05	CE 22:6/Glc/GalCer(d18:1/18:0)	50,609	1,465E-07
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/TAG 52:4	-82,312	4,937E-05			

**Tabla 2b.** Biomarcadores significativos tomando como base la medición individual de lípidos y la proporción de la concentración lípido-lípido detectada en ratones PCSK9<sup>+/+</sup> con una dieta de pienso regular en comparación con los ratones de tipo silvestre. Se presentan los nombres de las especies, los valores p y los cambios de porcentaje.

5

<b>Ratones PCSK9<sup>+/+</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta de pienso regular</b>					
<b>Lípido</b>	<b>Variación porcentual</b>	<b>valor p</b>	<b>Lípido</b>	<b>Variación porcentual</b>	
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
TAG 60:12 FA 20:4	-44,777		TAG 53:3 FA 17:0	135,356	
TAG 60:12	-44,777		TAG 53:3 FA 18:2	110,794	
Glc/GalCer(d18:1/22:0)	-38,116	1,072E-03	TAG 53:3 FA 18:1	63,497	
TAG 58:7 FA 22:5	-36,296		TAG 53:3	98,444	
TAG 58:7	-16,719		TAG 49:2 FA 18:2	128,655	
Glc/GalCer(d18:1/20:0)	-36,166	1,126E-03	TAG 49:2 FA 15:0	81,288	
TAG 58:9 FA 20:4	-35,280		TAG 49:2 FA 16:0	46,357	
TAG 58:9	-12,061		TAG 49:2	81,946	

ES 2 552 371 T3

Glc/GalCer total	-34,200	8,552E-04	TAG 54:8 FA 18:3	72,857
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-34,067	4,625E-03	TAG 54:8	45,668
TAG 54:7 FA 16:1	-31,485		TAG 50:4 FA 16:2	71,219
TAG 54:7 FA 20:4	-19,366		TAG 50:4 FA 14:0	65,347
TAG 54:7	25,776		TAG 50:4 FA 18:2	52,949
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-30,734	1,378E-02	TAG 50:4 FA 16:0	31,487
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	-30,205	1,297E-08	TAG 50:4	46,374
TAG 58:10 FA 20:4	-29,587		TAG 56:3 FA 20:1	69,839
TAG 58:10	-6,838		TAG 56:3 FA 18:1	23,266
Glc/GalCer(d18:1/18:0)	-29,219	7,332E-06	TAG 56:3	41,617
TAG 56:9 FA 20:4	-28,188		TAG 54:3 FA 18:2	67,212
TAG 56:9	-25,833		TAG 54:3 FA 20:1	59,887
TAG 56:5 FA 20:3	-27,595		TAG 54:3 FA 16:0	40,549
TAG 56:5	9,946		TAG 54:3	57,889
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-27,063	6,051E-05	TAG 54:4 FA 18:0	63,987
LacCer(d18:1/24:0)	-35,343	2,402E-03	TAG 54:4 FA 18:2	45,810
TAG 54:4 FA 20:3	-25,768		TAG 54:4 FA 20:2	43,761
TAG 54:4	35,266		TAG 54:4 FA 18:1	28,831
TAG 58:8 FA 18:2	-24,677		TAG 54:4 FA 16:0	16,648
TAG 58:8	-3,510		TAG 54:4	35,266
Total LacCer	-24,058	3,203E-03	TAG 50:2 FA 18:2	62,114
LacCer(d18:1/22:0)	-23,147	4,961E-02	TAG 50:2 FA 16:0	27,001
TAG 56:7 FA 20:4	-22,839		TAG 50:2 FA 14:0	25,767
TAG 56:7	-10,897		TAG 50:2	35,859
Glc/GalCer(d18:1/26:0)	-22,797	6,959E-02	TAG 53:4 FA 18:2	61,260
Cer(d18:1/22:0)	-22,584	5,909E-03	TAG 53:4	43,469
TAG 56:8 FA 20:4	-21,569		TAG 54:6 FA 18:2	61,238
TAG 56:8	-6,916		TAG 54:6 FA 18:1	32,069
LacCer(d18:1/16:0)	-20,192	4,711E-03	TAG 54:6 FA 18:3	16,262
LacCer(d18:1/24:1)	-19,792	2,750E-02	TAG 54:6	32,549
CE 18:3	-19,265	4,349E-04	TAG 54:5 FA 18:2	61,074
Cer(d18:1/18:0)	-18,329	4,180E-02	TAG 54:5 FA 18:1	56,979
Cer(d18:0/22:0)	-17,737	1,486E-01	TAG 54:5	48,831
PC 18:0/22:6	-17,696	2,093E-02	TAG 50:3 FA 18:3	56,000
FC	-16,776	1,655E-03	TAG 50:3 FA 18:2	32,037
Glc/GalCer(d18:1/26:1)	-16,753	1,901E-01	TAG 50:3	14,123
Cer(d18:0/24:1)	-16,574	1,908E-01	TAG 56:5 FA 18:2	52,163
PC 16:0/16:0	-16,026	3,590E-02	TAG 56:5 FA 20:1	44,606
TAG 56:6 FA 20:4	-16,001		TAG 56:5 FA 20:2	28,250
TAG 56:6	-5,937		TAG 56:5	9,946
Cer total	-15,497	4,131E-02		

Ratones PCSK9<sup>-/-</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta de pienso regular

Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p	Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/22:0)/PC 16:0/18:2	-12,964	0,000E+00	CE 20:5/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	82,189	7,377E-03
FC/PC 18:0/20:3	-25,581	3,816E-03	CE 20:5/Glc/GalCer(d18:1/22:0)	82,061	2,129E-03
CE 18:3/CE 20:5	-26,155	3,455E-03	PC 18:2/18:2/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	63,587	9,679E-06
FC/LPC 16:1	-30,754	5,212E-03	CE 20:5/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	62,662	2,087E-04
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/PC 18:0/20:4	-31,147	2,324E-05	Cer(d18:0/24:0)/LacCer(d18:1/24:0)	61,005	1,146E-02
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/LPC 18:2	-31,822	1,556E-05	LPC 16:1/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	57,606	2,495E-03
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/PC 16:0/20:4	-33,636	1,669E-05	PC 18:1/20:4/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	55,007	3,384E-04
CE 18:3/LPC 16:1	-34,274	5,376E-03	LPC 20:4/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	53,454	5,406E-04
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)/Esfingosina d16:1	-35,255	1,603E-04	PC 18:1/18:2/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	52,347	6,620E-05
Cer(d18:1/22:0)/LPC 20:4	-35,825	3,493E-03	CE 20:5/LacCer(d18:1/16:0)	51,636	9,063E-03
Glc/GalCer(d18:1/22:0)/Esfingosina d16:1	-43,303	1,522E-02	CE 20:4/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	42,452	1,598E-05
Glc/GalCer(d18:1/22:0)/PC 18:1/18:2	-44,396	9,622E-04	CE 20:5/FC	41,327	2,339E-03
Glc/GalCer(d18:1/20:0)/LPC 16:1	-49,264	1,000E-02	LPC 16:0/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	40,008	1,817E-04
Glc/GalCer(d18:1/20:0)/LPC 20:4	-49,948	6,554E-04	PI 18:0/20:4/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	33,148	7,497E-04
Glc/GalCer(d18:1/22:0)/LPC 16:1	-50,721	8,458E-03	CE 20:5/PC 16:0/16:0	31,095	2,629E-02
Glc/GalCer(d18:1/22:0)/LPC 20:4	-51,506	8,433E-04	LPC 18:2/LacCer(d18:1/16:0)	30,712	9,605E-03

**Tabla 2c.** Biomarcadores significativos tomando como base la medición individual de lípidos y la proporción de la concentración lípido-lípido detectada en ratones PCSK9<sup>-/-</sup> con una dieta Western en comparación con los ratones de tipo silvestre. Se presentan los nombres de las especies, los valores p y los cambios de porcentaje.

5

Ratones PCSK9 <sup>-/-</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta Western					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
CE 18:0	-53,952	3,305E-03	Esfingosina (SPH) d16:1	64,323	1,533E-03
TAG 56:5 FA 18:2	-69,447		TAG 50:2 FA 18:1	55,940	4,029E-02
TAG 56:5 FA 18:1	-40,184	3,929E-01	TAG 50:2 FA 16:0	47,004	4,740E-02
TAG 56:5 FA 20:2	-64,835		TAG 50:2 FA 14:0	21,986	3,838E-01

