

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 759**

51 Int. Cl.:

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/92 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09737386 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2350662**

54 Título: **Combinación de actividad de sPLA2 y factores de riesgo cardiovascular OxPL/apoB para diagnóstico/pronóstico de una enfermedad/evento cardiovascular**

30 Prioridad:

03.10.2008 US 102485 P
27.10.2008 WO PCT/IB2008/055368

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

20.01.2016

73 Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (33.3%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR;
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (33.3%) y
UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT - PARIS 7 (33.3%)

72 Inventor/es:

MALLAT, ZIAD;
TEDGUI, ALAIN;
TSIMIKAS, SOTIRIOS y
WITZTUM, JOSEPH

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 556 759 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

Combinación de actividad de sPLA2 y factores de riesgo cardiovascular OxPL/apoB para diagnóstico/pronóstico de una enfermedad/evento cardiovascular.

5 Campo de la invención

La invención se relaciona con el uso de una combinación de la actividad Spal2 y los factores de riesgo cardiovascular OxPL/apoB para el diagnóstico/pronóstico de una enfermedad/evento cardiovascular o para la vigilancia de una enfermedad.

10

Antecedentes de la invención

Un problema clave para tratar las enfermedades vasculares es el diagnóstico adecuado. A menudo el primer signo de enfermedad es la muerte súbita. Por ejemplo, aproximadamente la mitad de todos los individuos que mueren de enfermedad de la arteria coronaria mueren súbitamente, adicionalmente, para el 40 – 60% de los pacientes a quienes eventualmente se les diagnostica tener enfermedad de la arteria coronaria, el infarto del miocardio es la primera presentación de la enfermedad. Desafortunadamente, aproximadamente el 40% de aquellos eventos iniciales no son notados por el paciente. En razón de nuestra capacidad limitada de suministrar un diagnóstico temprano y preciso seguido por un tratamiento agresivo, las enfermedades cardiovasculares (CD) permanecen como la causa primaria de la morbilidad y mortalidad a nivel mundial. Los pacientes con CD representan un grupo heterogéneo de individuos, con una enfermedad que progresa a diferentes velocidades y en patrones totalmente diferentes. A pesar de los tratamientos apropiados basados en la evidencia para los pacientes con CD, las tasas de recurrencia y mortalidad permanecen altas. También, los beneficios completos de la prevención primaria no efectuada debido a nuestra incapacidad a identificar de manera precisa aquellos pacientes que se beneficiarían de la reducción agresiva del riesgo.

15

20

25

Mientras ciertos marcadores de enfermedad han mostrado que predicen el resultado o la respuesta a la terapia a nivel de población, ellos no son suficientemente sensibles o específicos para suministrar una utilidad clínica adecuada en un paciente individual. Como resultado, la primera presentación clínica para más de la mitad de los pacientes con enfermedad de arteria coronaria es el infarto del miocardio o la muerte.

30

El examen físico y las herramientas de diagnóstico actuales no pueden determinar de manera precisa el riesgo de un individuo a sufrir de una complicación de CD. Los factores de riesgo conocidos tales como la hipertensión, la hiperlipidemia, diabetes, historia familiar, y el fumar no establecen el diagnóstico de la enfermedad de aterosclerosis. Las modalidades de diagnóstico que se fundamentan en los datos anatómicos (tales como la angiografía coronaria, la calificación del calcio coronario, la angiografía CT o MRI) les falta información sobre la actividad biológica del proceso de la enfermedad y pueden ser pobres predictores de los eventos cardíacos futuros. La evaluación funcional de la función endotelial puede ser no específica y no relacionada con la presencia del proceso de enfermedad aterosclerótico, aunque algunos datos han demostrado el valor del pronóstico de estas mediciones.

35

40

Los biomarcadores individuales, tales como los marcadores de lípido e inflamatorios, han mostrado predecir el resultado y la respuesta a la terapia en pacientes con CD y algunos se utilizan como factores de riesgo importantes para desarrollar la enfermedad aterosclerótica.

45

Sin embargo, hasta este punto, ningún biomarcador único es suficientemente específico para suministrar utilidad clínica adecuada para el diagnóstico del CD en un paciente individual. Por lo tanto, subsiste la necesidad de identificar biomarcadores o factores de riesgo cardiovascular o combinaciones de los mismos que suministren un diagnóstico/pronóstico más preciso de las CD.