Ratones PCSK9 <sup>-/-</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta Western					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
TAG 56:5 FA 20:3	-36,442	4,788E-01	TAG 50:2 FA 18:2	17,037	4,435E-01
TAG 56:5	-49,388	3,306E-01	TAG 50:2	47,040	5,626E-02
TAG 58:8 FA 18:1	-65,029				
TAG 58:8 FA 22:6	-56,332		SPH Total	50,856	5,789E-03
TAG 58:8	-60,483		TAG 50:3 FA 16:1	50,410	2,678E-02
TAG 58:7 FA 18:1	-63,977		TAG 50:3 FA 18:3	37,040	
TAG 58:7 FA 22:5	-48,248		TAG 50:3 FA 18:2	33,534	1,033E-01
TAG 58:7	-55,754		TAG 50:3 FA 16:0	19,397	3,852E-01
TAG 56:8 FA 22:6	-48,846		TAG 50:3	39,099	5,636E-02
TAG 56:8 FA 16:0	-35,490		Esfingosina d18:1	49,840	7,175E-03
TAG 56:8 FA 18:2	-33,612		TAG 50:4 FA 16:1	47,909	
TAG 56:8	-46,650		TAG 50:4	16,664	
TAG 56:6 FA 18:1	-47,995		TAG 52:3 FA 16:1	43,537	6,661E-02
TAG 56:6 FA 20:4	-43,581		TAG 52:3 FA 18:0	35,461	
TAG 56:6 FA 20:3	-35,657		TAG 52:3 FA 18:1	26,714	2,263E-01
TAG 56:6 FA 18:2	-24,983		TAG 52:3	18,534	3,544E-01
TAG 56:6 total	-29,092		TAG 49:2 FA 16:0	42,140	
Cer(d18:0/24:0)	-36,791	2,958E-02	TAG 49:2 FA 15:0	15,169	
Cer(d18:1/26:1)	-32,004	2,558E-04	TAG 49:2 total	22,766	
Cer(d18:0/22:0)	-28,800	3,316E-02	Esfinganina d18:0	41,602	8,815E-03
Glc/GalCer(d18:1/26:1)	-27,701	4,231E-03	TAG 53:3 FA 18:1	36,680	
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-26,867	2,746E-02	TAG 53:3	23,391	
Cer(d18:1/26:0)	-26,304	7,863E-03	TAG 52:2 FA 16:0	31,623	1,379E-01
Cer(d18:1/24:0)	-25,281	1,231E-03	TAG 52:2 FA 18:1	30,549	2,502E-01
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-25,124	1,452E-02	TAG 52:2	30,933	1,966E-01
CE 16:0	-22,506	1,299E-04	TAG 54:7 FA 18:2	29,707	
Total Glc/GalCer	-22,165	1,058E-01	TAG 54:7 FA 18:3	16,926	
Cer(d18:1/22:0)	-22,045	1,310E-01	TAG 54:7	2,091	
Glc/GalCer(d18:1/20:0)	-20,419	2,949E-01	LPC 16:1	27,750	1,120E-01
LacCer(d18:1/24:0)	-20,357	1,060E-01	Esfingosina-1-fosfato (SIP) d18:	21,375	5,453E-02
CE 18:1	-19,571	3,429E-02	Total SIP	21,375	5,453E-02
Cer(d18:1/20:0)	-19,501	3,481E-01	Total TAG	20,052	3,701E-01
LacCer(d18:1/22:0)	-19,021	7,362E-02	TAG 56:6 FA 22:4	17,596	
Total Cer	-18,476	5,787E-02	TAG 56:6	-29,092	
PC 16:0/16:0	-18,244	1,262E-01	Esfinganina-1-fosfato d18:0	16,834	2,617E-01
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-16,527	2,436E-01			
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	-15,898	1,986E-01			
Ratones PCSK9 <sup>+/-</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta Western					
Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p	Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
CE 16:0/CE 20:3	-48,833	1,67E-04	LPC 16:1/TAG 56:5	117,120	4,74E-03
Cer(d18:0/24:0)/Cer(d18:1/18:0)	-49,008	8,69E-04	Cer(d18:1/18:0)/Cer(d18:1/26:1)	88,778	1,09E-02
Cer(d18:1/24:0)/LPC 16:1	-49,150	3,63E-04	TAG 50:2/TAG 54:5	86,223	3,35E-02
CE 18:1/Esfingosina d16:1	-49,803	1,16E-05	CE 20:3/Glc/GalCer(d18:1/16:0)	84,705	1,31E-02
PC 16:0/16:0/Esfingosina d16:1	-50,221	9,85E-06	CE 20:3/TAG 54:4	82,091	2,72E-02
Cer(d18:0/22:0)/Esfingosina d16:1	-51,551	3,75E-05	PC 18:2/18:2/TAG 56:5	76,494	4,27E-02
Cer(d18:1/24:0)/Esfingosina d16:1	-51,685	4,14E-06	CE 20:3/PC 16:0/16:0	70,816	7,47E-03
Cer(d18:0/24:0)/PC 18:2/18:2	-52,891	8,28E-03	Cer(d18:1/18:0)/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	64,951	7,32E-03
Cer(d18:0/24:0)/PC 16:0/20:4	-53,440	1,63E-02	CE 20:3/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	58,191	1,14E-02
Cer(d18:0/24:0)/Esfinganina d18:0	-54,294	9,41E-03	Cer(d18:1/18:0)/Cer(d18:1/22:0)	54,941	1,35E-02
Cer(d18:1/26:1)/LPC 16:1	-54,395	1,43E-03	LPC 16:1/PC 16:0/16:0	53,424	3,69E-03
Cer(d18:0/24:0)/PC 16:0/20:3	-54,574	2,28E-02	CE 20:3/FC	52,675	2,54E-02
Glc/GalCer(d18:1/16:0)/Esfingosina d16:1	-54,630	1,22E-04	LPC 16:1/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	47,406	6,67E-03
Cer(d18:0/24:0)/Esfingosina d16:1	-58,674	4,36E-04	Cer(d18:1/24:1)/Cer(d18:1/26:1)	46,396	2,48E-03
Cer(d18:0/24:0)/LPC 16:1	-61,145	1,34E-03	Esfingosina d16:1/Esfingosina-1-fosfato d18:1	37,012	2,81E-03
			PI 18:0/20:4/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	36,227	9,39E-03

**Tabla 2d.** Biomarcadores significativos tomando como base la medición individual de lípidos o la proporción de concentración lípido-lípido detectada en ratones PCSK9<sup>+/-</sup> con una dieta Western en comparación con los ratones de tipo silvestre. Se presentan los nombres de las especies, los valores p y los cambios de porcentaje.

5

Ratones PCSK9 <sup>+/+</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta Western					
Nombre de la medición	Variación porcentual	valor p	Nombre de la medición	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/22:0)	-58,820	3.240E-05	Esfingosina (SPH) d16:l	107,934	4,509E-07
Cer(d18:0/24:0)	-57,003	5.688E-04	SPH Total	75,244	4,162E-05
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-54,076	9.882E-07	Esfingosina d18:1	72,779	7,344E-05
Glc/GalCer(d18:1/26:1)	-51,762	5.315E-07	Esfinganina-1-fosfato d18:0	70,319	1,192E-05
Cer(d18:0/24:1)	-51,729	4.012E-03	Esfinganina d18:0	62,423	7,539E-05
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-48,741	6.131E-04	Esfingosina-1-fosfato d18:1	53,308	6,250E-06
Cer(d18:1/24:0)	-47,795	2.927E-08	CE 20:4	50,933	1,436E-02
Cer(d18:1/26:1)	-47,142	2.122E-07	SM (d18:1/24:0) (d18:1/23:1-OH)	49,321	4,971E-02
LacCer(d18:1/24:0)	-45,674	2.048E-04	PC 18:1/22:6	41,215	4,282E-02
Glc/GalCer(d18:1/26:0)	-43,777	3.426E-04	PC 18:1/20:4	39,998	4,105E-02
Total Glc/GalCer	-43,704	1.188E-03	LPC 16:1	30,783	5,904E-02
Glc/GalCer(d18:1/22:0)	-43,038	9.953E-03	PC 16:0/20:3	30,331	1,023E-01
CE 18:0	-38,988	3.123E-02	PC 16:0/22:6	26,848	7,083E-02
LacCer(d18:1/22:0)	-38,829	2.682E-04	CE 22:6	26,051	1,43 IE-01
Total Cer	-36,509	1.904E-04	CE 18:2	25,895	5,265E-02
Cer(d18:1/26:0)	-35,073	2.640E-04	CE Total	25,389	4,560E-02
LacCer(d18:1/24:1)	-33,935	2.435E-04	PC 16:0/20:4	22,578	9,245E-02
Cer(d18:1/22:0)	-32,533	1.857E-02	CE 16:1	21,981	1,514E-01
Cer(d18:1/24:1)	-29,447	1.722E-02	CE 18:3	21,230	8,476E-02
LacCer Total	-29,179	2.627E-04	Cer(d18:1/18:0)	20,846	2,314E-01
Glc/GalCer(d18:1/20:0)	-28,509	1.167E-01	PI 18:0/20:4	19,870	1,635E-01
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-24,831	2.714E-02	PC 18:2/18:2	19,299	1,19 IE-01
CE 16:0	-19,411	3.007E-04	LPC 20:4	16,370	2,785E-01
			PC 18:1/18:2	15,307	1,773E-01
Ratones PCSK9 <sup>+/+</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta Western					
Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p	Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/24:1)/FC	-56,408	0.000E+00	CE 20:3/Glc/GalCer(d18:1/26:1)	360,547	1,498E-03
LacCer(d18:1/16:0)/Esfingosina d16:a	-56,691	9.21 IE-10	CE 20:3/Cer(d18:0/24:0)	305,964	1,938E-04
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/PC 16:0/20:4	-61,038	2.913E-10	CE 20:3/Cer(d18:1/24:0)	300,319	4,185E-04
CE 16:0/Esfingosina d16:1	-64,159	1.949E-08	CE 20:3/Cer(d18:0/22:0)	299,250	1,003E-04
Glc/GalCer(d18:1/24:1)/Esfingosina d18:1	-68,880	7.661E-06	CE 20:3/Cer(d18:1/26:1)	282,779	9,631E-05
Cer(d18:1/24:0)/Esfingosina d18:1	-69,354	7.730E-09	CE 20:4/Cer(d18:0/22:0)	268,566	1,737E-06
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/Esfingosina-1-fosfato d18:1	-69,806	1.083E-08	CE 20:5/Cer(d18:0/22:0)	255,932	6,261E-06
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/Esfingosina d18:1	-72,584	4.488E-08	CE 20:4/Cer(d18:0/24:0)	241,592	2,033E-05
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/Esfingosina -1-fosfato d18:0	-72,647	3.066E-08	CE 20:4/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	219,850	4,296E-08
Cer(d18:0/24:0)/PC 18:1/20:4	-73,450	7.227E-04	CE 20:5/Cer(d18:0/24:1)	210,249	2,136E-05
Cer(d18:1/24:0)/Esfingosina d16:1	-75,303	5.327E-10	CE 22:6/Cer(d18:0/22:0)	210,101	7,122E-06
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/Esfingosina d16:1	-78,076	1.085E-10	CE 16:1/Cer(d18:0/22:0)	197,486	8,513E-06
Cer(d18:0/24:0)/Esfingosina d16:1	-79,943	1.970E-06	Cer(d18:1/18:0)/Glc/GalCer(d18:1/26:1)	176,575	6,844E-04
			CE 18:2/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	171,724	5,882E-09
			CE 18:3/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	157,031	4,734E-09
			Cer(d18:1/18:0)/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	155,600	1,81 IE-08
			LPC 16:1 /LacCer(d18:1 /24:0)	129,430	4,599E-03

**Tabla 3a.** Biomarcadores significativos tomando como base la medición individual de lípidos en muestras de ser humano. Se presentan los nombres de las especies, los valores p y las variaciones porcentuales. También se indican los biomarcadores tradicionalmente usados, su variación porcentual y el valor p. Los biomarcadores lipídicos individuales indicados en la lista tienen separación de inhibición de PCSK9 mejorada en comparación con los marcadores tradicionalmente usados, por ejemplo colesterol-LDL.