50

Resumen de la invención

Un objeto de la invención es un método para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular, que comprende:

55

-medir, en una muestra obtenida de dicho sujeto, al menos dos factores de riesgo cardiovascular:

a) la actividad de sPLA2 y

60

b) los fosfolípidos oxidados sobre las partículas de apolipoproteína B-100 (OxPL/apoB),

-combinar dichas mediciones, el valor combinado de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB es indicativo del riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular.

65

En una realización de la invención, dicho valor combinado de la actividad sPLA2 y OxPL/apoB se compara con un valor de referencia.

5 En otra realización de la invención, dicho método comprende además medir al menos un factor de riesgo cardiovascular seleccionado del grupo de Clasificación de Riesgo de Framingham (FRS), CRP, IgM IC de apoB100 o IgM MDA-LDL, Lp-PLA2 y la masa sPLA2.

10 En una realización de la invención, dicho método es para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular, dicha enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular es el Síndrome Metabólico, el Síndrome X, aterosclerosis, aterotrombosis, enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho estable e inestable, accidente cerebrovascular, enfermedades de la aorta y sus ramificaciones (tal como la estenosis aórtica, la trombosis o el aneurisma aórtico), la enfermedad arterial periférica, la enfermedad vascular periférica, la enfermedad cerebrovascular, y cualquier evento cardiovascular isquémico agudo.

15 Otro objeto de la invención es un método tal como se describió aquí anteriormente, para vigilar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad cardiovascular.

20 Otro objeto de la invención es el uso de un equipo para identificar si un sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular, que comprende:

-medios para medir la actividad de sPLA2 y

25 -medios para medir OxPL/apoB

En una realización, dicho equipo comprende además medios para medir al menos un factor de riesgo cardiovascular seleccionado del grupo de Clasificación de Riesgo Framingham (FRS), CRP, IgM IC de la apoB100 o IgM MDA-LDL, Lp-PLA2 y masa sPLA2.

30 Descripción detallada de la invención

Definiciones

35 “Enfermedad cardiovascular” o “enfermedad arteriovascular” como se define aquí es un término general utilizado para clasificar numerosas condiciones que afectan el corazón, las válvulas del corazón, la sangre, y el sistema vascular del cuerpo y comprende cualquier enfermedad que afecte el corazón o los vasos sanguíneos, incluyendo, pero no estando limitado a, el Síndrome Metabólico, el Síndrome X, la aterosclerosis aterotrombosis, enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho estable e inestable, accidentes cerebrovasculares, enfermedades de la aorta y sus ramificaciones (tales como la estenosis aórtica, trombosis o aneurisma aórtico), enfermedad de la arteria periférica, enfermedad vascular periférica, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, e incluyendo, sin limitación, cualquier evento cardiovascular isquémico agudo. La enfermedad arteriovascular como se utiliza aquí pretende más comúnmente referirse a la enfermedad isquémica o proisquémica, en lugar de en general a una enfermedad no isquémica.

45 “Evento cardiovascular” se utiliza de manera intercambiable aquí con el término “evento cardíaco”, “evento arteriovascular agudo” o “evento arteriovascular” se refiere a muerte cardíaca súbita, síndromes coronarios agudos tales como, pero no limitados a, ruptura de placa, infarto del miocardio, angina inestable, así como también eventos arteriovasculares agudos no cardíacos tales como coágulos de la sangre de la pierna, aneurismas, accidentes cerebrovasculares y otros eventos isquémicos arteriovasculares donde se interrumpe el flujo sanguíneo arteriovascular y la oxigenación.

50 Como se utiliza aquí, “ateroesclerosis”, y “aterotrombosis” se refiere a una enfermedad inflamatoria arteriovascular compleja que se desarrolla en respuesta a múltiples estímulos y a factores de riesgo cardiovascular, y está asociada con inflamación sistémica. Las células involucradas en el proceso aterosclerótico incluyen células vasculares (endotelial y del músculo liso), monocitos/macrófagos, linfocitos (T, B, NKT), células dendríticas, células mástil y plaquetas. Ellas secretan o son estimuladas por factores solubles que incluyen péptidos, glicoproteínas, proteasas y un conjunto de citosinas. Ellas están involucradas en la perpetuación de la respuesta inflamatoria, la progresión y desestabilización de aterosclerosis, que incluye la erosión de placa, la ruptura y trombosis. El endurecimiento y el estrechamiento de las arterias debido a la generación de un material denominado “placa” en sus paredes interiores.