R46L humano en comparación con control		
Nombre de la medición	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>		
CE 20:3	-29,391	1,547E-02
CE 20:5	-27,746	1,640E-01
CE 17:1	-27,380	1,629E-02
SM (d18:1/17:0) (d18:1/16:1-OH)	-25,747	1,721E-01

<b>R46L humano en comparación con control</b>		
<b>Nombre de la medición</b>	<b>Variación porcentual</b>	<b>valor p</b>
<b>Disminución</b>		
CE 20:4	-25,511	3,724E-02
CE 16:1	-25,210	1,962E-01
LPC 16:0	-22,167	3,356E-02
LacCer(d18:1/18:0)	-21,812	3,98E-04
CE 18:1	-21,788	4,631E-02
SM (d18:1/23:0) (d18:1/22:1-OH)	-19,747	1,492E-01
SM (d18:1/24:1) (d18:1/23:2-OH)	-19,672	1,301E-01
GlcCer(d18:1/18:0)	-19,105	2,016E-01
Cer(d18:1/18:0)	-19,012	1,895E-01
SM (d18:1/16:1) (d18:1/15:2-OH)	-18,823	4,836E-02
CE 14:0	-18,283	1,695E-01
Cer(d18:1/16:0)	-17,722	1,212E-01
Cer(d18:0/22:0)	-17,713	6,35E-02
CE 18:3	-17,559	2,100E-01
LacCer(d18:1/16:0)	-16,866	6,083E-02
SM (d18:1/18:0)	-16,804	1,568E-01
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	-16,758	8,385E-02
CE 16:0	-15,966	5,712E-02
CE 15:0	-15,068	2,266E-01
GlcCer(d18:1/16:0)	-14,968	1,989E-01
CE 18:0	-14,770	2,346E-01
Cer(d18:1/20:0)	-14,495	5,55E-03
GlcCer(d18:1/24:0)	-13,668	7,13E-02
PC 18:0/20:3	-11,595	6,83E-02
PC 16:0/16:0	-11,403	5,19E-02
<b>Marcadores tradicionales</b>		
colesterol- LDL (clínico)	-10,105	9,77E-02
Colesterol Total (clínico)	-8,417	4,94E-02
Triglicéridos (clínico)	-4,372	5,98E-01
colesterol-HDL (clínico)	-0,330	9,55E-01

**Tabla 3b.** Biomarcadores significativos tomando como base la medición individual de lípidos o las proporciones de concentración lípido-lípido en muestras de ser humano. Se presentan los nombres de las especies, los valores p y las variaciones porcentuales.

5

<b>Proporción lípido-lípido</b>	<b>Variación porcentual</b>	<b>valor p</b>
<b>Disminución</b>		
CE 22:2/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-50,105	5,44E-04
LacCer(d18:1/18:0)/proteína C reactiva supersensible (mg/l)	-49,645	3,60E-04
CE 20:0/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-47,596	5,03E-03
CE 19:1/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-41,469	8,90E-04
LacCer(d18:1/24:1)/proteína C reactiva supersensible (mg/l)	-41,057	1,50E-02
Cer(d18:1/16:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-39,696	1,28E-04
DAG 16:0/18:1/lipoproteína(a) (EDTA) (mg/dl)	-38,988	1,78E-02
CE 15:0/ proteína C reactiva supersensible (mg/l)	-38,142	4,22E-02
CE 20:0/PC 0-18:0/20:4-alquenoilo (PC 0-18:1/20:4-alquilo)	-37,546	2,35E-02
CE 19:2/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-36,841	1,40E-02
LacCer(d18:1/18:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-36,267	1,27E-06
GlcCer(d18:1/18:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-36,247	4,76E-06
CE 20:3/ proteína C reactiva supersensible (mg/l)	-35,784	3,48E-02
CE 18:0/ proteína C reactiva supersensible (mg/l)	-35,292	3,46E-02
GlcCer(d18:1/16:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-35,278	1,97E-05
Cer(d18:1/18:0)/PC 18:0/22:6	-34,301	3,77E-05
Cer(d18:1/18:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-34,006	2,53E-04
LacCer(d18:1/24:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-33,961	1,38E-05
CE 22:2/PC 0-18:0/20:4-alquenoilo (PC 0-18:1/20:4-alquilo)	-33,340	2,11 E-02
CE 16:1/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-32,963	4,56E-04
LacCer(d18:1/16:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-31,627	1,65E-05



CE 22:2/DAG 16:0/18:1	-31,231	1,31E-02
GlcCer(d18:1/24:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-31,159	7,13E-05
Cer(d18:1/18:0)/PC 0-18:0/20:4-alqueno (PC 0-18:1/20:4-alquilo)	-30,696	8,50E-05
LacCer(d18:1/22:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-30,368	6,54E-04
CE 14:0/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-30,267	1,74E-03
CE 18:3/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-30,194	7,31E-05
Cer(d18:1/16:0)/ triglicéridos (EDTA) (mg/dl)	-30,006	9,36E-07
Cer(d18:1/16:0)/ triglicéridos (EDTA) (mg/dl)	-30,006	9,36E-07
Cer(d18:1/18:0)/triglicéridos (EDTA) (mg/dl)	-27,662	1,79E-07
Cer(d18:1/18:0)/D AG 16:0/18:1	-26,271	2E-05
Cer(d18:1/18:0)/apolipoproteína C-III (mg/dl)	-24,685	2,36E-05
CE 20:3/HDL colesterol (EDTA) (mg/dl)	-24,559	3,19E-05
CE 20:3/apolipoproteína A-I (mg/dl)	-24,189	3,2E-05
<b>Aumento</b>		
PC 18:0/22:6/SM (d18:1/24:0) (d18:1/23:1-OH)	33,954	4,87E-02

**Tabla 4a.** Biomarcadores de ratones *PCSK9<sup>-/-</sup>* con pienso regular.

Ratones <i>PCSK9<sup>-/-</sup></i> en comparación con el tipo silvestre con una dieta de pienso regular					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
TAG 60:12	-64,990	2,508E-04	TAG 54:3	106,898	3,787E-02
Glc/GalCer(d18:1/20:0)	-61,304	5,021E-07	TAG 54:4	83,059	3,721E-02
Glc/GalCer(d18:1/18:0)	-60,966	7,032E-14	TAG 52:4	73,643	2,485E-02
Glc/GalCer(d18:1/22:0)	-58,750	2,897E-06	TAG 56:5	71,820	4,739E-02
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-56,593	4,968E-12	TAG 54:5	70,166	1,239E-02
Total Glc/GalCer	-55,866	6,261E-07	TAG 52:5	69,317	4,417E-02
SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	-54,947	2,058E-16	TAG 54:6	52,606	1,530E-02
LacCer(d18:1/16:0)	-54,523	8,517E-10	TAG 54:7	40,748	4,048E-02
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-53,028	6,967E-05			
Total LacCer	-51,984	4,137E-08			
CE 16:1	-51,509	3,221E-05			
Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p	Proporción de concentración lípido-lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/TAG 52:4	-82,312	4,937E-05	TAG 58:10/TAG 60:12	139,279	6,521E-07
			LPC 18:2/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	98,384	7,626E-12
			LPC 18:2/LacCer(d18:1/16:0)	94,112	3,915E-10
			Cer(d18:0/24:0)/FC	89,233	0,000E+00
			Cer(d18:0/22:0)/Cer(d18:1/22:0)	82,249	1,926E-07
			Cer(d18:1/16:0)/Glc/GalCer(d18:1/16:0)	63,539	2,374E-09
			Cer(d18:0/24:0)/PC 16:0/18:2	59,693	0,000E+00

**Tabla 4b.** Biomarcadores de ratones *PCSK9<sup>+/-</sup>* con pienso regular.

Ratones <i>PCSK9<sup>+/-</sup></i> en comparación con el tipo silvestre con una dieta de pienso regular					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Glc/GalCer(d18:1/22:0)	-38,116	1,072E-03	TAG 53:3	98,444	
Glc/GalCer(d18:1/20:0)	-36,166	1,126E-03	TAG 49:2	81,946	
Glc/GalCer Total	-34,200	8,552E-04	TAG 54:3	57,889	
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-34,067	4,625E-03	TAG 54:5	48,831	
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-30,734	1,378E-02	TAG 50:4	46,374	
SM (dl 8:1 /16:0) (d18:1/15:1-OH)	-30,205	1,297E-08	TAG 54:8	45,668	
Glc/GalCer(d18:1/18:0)	-29,219	7,332E-06			
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-27,063	6,051E-05			
LacCer(d18:1/24:0)	-26,786	5,566E-02			
LacCer Total	-24,058	3,203E-03			

Proporción de concentración lipido-lípido	Variación porcentual	valor p	Proporción de concentración lipido-lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/22:0)/PC 16:0/18:2	-12,964	0,000E+00	CE 20:5/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	82,189	7,377E-03
Glc/GalCer(d18:1/18:0)/PC 16:0/20:4	-33,636	1,669E-05	PC 18:2/18:2/SM (d18:1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	63,587	9,679E-06
Glc/GalCer(d18:1/22:0)/LPC 20:4	-51,506	8,433E-04	CE 2 0: 4/S M (d18 : 1/16:0) (d18:1/15:1-OH)	42,452	1,598E-05