60 En la medida en que las placas se desarrollan e incrementan su tamaño, la parte interior de las arterias se vuelve más estrecha (“estenosis”) y menos sangre puede fluir a través de ellas. La estenosis o la ruptura de la placa pueden originar la oclusión parcial o completa del sistema vascular afectado. Los tejidos suministrados por el sistema vascular son así privados de su fuente de oxígeno (isquemia) y puede ocurrir muerte celular (apoptosis/necrosis).

65

"CAD" o "enfermedad de la arteria coronaria" es una enfermedad arteriovascular que ocurre cuando las arterias que suministran sangre al músculo cardíaco (las arterias coronarias) se vuelven ateroscleróticas, calcificadas y/o se estrechan. Eventualmente, el flujo sanguíneo del músculo cardíaco se reduce, y, ya que la sangre lleva mucho del oxígeno necesario, el músculo cardíaco no puede recibir la cantidad de oxígeno que necesita, y a menudo sufre necrosis. El CAD se debe a la aterosclerosis o aterotrombosis en los vasos sanguíneos que le suministran al corazón sangre rica en oxígeno y conduce a síndromes coronarios agudos (ACS), infarto del miocardio (ataque cardíaco), y angina (estable e inestable). Un estimado de 13 millones de americanos son habitualmente diagnosticados con CAD, aproximadamente 7 millones son sobrevivientes de eventos agudos pasados. Más de 1 millón de nuevos eventos CAD agudos ocurren cada año, muchos dando como resultado la muerte. El riesgo durante la vida del CAD después de los 40 es 49 por ciento para los hombres y 32 por ciento para las mujeres. Los sujetos que son considerados clínicamente en riesgo o no riesgo de desarrollar enfermedad arteriovascular tal como la CAD a menudo no exhiben ninguno o muy poco de los factores de riesgo tradicionales para la enfermedad arteriovascular, pero sin embargo aún pueden tener riesgo de un evento arteriovascular agudo. Aproximadamente el 20% de los eventos CAD agudos ocurren en sujetos con ninguno de los factores de riesgo tradicionales, y la mayoría de los CAD agudos ocurren en sujetos que no han sido previamente diagnosticados con CAD. A menudo estos sujetos no exhiben los síntomas de un evento CAD agudo, es decir, dificultad para respirar y/o dolor en el pecho, hasta la ocurrencia real de tal evento agudo. Subsiste un bache de detección sustancial para aquellos que están en riesgo de un evento CAD agudo y que aún son asintomáticos, sin los factores de riesgo tradicionales, o que son considerados clínicamente como de bajo riesgo o que no han sido diagnosticados aún con CAD.

"CVD" o "enfermedad cerebrovascular" es una enfermedad arteriovascular en los vasos sanguíneos que alimentan la sangre rica en oxígeno a la cara y cerebro, tal como aterosclerosis y aterotrombosis. Este término es a menudo utilizado para describir el "endurecimiento" de las arterias carótidas, que le suministran sangre al cerebro. Es una enfermedad con morbilidad asociada común con el CAD y/o PAD. También se denomina como una enfermedad isquémica, o una enfermedad que origina la falta de flujo sanguíneo. El CVD comprende estados de enfermedad tales como "isquemia cerebrovascular", "infarto cerebral agudo", "accidente cerebrovascular", "accidente cerebrovascular isquémico", "accidente cerebrovascular hemorrágico", "aneurisma", "daño cognitivo medio" (MCI) y "ataques isquémicos transitorios" (TIA). El CVD isquémico se cree que está cercanamente relacionado con el CAD y PAD; el CVD no isquémico puede tener múltiples patofisiologías. Se estima que 5 millones de americanos son sobrevivientes de eventos CVD agudos diagnosticados en el pasado, con un estimado de 700 mil eventos CVD agudos que ocurren cada año. Tal como se describió aquí los sujetos que se consideran de bajo riesgo o sin ningún riesgo de CVD con base en las evaluaciones clínicas de los factores de riesgo de enfermedad arteriovascular tradicionales, o sin síntomas, tales como los TIA, MCI o dolor de cabeza severo, pueden aún estar en riesgo de un evento CVD agudo.

"PAD o "enfermedad arterial periférica" comprende estados de enfermedad tales como la aterosclerosis o aterotrombosis que ocurren por fuera del corazón y el cerebro. Esta es una enfermedad con morbilidad asociada común con el CAD. Los sujetos que son considerados de bajo riesgo o sin ningún riesgo de PAD con base en la evaluación de los factores de riesgo tradicionales del PAD (o a la enfermedad arteriovascular), o que son asintomáticos para el PAD o una enfermedad arteriovascular pueden sin embargo estar en riesgo de un evento arteriovascular, aún en la ausencia de claudicación. La claudicación se puede definir como el dolor o la incomodidad en los músculos de las piernas que ocurre debido a la cantidad disminuida de sangre que fluye a un músculo desde el estrechamiento de las arterias periféricas, que producen isquemia y a menudo oclusión arterial, causando la necrosis de los músculos y miembros del esqueleto. El dolor o la incomodidad ocurren a menudo cuando se camina y se disipa bajo condiciones de descanso (claudicación intermitente). El dolor, la opresión, calambres, cansancio o debilidad se experimenta a menudo como resultado de la claudicación. El PAD no solo origina las alteraciones hemodinámicas comunes en el CAD, sino que también dan como resultado cambios metabólicos en los músculos del esqueleto. Cuando el PAD ha progresado a oclusión arterial crónica severa y periférica aguda, la cirugía y la amputación del miembro a menudo se convierte en la única opción terapéutica. El PAD es considerado ampliamente como una enfermedad infradiagnosticada, con la mayoría de los diagnósticos confirmados ocurriendo solo después de que se manifiestan los síntomas, o solo con otra enfermedad arteriovascular, y con daño arteriovascular irreversible debido a que ya han ocurrido tales eventos isquémicos.

"Factor de riesgo cardiovascular" comprende uno o más biomarcadores cuyo nivel cambia en los sujetos que tienen una enfermedad cardiovascular o que están predispuestos a desarrollar una enfermedad cardiovascular, o en riesgo de un evento cardiovascular.

"Riesgo" en el contexto de la presente invención se relaciona con la probabilidad de que ocurra un evento en un periodo de tiempo específico, como en la conversión a eventos arteriovasculares, y pueden significar un riesgo "absoluto" del sujeto o un riesgo "relativo". El riesgo absoluto se puede medir con referencia a la posmedición de la observación real para los grupos de edad relevantes o, con referencia a los valores del índice desarrollados de los grupos de edad históricos estadísticamente válidos que han sido seguidos durante un periodo de tiempo relevante. El riesgo relativo se refiere a la relación de los riesgos absolutos de un sujeto comparado con los riesgos absolutos de los grupos de edad de bajo riesgo o con un riesgo promedio de la población, que puede variar por cómo se evalúan los factores de riesgo clínicos. Las posibilidades relativas, la relación de los eventos positivos a los eventos

negativos para un resultado de prueba dado, son también utilizados comúnmente (las posibilidades están de acuerdo con la fórmula $p/(1-p)$ donde p es la probabilidad del evento y $(1-p)$ es la probabilidad de que no ocurra el evento) o no conversión.

5 “Evaluación del riesgo”, o “evaluación de riesgo” en el contexto de la presente invención comprende hacer una predicción de la probabilidad, posibilidades o probabilidad de que un evento o enfermedad pueda ocurrir, la tasa de
 10 ocurrencia del evento o la conversión de un estado de enfermedad a otro, es decir, de una condición normal a una condición arteriovascular o a un estado en riesgo de desarrollar un evento arteriovascular, o de un riesgo de un evento arteriovascular a una condición arteriovascular más estable. La evaluación del riesgo también comprende la
 15 predicción de futuros parámetros clínicos, valores tradicionales de factor de riesgo de laboratorio, u otros índices de enfermedad arteriovascular, tales como la calificación de calcio coronario, otras calificaciones de imágenes o cintas sin fin, resultados de pruebas pasivas o provocadoras, estenosis porcentual arteriovascular u oclusión y otras mediciones de la carga y actividad de placa, en términos absolutos o relativos en referencia a una población previamente medida. Los métodos de la presente invención se pueden utilizar para hacer mediciones continuas o
 20 categóricas del riesgo de conversión a la enfermedad y eventos arteriovasculares, diagnosticando y definiendo así el espectro del riesgo de una categoría de sujetos definida por estar en riesgo para un evento arteriovascular. En el escenario categórico, la invención se puede utilizar para discriminar entre grupos de edad normales y otros sujetos con mayor riesgo de eventos arteriovasculares. La presente invención se puede utilizar con el fin de discriminar aquellos con riesgo de desarrollar un evento arteriovascular de aquellos que tienen enfermedad arteriovascular, o aquellos que tienen enfermedad arteriovascular de los normales.