**Tabla 4c.** Biomarcadores de ratones *PCSK9*<sup>-/-</sup> con dieta Western

Ratones <i>PCSK9</i> <sup>-/-</sup> en comparación con el tipo silvestre con una dieta Western					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/24:0)	-36,791	2,958E-02	Esfingosina d16:1	64,323	1,533E-03
Cer(d18:1/26:1)	-32,004	2,558E-04	Total SPH	50,856	5,789E-03
Cer(d18:0/22:0)	-28,800	3,316E-02	Esfingosina d18:1	49,840	7,175E-03
Glc/GalCer(d18:1/26:1)	-27,701	4,231E-03	Esfinganina d18:0	41,602	8,815E-03
Glc/GalCer(d18:1/16:0)	-26,867	2,746E-02	SPA Total	41,602	8,815E-03
Cer(d18:1/26:0)	-26,304	7,863E-03	LPC 16:1	27,750	1,120E-01
Cer(d18:1/24:0)	-25,281	1,231E-03	Esfingosina-1-fosfato d18:1	21,375	5,453E-02
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-25,124	1,452E-02	Total SIP	21,375	5,453E-02
CE 16:0	-22,506	1,299E-04	Esfinganina-1-fosfato d18:0	16,834	2,617E-01
Total Glc/GalCer	-22,165	1,058E-01			
CE 18:1	-19,571	3,429E-02			
LacCer(d18:1/22:0)	-19,021	7,362E-02			
Total Cer	-18,476	5,787E-02			
<b>Proporción de concentración lipido-lípido</b>			<b>Proporción de concentración lipido-lípido</b>		
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/24:0)/Cer(d18:1/18:0)	-49,008	8,69E-04	LPC 16:1/TAG 56:5	117,120	4,74E-03
CE 18:1/Esfingosina d16:1	-49,803	1,16E-05	CE 20:3/PC 16:0/16:0	70,816	7,47E-03
PC 16:0/16:0/Esfingosina d16:1	-50,221	9,85E-06	Cer(d18:1/18:0)/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	64,951	7,32E-03
Cer(d18:1/24:0)/Esfingosina d16:1	-51,685	4,14E-06			
Cer(d18:0/24:0)/Esfingosina d16:1	-58,674	4,36E-04			

**5 Tabla 4d.** Biomarcadores de ratones *PCSK9*<sup>+/-</sup> con dieta Western

Ratones <i>PCSK9</i> <sup>+/-</sup> en comparación con el tipo silvestre con dieta Western					
Lípido	Variación porcentual	valor p	Lípido	Variación porcentual	valor p
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/22:0)	-58,820	3,240E-05	Esfingosina d16:1	107,934	4,509E-07
Cer(d18:0/24:0)	-57,003	5,688E-04	Total SPH	75,244	4,162E-05
Glc/GalCer(d18:1/24:0)	-54,076	9,882E-07	Esfingosina d18:1	72,779	7,344E-05
Glc/GalCer(d18:1/26:1)	-51,762	5,315E-07	Esfinganina-1-fosfato d18:0	70,319	1,192E-05
Cer(d18:0/24:1)	-51,729	4,012E-03	Total SA1P	70,319	1,192E-05
Glc/GalCer(d18:1/24:1)	-48,741	6,131E-04	Esfinganina d18:0	62,423	7,539E-05
Cer(d18:1/24:0)	-47,795	2,927E-08	Total SPA	62,423	7,539E-05
Cer(d18:1/26:1)	-47,142	2,122E-07	Esfingosina-1-fosfato d18:1	53,308	6,250E-06
LacCer(d18:1/24:0)	-45,674	2,048E-04	Total SIP	53,308	6,250E-06
Glc/GalCer(d18:1/26:0)	-43,777	3,426E-04			
<b>Proporción de concentración lipido-lípido</b>			<b>Proporción concentración lipido-lípido</b>		
<b>Disminución</b>			<b>Aumento</b>		
Cer(d18:0/24:1)/FC	-56,408	0,000E+00	CE 18:3/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	157,031	4,734E-09
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/Esfingosina d16:1	-78,076	1,085E-10	CE 18:2/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	171,724	5,882E-09
Glc/GalCer(d18:1/24:0)/PC 16:0/20:4	-61,038	2,913E-10	Cer(d18:1/18:0)/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	155,600	1,811 E-08
			CE 20:4/Glc/GalCer(d18:1/24:0)	219,850	4,296E-08

**Tabla 5.** Biomarcadores humanos.

<b>R46L humano en comparación con control</b>		
<b>Lípido</b>	<b>Variación porcentual</b>	<b>valor p</b>
<b>Disminución</b>		
CE 16:1	-23,1181918	1,91E-04
CE 20:3	-22,8724155	3,59E-05
Cer(d18:1/16:0)	-22,1234175	5,98E-04
Cer(d18:1/18:0)	-21,9814365	5,13E-04
LacCer(d18:1/18:0)	-21,8121857	3,98E-04
GlcCer(d18:1/18:0)	-18,6701034	2,55E-03
LacCer(d18:1/16:0)	-17,8457737	1,20E-04
GlcCer(d18:1/16:0)	-17,6341642	2,83E-03
CE 18:1	-17,5455244	2,72E-04
CE 16:0	-14,8193897	5,06E-04
<b>Proporción de concentración lípido-lípido</b>		
<b>Variación porcentual</b>		
<b>valor p</b>		
<b>Disminución</b>		
CE 22:2/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-50,105	5,44E-04
Cer(d18:1/16:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-39,696	1,28E-04
LacCer(d18:1/18:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-36,267	1,27E-06
GlcCer(d18:1/18:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-36,247	4,76E-06
GlcCer(d18:1/16:0)/SM (d18:1/23:1) (d18:1/22:2-OH)	-35,278	1,97E-05
Cer(d18:1/18:0)/PC 18:0/22:6	-34,301	3,77E-05
Cer(d18:1/16:0)/triglicéridos (EDTA) (mg/dl)	-30,006	9,36E-07
Cer(d18:1/18:0)/triglicéridos (EDTA) (mg/dl)	-27,662	1,79E-07
Cer(d18:1/18:0)/D AG 16:0/18:1	-26,271	2,00E-05
Cer(d18:1/18:0)/apolipoproteína C-III (mg/dl)	-24,685	2,36E-05
CE 20:3/colesterol HDL (EDTA) (mg/dl)	-24,559	3,19E-05
CE 20:3/apolipoproteína A-I (mg/dl)	-24,189	3,20E-05

**Tabla 6.** Ejemplos de posibles combinaciones de ácidos grasos por especie de TAG en bruto.

<b>Especies de TAG en bruto</b>	<b>Posibles combinaciones de ácidos grasos (FA)</b>
TAG 49:2 total	TAG 49:2 total (12:0/18:2/19:0)(15:0/16:0/18:2)(15:0/16:1/18:1)
TAG 50:2 total	TAG 50:2 total (12:0/18:0/20:2)(12:0/18:1/20:1)(12:0/18:2/20:0)(14:0/16:0/20:2)(14:0/16:1/20:1)(14:0/18:0/18:2)(14:0/18:1/18:1)(15:0/15:0/20:2)(15:0/17:0/18:2)(16:0/16:0/18:2)(16:0/16:1/18:1)(16:1/16:1/18:0)
TAG 50:3 total	TAG50:3 total (12:0/18:0/20:3)(12:0/18:1/20:2)(12:0/18:2/20:1)(12:0/18:3/20:0)(14:0/16:0/20:3)(14:0/16:1/20:2)(14:0/18:0/18:3)(14:0/18:1/18:2)(16:0/16:0/18:3)(16:0/16:1/18:2)(16:1/16:1/18:1)
TAG 50:4 total	TAG 50:4 total (12:0/18:0/20:4)(12:0/18:1/20:3)(12:0/18:2/20:2)(12:0/18:3/20:1)(14:0/16:0/20:4)(14:0/16:1/20:3)(14:0/16:2/20:2)(14:0/18:1/18:3)(14:0/18:2/18:2)(16:0/16:1/18:3)(16:0/16:2/18:2)(16:1/16:1/18:2)(16:1/16:2/18:1)(16:2/16:2/18:0)
TAG 50:5 total	TAG 50:5 total (14:0/16:1/20:4)(14:0/18:2/18:3)(16:0/16:2/18:3)(16:1/16:1/18:3)(16:1/16:2/18:2)(16:2/16:2/18:1)
TAG 51:4 total	TAG 51:4 total (15:0/18:1/18:3)(15:0/18:2/18:2)(16:1/17:0/18:3)
TAG 52:2 total	TAG 52:2 total (14:0/18:0/20:2)(14:0/18:1/20:1)(15:0/17:0/20:2)(16:0/16:0/20:2)(16:0/16:1/20:1)(16:0/18:0/18:2)(16:0/18:1/18:1)(16:1/18:0/18:1)(17:0/17:0/18:2)
TAG 52:3 total	TAG 52:3 total (14:0/16:1/22:2)(14:0/16:2/22:1)(14:0/18:1/20:2)(14:0/18:2/20:1)(14:0/18:3/20:0)(16:0/16:1/20:2)(16:0/16:2/20:1)(16:0/18:0/18:3)(16:0/18:1/18:2)(16:1/16:1/20:1)(16:1/16:2/20:0)(16:1/18:0/18:2)(16:1/18:1/18:1)(16:2/18:0/18:1)(17:0/17:0/18:3)
TAG 52:4 total	TAG 52:4 total (14:0/16:0/22:4)(14:0/16:1/22:3)(14:0/16:2/22:2)(14:0/18:0/20:4)(14:0/18:1/20:3)(14:0/18:3/20:1)(16:0/16:0/20:4)(16:0/16:1/20:3)(16:0/16:2/20:2)(16:0/18:1/18:3)(16:0/18:2/18:2)(16:1/16:1/20:2)(16:1/16:2/20:1)(16:1/18:0/18:3)(16:1/18:1/18:2)(16:2/16:2/20:0)(16:2/18:0/18:2)
TAG 52:5 total	TAG 52:5 total (14:0/16:0/22:5)(14:0/16:2/22:3)(14:0/18:1/20:4)(14:0/18:2/20:3)(14:0/18:3/20:2)(16:0/16:0/20:5)(16:0/16:1/20:4)(16:0/16:2/20:3)(16:0/18:2/18:3)(16:1/16:1/20:3)(16:1/16:2/20:2)