Una “muestra” en el contexto de la presente invención es una muestra biológica aislada de un sujeto y puede incluir, por vía de ejemplo y no de limitación, fluidos del cuerpo y/o extractos de tejido tales como tejido homogenizado o solubilizado obtenido de un sujeto. Los extractos de tejido son obtenidos de manera rutinaria de biopsias de tejido y
 25 de material de autopsias. Los fluidos del cuerpo útiles en la presente invención incluyen la sangre, orina, saliva y otras secreciones del cuerpo o derivados de las mismas. Como se utiliza aquí “sangre” incluye sangre completa, plasma, suero, células circulantes, constituyentes, o cualquier derivado de la sangre.

“Parámetros o indicios clínicos” comprende todos los biomarcadores no muestra y no analito de un estado de salud del sujeto u otras características, tales como, sin limitación, edad (Edad) etnicidad (RAZA), género (Sexo), presión arterial diastólica (DBP) y presión arterial sistólica (SBP), historia familiar (FamHX), altura (HT), peso (WT), cintura (Cintura), y circunferencia de la cadera (Cadera), índice de masa corporal (BMI), así como también otros tales como la Diabetes Mellitus tipo 1 o tipo II o la Diabetes Mellitus Gestacional (DM o GDM, llamada conectivamente aquí como diabetes), y la frecuencia cardíaca en descanso.
 35

Un “sujeto” en el contexto de la presente invención es preferiblemente un mamífero. El mamífero puede ser un humano, un primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo, o vaca, pero no está limitado a estos ejemplos. Los mamíferos diferentes de los humanos pueden ser utilizados de manera ventajosa como sujetos que representan modelos animales de enfermedad arteriovascular o de eventos arteriovasculares. Un sujeto puede ser macho o
 40 hembra. Un sujeto puede ser quien ha sido previamente diagnosticado o que se le ha identificado por tener una enfermedad arteriovascular o un evento arteriovascular, y opcionalmente ya ha sufrido, o está sufriendo, una intervención terapéutica para la enfermedad arteriovascular o el evento arteriovascular. De manera alternativa, un sujeto también puede ser aquel que no ha sido previamente diagnosticado por tener enfermedad arteriovascular. Por ejemplo, un sujeto puede ser aquel que exhiba uno o más factores de riesgo para la enfermedad arteriovascular, o un sujeto que no exhiba factores de riesgo arteriovasculares, o un sujeto que sea asintomático para la enfermedad arteriovascular o eventos arteriovasculares. Un sujeto también puede ser aquel que sufra de un riesgo de desarrollar enfermedad arteriovascular o un evento arteriovascular.
 45

Unas “fórmula”, “algoritmo” o “modelo” es una ecuación matemática, algorítmica, un proceso analítico o programado o una técnica estadística que toma una o más entradas categóricas (denominadas aquí “parámetros”) y calcula un valor de salida, algunas veces denominado como “índice” o “valor de índice”. Ejemplos no limitantes de las “fórmulas” incluyen sumas, relaciones, y operadores de regresión, tales como coeficientes o exponentes, transformaciones y normalizaciones del valor del biomarcador (incluyendo, sin limitación, a aquellos esquemas de normalización basados en parámetros químicos, tales como el género, la edad, o la etnicidad), las reglas y las guías,
 50 los modelos de clasificación estadística, y las redes neurales entrenadas en poblaciones históricas. De uso particular para combinar el factor de riesgo cardiovascular y otros biomarcadores son las ecuaciones lineales y no lineales y los análisis de clasificación estadísticos para determinar las relaciones de los niveles del Factor de Riesgo Cardiovascular detectado en una muestra de un sujeto y el riesgo del sujeto de la enfermedad cardiovascular. En el panel y la construcción de la combinación, de interés particular son los algoritmos de clasificación estadística sinápticos, y los métodos de construcción de índice de riesgo, las características de reconocimiento del patrón de utilización, que incluyen técnicas preestablecidas tales como correlación cruzada, análisis de componentes principales (PCA), rotación del factor, regresión logística (LogReg), Análisis Discriminatorio Lineal (LDA), Análisis Discriminatorio Lineal Eigengene (ELDA), Maquinas Vectoriales de Soporte (SVM), Selvas Aleatorias (RF), Árboles de Partición Recursiva (RPART), así como también otras técnicas de clasificación de árboles de decisión relacionados, Centroids Shrunken (SC), StepAIC, Kth-Nearest Neighbor, Boosting, Árboles de Decisión, Redes
 55
 60
 65

Neurales, Redes Bayesianas, Maquinas Vectoriales de Soporte, y Modelos Markov Ocultos, entre otros. Se pueden utilizar otras técnicas en la supervivencia y el tiempo para análisis de riesgos de eventos, incluyendo los modelos Cox, Weibull, Kaplan-Meier y Greenwood, bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

5 “Medir” o “medición” o alternativamente “detectar” o “detección”, significa evaluar la presencia, ausencia, cantidad o monto (que puede ser una cantidad efectiva) de una sustancia dada dentro de una muestra clínica o derivada del sujeto, que incluye la derivación de los niveles de concentración cualitativos o cuantitativos de tales sustancias, o evaluar de otra manera los valores o categorización de unos parámetros clínicos no analitos del sujeto.