ES 2 552 371 T3

Especies de TAG en bruto		Posibles combinaciones de ácidos grasos (FA)
		(16:1/18:1/18:3)(16:1/18:2/18:2)(16:2/16:2/20:1)(16:2/18:1/18:2)
TAG total	52:6	TAG 52:6 total (14:0/16:0/22:6)(14:0/18:1/20:5)(14:0/18:2/20:4)(16:0/16:1/20:5)(16:0/16:2/20:4)(16:0/18:3/18:3)(16:1/16:1/20:4)(16:1/18:2/18:3)(16:2/18:1/18:3)(16:2/18:2/18:2)
TAG total	53:3	TAG 53:3 total (15:0/18:2/20:1)(16:1/18:2/19:0)(17:0/18:1/18:2)
TAG total	53:4	TAG 53:4 total (16:1/17:0/20:3)(17:0/18:2/18:2)
TAG total	54:3	TAG 54:3 total (16:0/16:0/22:3)(16:0/18:1/20:2)(16:0/18:2/20:1)(16:1/18:0/20:2)(16:1/18:1/20:1)(16:1/18:2/20:0)(18:0/18:1/18:2)(18:1/18:1/18:1)
TAG total	54:4	TAG 54:4 total (16:0/16:0/22:4)(16:0/16:1/22:3)(16:0/16:2/22:2)(16:0/18:0/20:4)(16:0/18:1/20:3)(16:0/18:2/20:2)(16:0/18:3/20:1)(16:1/16:1/22:2)(16:1/16:2/22:1)(16:1/18:0/20:3)(16:1/18:1/20:2)(16:1/18:2/20:1)(16:1/18:3/20:0)(16:2/16:2/22:0)(16:2/18:0/20:2)(16:2/18:1/20:1)(18:0/18:1/18:3)(18:0/18:2/18:2)
TAG total	54:5	TAG 54:5 total (16:0/16:1/22:4)(16:0/16:2/22:3)(16:0/18:1/20:4)(16:0/18:2/20:3)(16:0/18:3/20:2)(16:1/16:1/22:3)(16:1/16:2/22:2)(16:1/18:0/20:4)(16:1/18:1/20:3)(16:1/18:2/20:2)(16:1/18:3/20:1)(16:2/16:2/22:1)(16:2/18:0/20:3)(16:2/18:1/20:2)(16:2/18:2/20:1)(18:0/18:2/18:3)
TAG total	54:6	TAG 54:6 total (16:0/16:0/22:6)(16:0/16:1/22:5)(16:0/16:2/22:4)(16:0/18:1/20:5)(16:0/18:2/20:4)(16:0/18:3/20:3)(16:1/16:1/22:4)(16:1/16:2/22:3)(16:1/18:0/20:5)(16:1/18:1/20:4)(16:1/18:2/20:3)(16:1/18:3/20:2)(16:2/16:2/22:2)(16:2/18:0/20:4)(16:2/18:1/20:3)
TAG total	54:7	TAG 54:7 total (16:0/16:1/22:6)(16:0/18:2/20:5)(16:0/18:3/20:4)(16:1/16:1/22:5)(16:1/18:1/20:5)(16:1/18:2/20:4)(16:1/18:3/20:3)(18:1/18:3/18:3)(18:2/18:2/18:3)
TAG total	54:8	TAG 54:8 total (16:0/18:3/20:5)(16:1/18:2/20:5)(16:1/18:3/20:4)(18:2/18:3/18:3)
TAG total	55:3	TAG 55:3 total (18:1/18:2/19:0)
TAG total	56:3	TAG 56:3 total (16:0/18:1/22:2)(16:0/18:2/22:1)(16:0/20:1/20:2)(16:1/18:0/22:2)(16:1/18:1/22:1)(16:1/20:0/20:2)(16:1/20:1/20:1)(18:0/18:1/20:2)(18:0/18:2/20:1)(18:1/18:1/20:1)(18:1/18:2/20:0)
TAG total	56:4	TAG 56:4 total (16:0/18:1/22:3)(16:0/18:2/22:2)(16:0/18:3/22:1)(16:0/20:1/20:3)(16:0/20:2/20:2)(16:1/18:1/22:2)(16:1/18:2/22:1)(16:1/20:0/20:3)(16:1/20:1/20:2)(18:0/18:1/20:3)(18:0/18:2/20:2)(18:0/18:3/20:1)(18:1/18:1/20:2)(18:1/18:2/20:1)(18:1/18:3/20:0)(18:2/18:2/20:0)
TAG total	56:5	TAG 56:5 total (16:0/18:0/22:5)(16:0/18:1/22:4)(16:0/18:2/22:3)(16:0/18:3/22:2)(16:0/20:1/20:4)(16:0/20:2/20:3)(18:0/18:1/20:4)(18:0/18:2/20:3)(18:0/18:3/20:2)(18:1/18:1/20:3)(18:1/18:2/20:2)(18:1/18:3/20:1)(18:2/18:2/20:1)(18:2/18:3/20:0)
TAG total	56:6	TAG 56:6 total (16:0/18:0/22:6)(16:0/18:1/22:5)(16:0/18:2/22:4)(16:0/18:3/22:3)(16:0/20:1/20:5)(16:0/20:2/20:4)(16:0/20:3/20:3)(18:0/18:2/20:4)(18:0/18:3/20:3)(18:1/18:1/20:4)(18:1/18:2/20:3)(18:1/18:3/20:2)(18:2/18:2/20:2)(18:2/18:3/20:1)
TAG total	56:7	TAG 56:7 total (16:0/18:1/22:6)(16:0/18:2/22:5)(16:0/18:3/22:4)(16:0/20:2/20:5)(16:0/20:3/20:4)(16:1/18:1/22:5)(16:1/18:2/22:4)(16:1/20:2/20:4)(16:1/20:3/20:3)(18:1/18:1/20:5)(18:1/18:2/20:4)(18:1/18:3/20:3)(18:2/18:2/20:3)(18:2/18:3/20:2)
TAG total	56:8	TAG 56:8 total (16:0/18:2/22:6)(16:0/18:3/22:5)(16:0/20:3/20:5)(16:0/20:4/20:4)(16:1/18:2/22:5)(16:1/20:3/20:4)(18:0/18:3/20:5)(18:2/18:2/20:4)(18:2/18:3/20:3)
TAG total	56:9	TAG 56:9 total (16:0/18:3/22:6)(16:0/20:4/20:5)(16:1/18:2/22:6)(16:1/20:4/20:4)(16:2/18:1/22:6)(18:1/18:3/20:5)(18:2/18:2/20:5)(18:2/18:3/20:4)
TAG total	58:7	TAG 58:7 total (18:0/18:2/22:5)(18:1/18:1/22:5)(18:1/18:2/22:4)(18:2/18:2/22:3)
TAG total	58:8	TAG 58:8 total (16:0/20:4/22:4)(18:0/18:2/22:6)(18:0/20:4/20:4)(18:1/18:1/22:6)(18:1/18:2/22:5)(18:2/18:2/22:4)
TAG total	58:9	TAG 58:9 total (18:1/18:2/22:6)(18:1/20:3/20:5)(18:1/20:4/20:4)(18:2/18:2/22:5)(18:2/20:3/20:4)
TAG total	58:10	TAG 58:10 total (16:0/20:4/22:6)(16:0/20:5/22:5)(18:0/20:5/20:5)(18:1/18:3/22:6)(18:1/20:4/20:5)(18:2/18:2/22:6)(18:2/18:3/22:5)(18:2/20:4/20:4)
TAG total	60:12	TAG 60:12 total (20:4/20:4/20:4)(18:2/20:4/22:6)

En resumen, este estudio proporciona nuevos marcadores lipídicos para determinar la eficacia y la especificidad de inhibidores y silenciadores de PCSK9. Dado que solo la medición del colesterol LDL no es suficiente para proporcionar información sobre posibles reacciones adversas a fármacos, los biomarcadores lipídicos son marcadores más específicos y sensibles para determinar la eficacia de inhibidores y silenciadores de PCSK9.

5

Los expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar, usando tan solo experimentación habitual, numerosos equivalentes a los elementos y realizaciones que se describen en el presente documento, tanto en los ejemplos como en el desarrollo de la descripción de toda la patente. Dichos equivalentes se consideran dentro del ámbito de la presente invención y quedan incluidos en las siguientes reivindicaciones.

10

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, que comprende determinar, en una muestra de dicho sujeto, la concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que una concentración disminuida en dicha muestra, cuando se compara con un control, indica alta eficacia de dicho tratamiento.
2. Un método para predecir en un sujeto la eficacia de un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, que comprende determinar, en una muestra de dicho sujeto, la concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que una concentración aumentada en dicha muestra, cuando se compara con un control, indica que dicho tratamiento será eficaz.
3. Un método para determinar el cumplimiento, por parte de un sujeto, de un tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, que comprende determinar, en una muestra de dicho sujeto, la concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que una concentración disminuida en dicha muestra, cuando se compara con un control, indica buen cumplimiento del tratamiento.
4. Un método para identificar compuestos que son útiles como inhibidores/silenciadores de PCSK9, que comprende determinar en una muestra de un sujeto no humano que se somete a tratamiento con dicho compuesto, la concentración de Cer(d18:1/16:0), en el que una concentración disminuida en dicha muestra, cuando se compara con un control, indica su utilidad como fármaco hipolipemiante.
5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho sujeto con respecto al cual se realiza una comparación es:
  - (a) un paciente que se somete a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 u otro compuesto que se dirige a PCSK9;
  - (b) un animal de ensayo que se somete a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 u otro compuesto que se dirige a PCSK9; o
  - (c) un paciente o un animal de ensayo que no se ha sometido y que no se está sometiendo a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, con otro compuesto que se dirige a PCSK9 o con un fármaco hipolipemiante distinto de inhibidor/silenciador de PCSK9.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho control con el que se realiza una comparación, es una muestra de control del mismo sujeto antes del tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9, respectivamente, o durante la interrupción de dicho tratamiento.
7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho control con el que se realiza la comparación es:
  - (a) un valor de control establecido de uno o más sujetos sanos, no previamente tratados con un inhibidor/silenciador de PCSK9;
  - (b) un valor de control establecido de uno o más sujetos sanos que no están siendo sometidos a tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9;
  - (c) una muestra de control de uno o más sujetos portadores de cualquier mutación de pérdida de función en el gen de PCSK9, tal como R46L (rs11591147); o
  - (d) un valor de control establecido de uno o más sujetos con tratamiento con un inhibidor/silenciador de PCSK9 y sin síntomas o antecedentes de efectos distintos a los deseados inducidos por el fármaco.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que adicionalmente comprende determinar o evaluar el nivel de colesterol LDL en dicho sujeto o en una muestra de dicho sujeto, opcionalmente en el que el sujeto tiene niveles de colesterol LDL reducidos.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que:
  - (a) la muestra es sangre, plasma sanguíneo, suero sanguíneo, o una fracción de los mismos, tal como una fracción de lipoproteína, o una biopsia de tejido; y/o
  - (b) la concentración de lípidos se determina usando espectrometría de masas, espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía de fluorescencia o interferometría de polarización dual, un método de

separación de alta resolución, tal como HPLC o UPLC, un inmunoensayo tal como un ELISA y/o con una porción de unión capaz de unirse específicamente al analito.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el inhibidor/silenciador de PCSK9 se selecciona  
5 de:

(a) uno o más anticuerpos contra PCSK9;

(b) un inhibidor farmacológico de PCSK9;

10

(c) una molécula pequeña que inhibe la interacción del receptor de LDL con PCSK9,

(d) un péptido que imita el dominio de interacción del receptor de LDL con PCSK9;

15 (e) uno o más ARNip específicos para el ARNm de PCSK9; y/o

(f) uno o más oligonucleótidos antisentido específicos para el ARNm de PCSK9.