10 La invención

Un objeto de la invención es un método para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular, que comprende.

15 -medir, en una muestra obtenida de dicho sujeto, al menos dos factores de riesgo cardiovascular:

a) actividad de sPLA2 y

b) fosfolípidos oxidados o partículas de apolipoproteína B-100 (OxPL/apoB),

20 - combinar dichas mediciones, el valor combinado de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB es indicador de que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular.

De acuerdo con la invención, combinar dichas mediciones utilizando unos resultados de análisis estadístico para obtener un valor combinado, que es indicativo de tener o un riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular.

25 En un ejemplo, el sujeto puede ser un sujeto sustancialmente saludable, lo que significa que el sujeto no ha sido previamente diagnosticado o se ha identificado por tener o que sufra de una enfermedad cardiovascular, o que no ha desarrollado un evento cardiovascular.

30 En otro ejemplo, él sujeto también puede ser aquel que es asintomático para la enfermedad cardiovascular. Como se utiliza aquí, un sujeto “asintomático” se refiere a un sujeto que no exhibe los síntomas tradicionales de la enfermedad o evento cardiovascular, incluyendo, pero no estando limitado a, dolor de pecho, y dificultad en la respiración para CAD, clasificación para PAD, y TIAS, MCI y dolor de cabeza severo para CVD.

35 En otro ejemplo el sujeto puede ser aquel que está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular, definido mediante indicios clínicos y biológicos tales como por ejemplo: edad, género, concentración LDL, concentración HDL, concentración de triglicéridos, presión arterial, índice de masa corporal, concentración CRP, calificación de calcio coronario, circunferencia de la cintura, estado de fumador de tabaco, historia previa de enfermedad cardiovascular, historia familiar de enfermedad cardiovascular, frecuencia cardiaca, concentración de la insulina en ayunas, concentración de la glucosa en ayunas, estado de la diabetes, y uso de medicamentos para presión arterial alta.

40 En otro ejemplo el sujeto puede ser aquel que ha sido previamente diagnosticado o que se ha identificado para una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular, tal como por ejemplo trastornos isquémicos crónicos sin necrosis del miocardio (por ejemplo angina de pecho estable o de esfuerzo), trastornos isquémicos agudos sin necrosis del miocardio (por ejemplo angina de pecho inestable) trastornos isquémicos con necrosis del miocardio (por ejemplo infarto del miocardio con evaluación del segmento ST o infarto del miocardio con elevación del segmento no ST).

45 La isquemia de tejido es a menudo definida en términos relativos y ocurre cuando las necesidades de oxígeno exceden el suministro de oxígeno a los tejidos. Existe un desbalance entre el tejido (miocardio por ejemplo, las demandas y suministro de oxígeno. Esta condición de falta de oxígeno puede estar acompañada por la remoción inadecuada de metabolitos consecuente con la perfusión reducida. La isquemia del miocardio también se puede diagnosticar clínicamente (dolor de pecho por ejemplo), biológicamente (incremento en la actividad de la mieloperoxidasa, por ejemplo), metabólicamente, utilizando escintigrafía, al analizar los trastornos del movimiento de la pared regional o mediante el uso de un electrocardiograma (modificaciones típicas del segmento ST, desviación del segmento superior o ST inferior, cambios típicos en la onda T tales como inversión de la onda T u ondas T positivas simétricas empujadas o de alta amplitud. La isquemia silente es típicamente diagnosticada utilizando escintigrafía o una grabación del electrocardiograma de 24h.

50 La angina estable y de esfuerzo se manifiesta típicamente mediante un dolor de pecho durante el ejercicio y se recupera lentamente al descansar. Esta usualmente refleja isquemia de tejido durante el ejercicio.

La angina inestable es un incremento reciente de la frecuencia y/o la severidad de la angina estable, un primer episodio de angina, o una angina al descansar.