**Figura 1.**

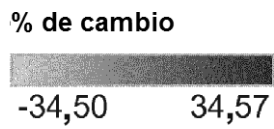
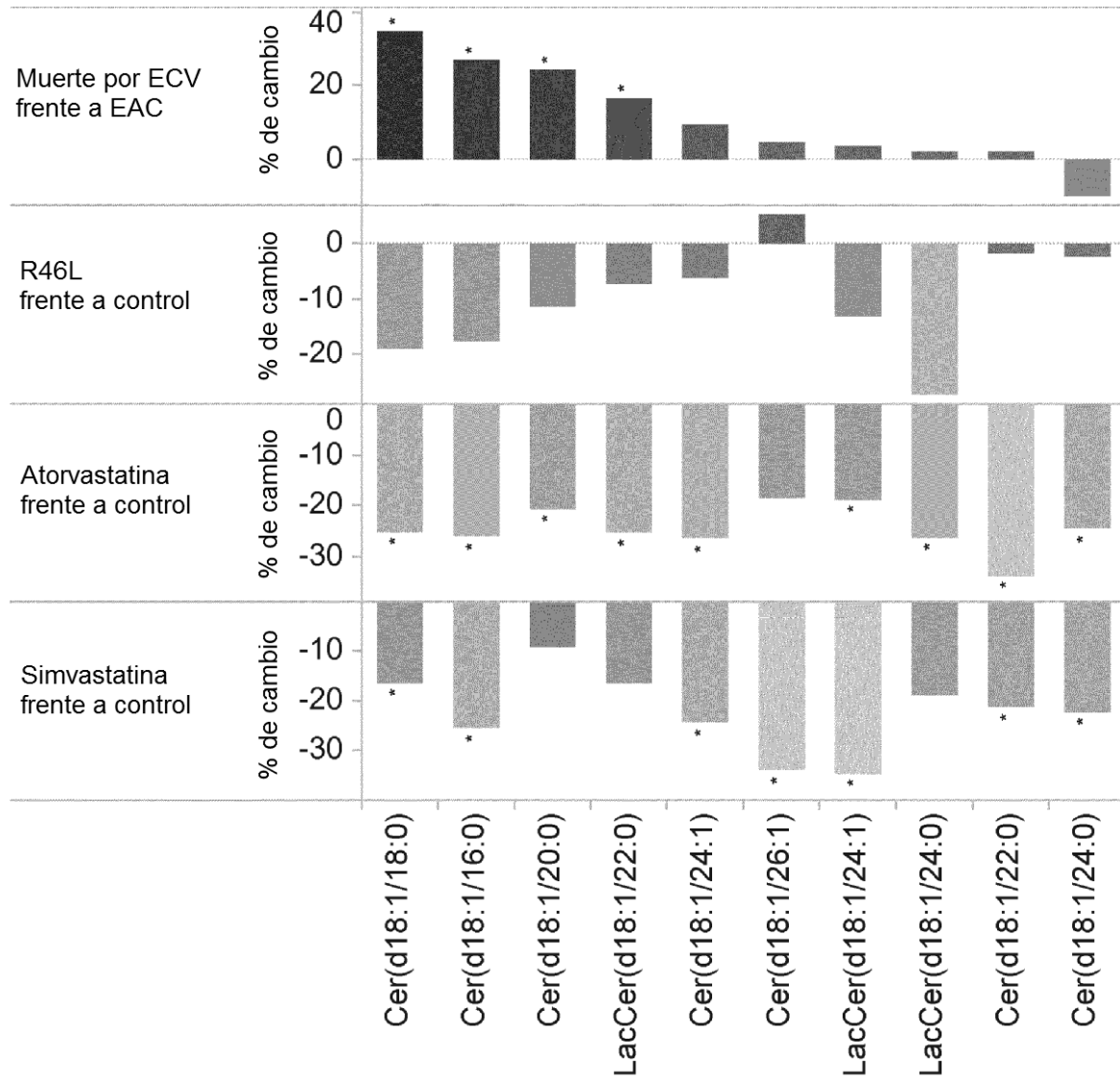




Figura 2.

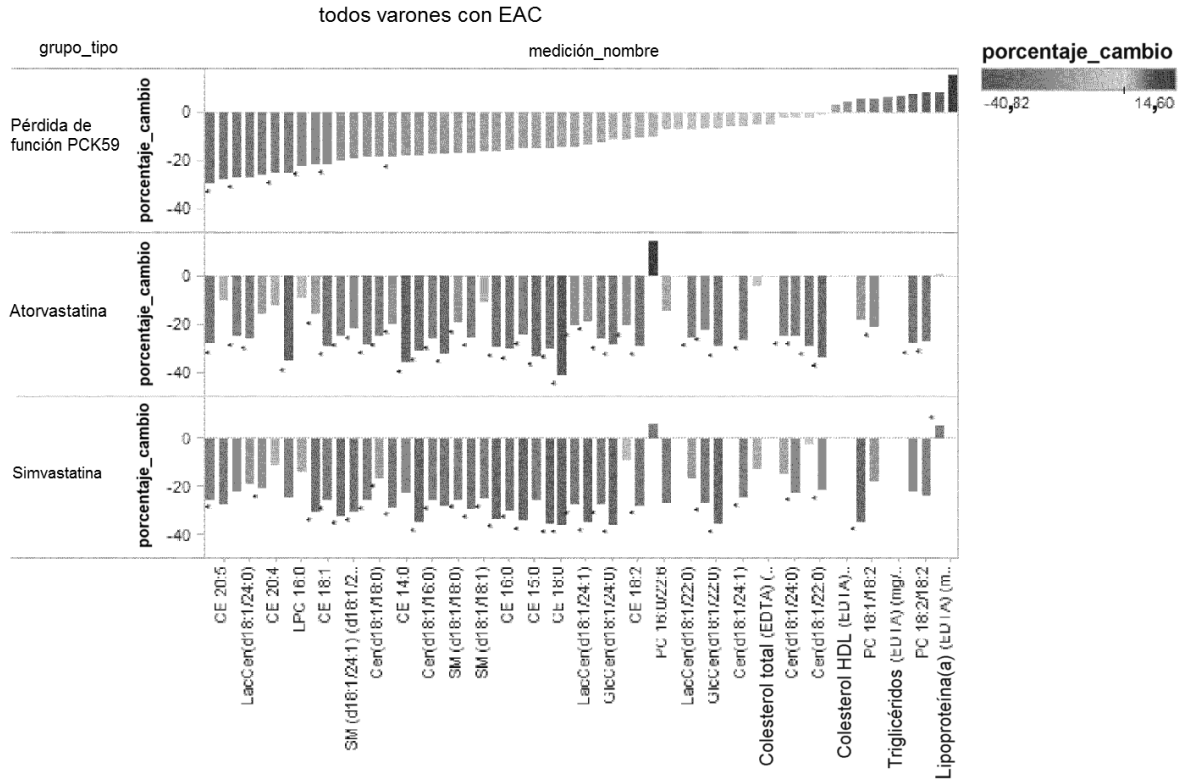
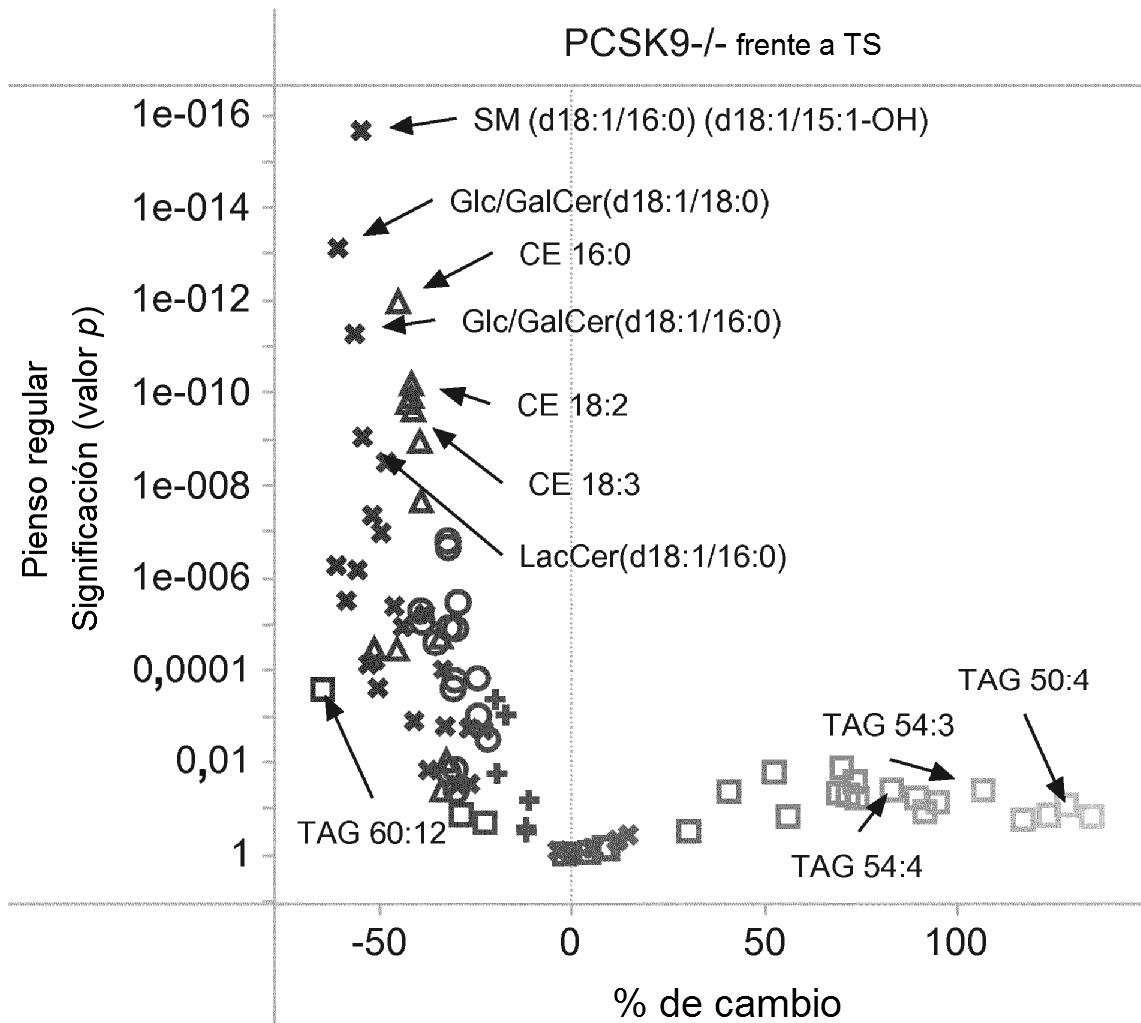