5 La necrosis del miocardio es típicamente diagnosticada mediante un incremento en las enzimas del miocardio (por ejemplo troponina 1, troponina T, CPK) en la sangre circulante.

10 En otro ejemplo, el sujeto puede ser aquel que muestra una mejora en los factores de riesgo cardiovascular como resultado de tratamientos y/o terapias para enfermedades cardiovasculares. Tales mejoras incluyen una reducción en el índice de masa corporal, una reducción en el colesterol total, una reducción en los niveles LDL, un incremento en los niveles HDLC, una reducción en la presión arterial sistólica y/o diastólica, u otros de los factores de riesgo anteriormente mencionados o combinaciones de los mismos.

15 En un ejemplo, no se ha diagnosticado el inicio de un síntoma isquémico en el sujeto. La isquemia del miocardio se puede diagnosticar clínicamente (dolor de pecho, por ejemplo), biológicamente (incremento en la actividad de la mieloperoxidasa, por ejemplo), metabólicamente utilizando escintigrafía, al analizar los trastornos del movimiento de la pared regional o mediante el uso de un electrocardiograma (modificaciones típicas del segmento ST, desviación del segmento superior o inferior ST, cambios típicos en la onda T tal como inserción de la onda T u ondas T positivas de alta amplitud o simétricas empinadas).

20 En otro ejemplo, se ha diagnosticado el inicio de síntomas isquémicos en el sujeto.

En un ejemplo, la muestra utilizada para medir la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y opcionalmente otros factores de riesgo cardiovascular en una muestra de sangre, sangre completa, plasma, suero.

25 La actividad de sPLA2 se mide en una muestra

La medición de la actividad de sPLA2 se puede efectuar mediante un ensayo fluorimétrico de acuerdo con Radvanyi et al. (1989 Anal Biochem 177: 103-9) modificados por Pernas et al. (199) Biochem Res Commun 178: 1298-1305) todos incorporados mediante referencia.

30 En particular, se utilizó el siguiente ensayo. La sal de 1-hexadecanoil-2-(1-pirenodecanoil)-sn-glicero-3-fosfometanol sódica (Interchim, Montlucon, Francia) se utilizó como un sustrato para el sPLA2. La hidrólisis de este sustrato mediante sPLA2 produce ácido 1-pirenodecanoico, que emite fluorescencia a 397 nm. Un volumen (E) de 0.03 ml de plasmas en alícuotas se mezcla con 5 nmol de sustrato en la presencia de 10 mM de Tris-HCL pH 8.7, 0.1% de albumina, 10 mM de CaCl₂ en un volumen total de 2.5 ml, y la fluorescencia (F) se mide a 397 nm después de un minuto. El 100% de la hidrólisis del sustrato se obtiene con 0.1 U de veneno de abeja sPLA2 (Sigma Chemical Co., Francia) durante un minuto, el valor de la fluorescencia al final de la reacción de un minuto (F_{max}) corresponde así a una actividad de 2 nmoles/min/ml (V_{max}). La actividad (A) de la muestra (expresada en nmol/ml/min) se da por medio de la siguiente fórmula: $A = (V_{max} * F) / (E * F_{max})$.

40 Las muestras son diluidas cuando la hidrólisis del sustrato está por encima del 50%. La hidrólisis del sustrato en la ausencia de plasma se utiliza como control negativo y se deduce de la actividad de sPLA2. Todas las muestras son ensayadas por duplicado. La actividad detectable mínima y el límite de detección es de 0.10 nmol/min/ml y el coeficiente intra e inter ensayo de variación es inferior del 10%.