Figura 3A.



Categoría de lípidos

- Glicerolípidos
- Glicerofosfolípidos
- ⊕ Lisoglicerofosfolípidos
- ⊗ Esfingolípidos
- △ Esteroles

% de cambio

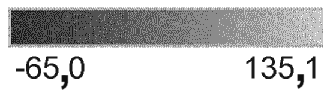
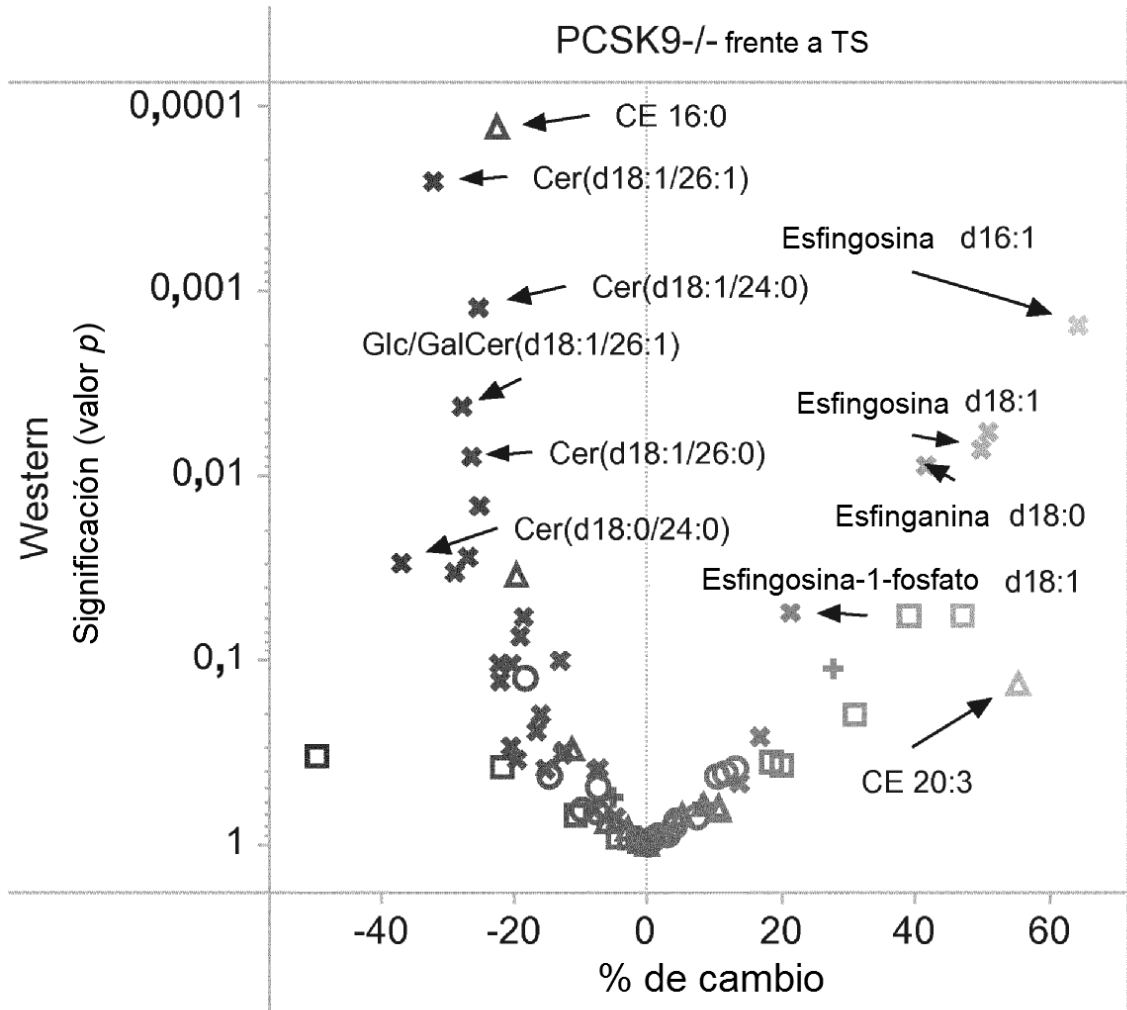


Figura 3B.



Categoría de lípidos

- Glicerolípidos
- Glicerofosfolípidos
- ⊕ Lisoglicerofosfolípidos
- ✱ Esfingolípidos
- △ Esteroles

% de cambio

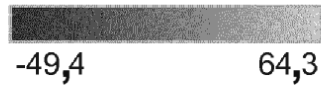
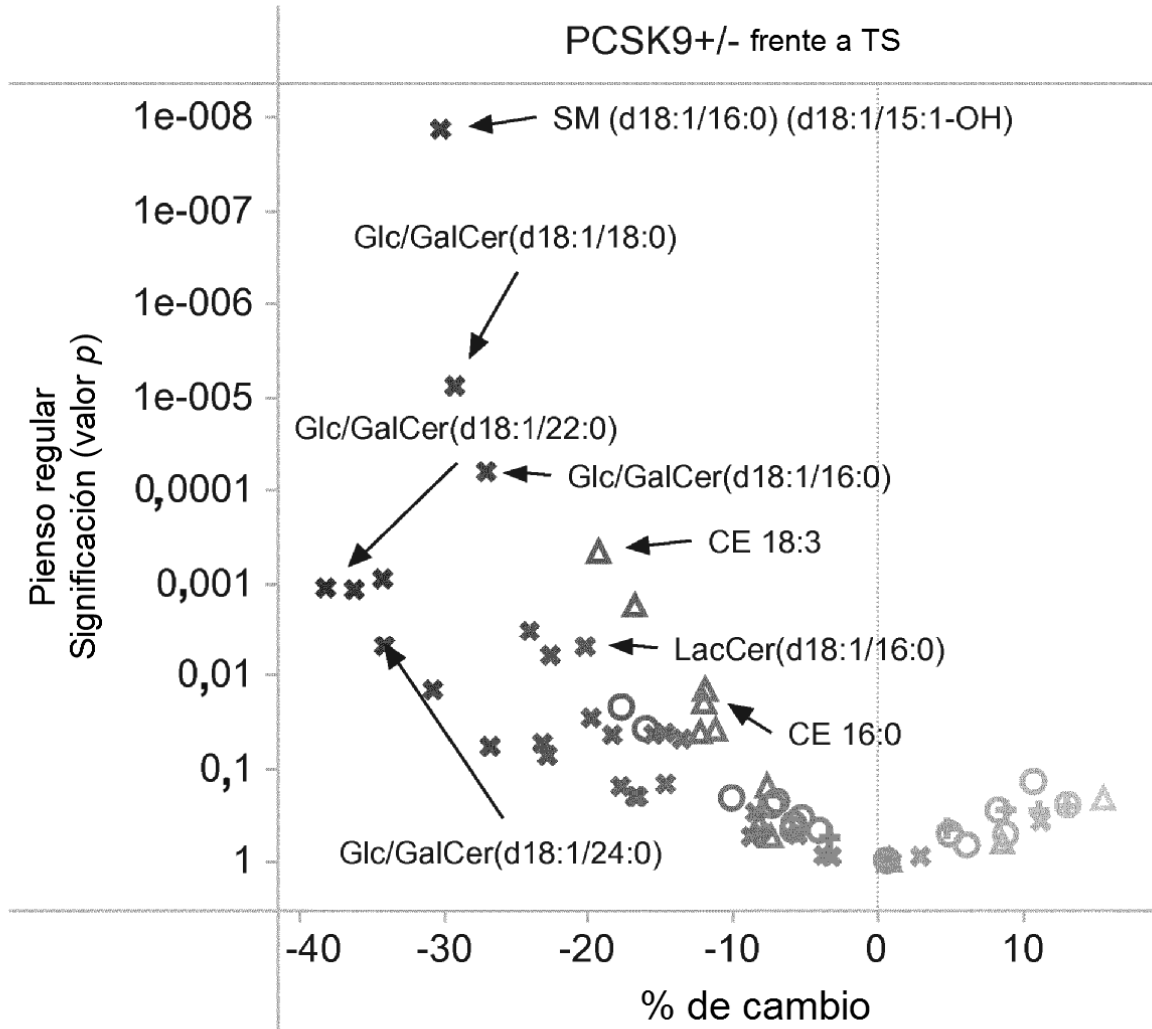


Figura 3C.



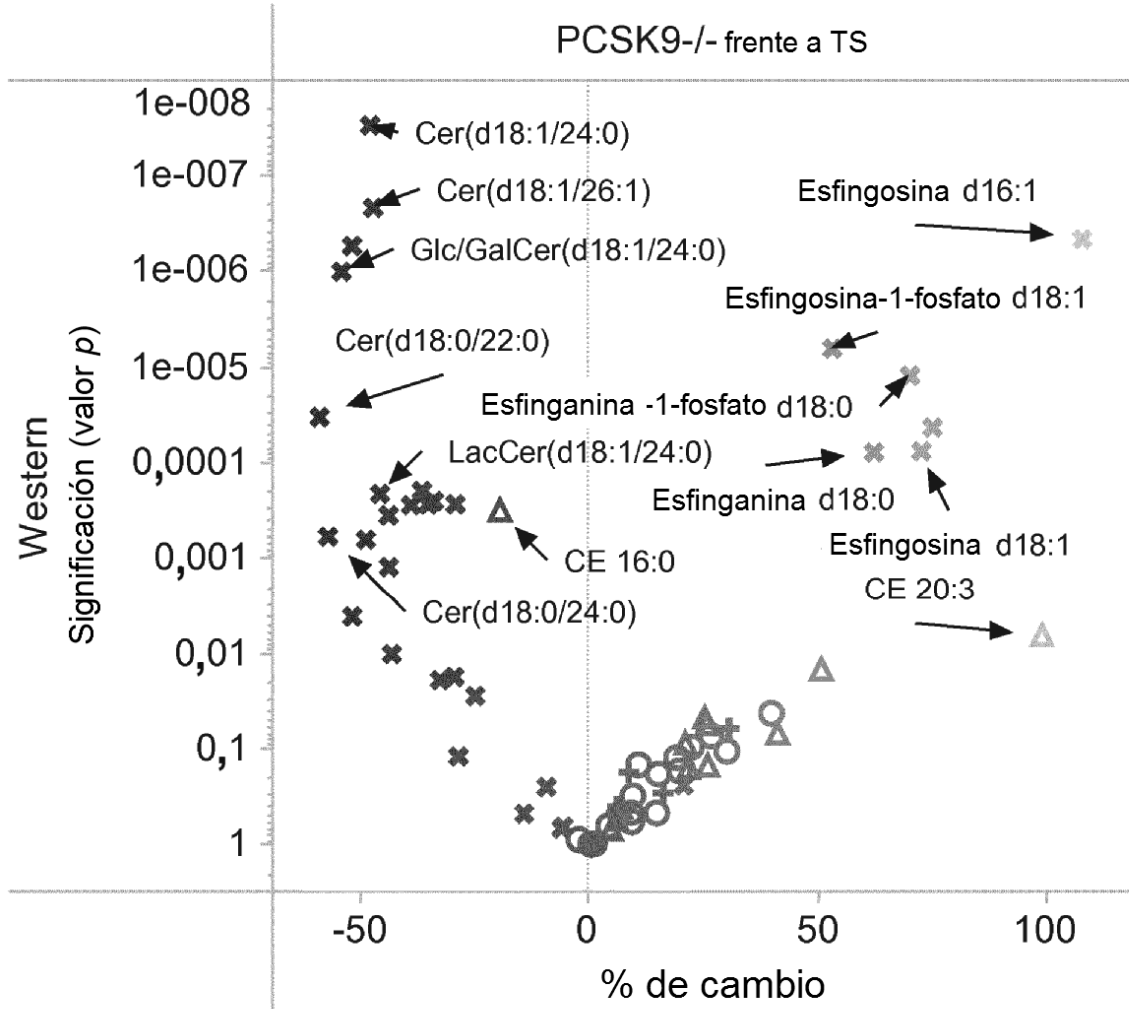
Categoría de lípidos

- Glicerofosfolípidos
- ⊕ Lisoglicerofosfolípidos
- ⊗ Esfingolípidos
- △ Esteroles

% de cambio



Figura 3D.



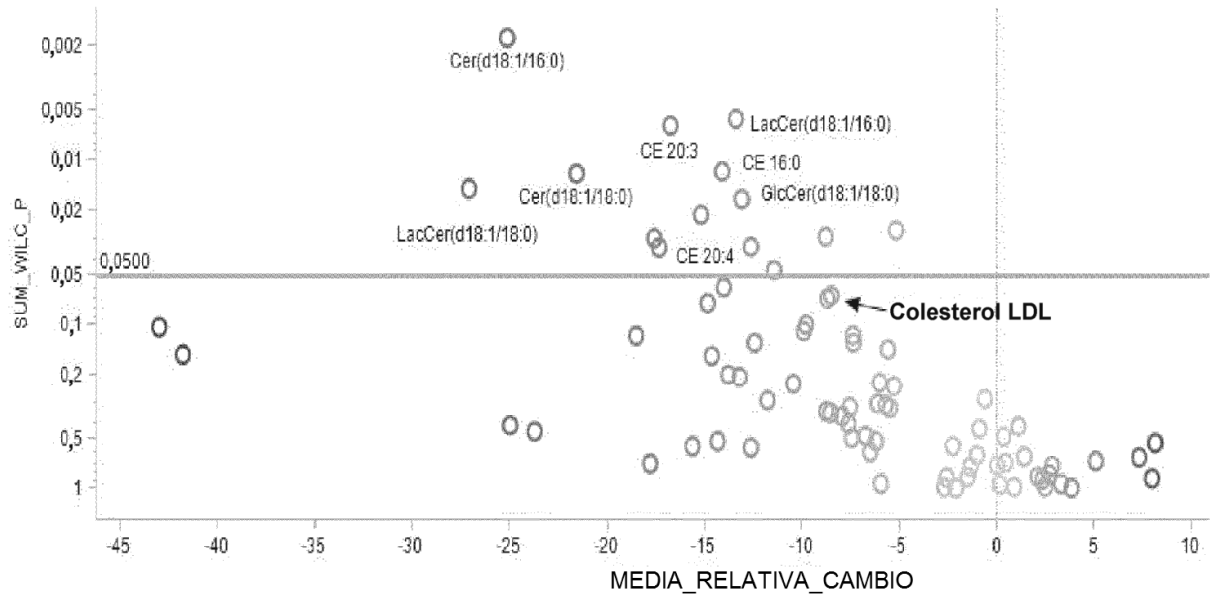
Categoría de lípidos

- Glicerofosfolípidos
- ⊕ Lisoglicerofosfolípidos
- ✱ Esfingolípidos
- △ Esteroles

% de cambio



Figura 4.



## REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

## Documentos de patentes citados en la descripción

- |    |   |  |
|----|---|--|
| 10 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WO 2007127192 A2 [0003]</li> <li>• EP 2385374 A1 [0004]</li> <li>• WO 2011161062 A2 [0004]</li> <li>• WO 2011067243 A1 [0005]</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WO 2008063382 A [0105]</li> <li>• WO 2009100297 A [0105]</li> <li>• WO 2008125623 A [0105]</li> <li>• WO 2009026558 A [0105]</li> </ul> |
| 15 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• WO 2009055783 A [0105]</li> </ul>  |  |

## Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- |    |  |  |
|----|--|--|
| 20 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>KADDURAH-DAOUK R et al.</b> <i>Metabolomics</i>, 2010, vol. 6, 191-201 [0003]</li> <li>• <b>ABIFADEL, M. et al.</b> Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. <i>Nat Genet</i>, 2003, vol. 34, 154-156 [0006] [0114]</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>CARESKEY, H. E. et al.</b> Atorvastatin increases human serum levels of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9. <i>J Lipid Res</i>, 2008, vol. 49, 394-398 [0008]</li> </ul>  |
| 25 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SEIDAH, N. G. et al.</b> The secretory proprotein convertase neural apoptosis-regulated convertase 1 (NARC-1): liver regeneration and neuronal differentiation. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>, 2003, vol. 100, 928-933 [0006]</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>KONRAD, R. J. et al.</b> Effects of currently prescribed LDL-C-lowering drugs on PCSK9 and implications for the next generation of LDL-C-lowering agents. <i>Lipids Health Dis</i>, 2011, vol. 10, 38 [0008]</li> </ul>  |
| 30 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HORTON, J. D. et al.</b> PCSK9: a convertase that coordinates LDL catabolism. <i>J Lipid Res</i>, 2009, vol. 50, 172-177 [0006]</li> <li>• <b>COHEN, J. et al.</b> Low LDL cholesterol in individuals of African descent resulting from frequent nonsense mutations in PCSK9. <i>Nat Genet</i>, 2005, vol. 37, 161-165 [0006]</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>STEINBERG D et al.</b> <i>PNAS</i>, 2009, vol. 106 (24), 9546-9547 [0010]</li> <li>• <b>FOLCH J et al.</b> A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. <i>J Biol Chem</i>, 1957, vol. 226 (1), 497-509 [0080]</li> </ul> |
| 35 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HERBERT, B. et al.</b> Increased secretion of lipoproteins in transgenic mice expressing human D374Y PCSK9 under physiological genetic control. <i>Arterioscler Thromb Vasc Biol</i>, 2010, vol. 30, 1333-1339 [0006]</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>HUSE WD et al.</b> <i>Science</i>, 1989, vol. 246, 1275-81 [0106]</li> <li>• <b>STEWART ; FULLER.</b> <i>J. Immunol. Methods</i>, 1989, vol. 123, 45-53 [0108]</li> </ul>  |
| 40 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>ZAID, A. et al.</b> Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9): hepatocyte-specific low-density lipoprotein receptor degradation and critical role in mouse liver regeneration. <i>Hepatology</i>, 2008, vol. 48, 646-654 [0007]</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>LIEBISCH, G. et al.</b> High throughput quantification of cholesterol and cholesteryl ester by electrospray ionization tandem mass spectrometry. (ESI-MS/MS). <i>Biochim Biophys Acta</i>, 2006, vol. 1761 (1), 121-8 [0120]</li> </ul>                              |
| 45 | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>RASHID, S. et al.</b> Decreased plasma cholesterol and hypersensitivity to statins in mice lacking Pcsk9. <i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>, 2005, vol. 102, 5374-5379 [0007]</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>SULLARDS MC et al.</b> Structure-specific, quantitative methods for analysis of sphingolipids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: "inside-out" sphingolipidomics. <i>Methods Enzymol</i>, 2007 [0123]</li> </ul>                                      |
| 50 |  |  |