45 La medición de la actividad de sPLA2 se puede efectuar mediante un ensayo fluorimétrico mejorado, utilizando una medición fluorimétrica automatizada, con un volumen de muestra pequeño, una relación sustrato/enzima modificada (10 nmoles/U en lugar de 50 nmoles/U) y un termostato graduado en 30°C, que suministra una presión y sensibilidad mayor (2, 7% < dentro de un coeficiente de tanda de variación (CV) < 3.2% y entre tanda CV = 5.7%) que el método previo (dentro de la tanda CV < 10% y entre la tanda CV < 10%) y un tiempo sustancialmente más corto para completar el ensayo. En particular, el siguiente ensayo se utilizó para una medición automatizada. La sal de 1-hexadecanoil -2-(1-pirenodecanoil)-sn-glicero-3-fosfometanol sódica (Interchim, Montlucon, Francia) se utilizó como un sustrato para sPLA2. La hidrólisis de este sustrato mediante sPLA2 produce ácido 1-pirenodecanoico, que emite fluorescencia a 405 NM. En resumen, 1 nmol de sustrato fluorescente en 0.2 ml de sustrato amortiguador (10 mM de Tris-HCL pH 8.7, 0.1% de albumina, 10 mM de CaCl₂) se distribuyó automáticamente en una Placa de microtitulación Black Maxisorp (96 posos). En razón de las propiedades de autoapagado del sustrato, se registra primero una fluorescencia baja (F_{min}) en un Fluorímetro Fluostar Optima equipado con un dispositivo de agitación y un termostato graduado a 30°C. La adición de 30 µl (100 U/mL) de veneno de abeja PLA2 (Sigma Chemical Co., Francia) conduce a una hidrólisis rápida de todo sustrato (100% hidrólisis) y un incremento en la fluorescencia a un valor máximo (F_{max}), que corresponde a una actividad de 5 nmol/ml. Para determinar la actividad de sPLA2 en muestras de sangre desconocidas, 30 µl de suero, (E) fueron distribuidas y agregadas automáticamente a la mezcla del sustrato y la fluorescencia se registró en un minuto (F). Se utilizó un procedimiento de dos puntos para medir la intensidad de la fluorescencia corregida de cada muestra y para evaluar la actividad enzimática (expresada en nmol/min/ml). Todas las muestras fueron probadas por duplicado. La actividad (A) de la muestra (expresada en nmol/ml/min) se da por medio de la siguiente fórmula: $A = (V_{max} * F) / (E * F_{max})$.

La hidrólisis del sustrato en la ausencia del suero se utiliza como control negativo y se deduce de la actividad PLA2. Todas las muestras son ensayadas por duplicado. A menos que se mencione otra cosa, todos los valores numéricos dados aquí para la actividad de sPLA2 del suero se miden de acuerdo al ensayo anteriormente definido para medición automatizada.

La fosfolipasa se puede utilizar para efectuar el ensayo en una fosfolipasa secretoria o una fosfolipasa con una actividad conocida y preferiblemente una fosfolipasa de veneno de abeja.

La actividad de sPLA2 se puede determinar mediante un proceso basado en un ensayo fluorimétrico que comprende poner en contacto una muestra biológica que contiene dicho sPLA2 y tomada de dicho paciente, con un sustrato a una concentración de 1 nM a 15 nM, el volumen de muestra de suero es de 5 µl a 50 µl y el volumen del sustrato es de 100 µl a 300 µl, en un rango de temperatura de aproximadamente 15°C a aproximadamente 40°C y preferiblemente 30°C. La fosfolipasa utilizada podría ser una fosfolipasa proveniente de veneno de abeja o de veneno de serpiente como el veneno de la Naja, preferiblemente veneno de abeja. Esta podría ser una fosfolipasa recombinante proveniente de cualquier especie.

Este ensayo se describió en el ejemplo 2 de la WO2008/015546. La ventaja de este método es el volumen de muestra pequeño del sustrato utilizado y termoestable, que suministra una mayor precisión y sensibilidad.

Alternativamente, se puede utilizar una variante de la medición fluorimétrica automatizada como se definió anteriormente, la cual posibilita aliviar la imprecisión que podría resultar de un incremento no específico en la intensidad de fluorescencia debido a otros factores en la muestra interfiriendo así con la medición de la actividad de sPLA2. Este método solo difiere del método de medición fluorimétrico automatizado anteriormente definido en que la siguiente fórmula se utiliza para determinar la actividad de sPLA2.

$$A = F \cdot s / [(F_{\max} - F_{\min}) \cdot V]$$

En donde:

-A representa la actividad de sPLA2 expresada en nmol/min/ml;

-s representa la cantidad de sustrato expresada en nmol (usualmente 1 nmol en un volumen de 200 µl de solución de trabajo);

-V representa el volumen de muestra expresado en ml (usualmente de 0.30 a 0.50 ml);

-(F_{max} – F_{min}) representa la diferencia entre la señal de fluorescencia máxima al final de la reacción en la presencia de PLA2 proveniente de veneno de abeja y el control negativo;

-F representa la pendiente inicial, dentro del rango lineal, de la curva que representa la emisión de fluorescencia como una función del tiempo, expresada en min⁻¹.

Esta variante de la medición fluorimétrica automatizada se describió en el ejemplo 4 del documento WO2008/015546.

El OxPL/apoB se mide en dicha muestra.

Los métodos para medir la relación de OxPL/apoB se describe en el documento US 2006/177435. Dichos métodos están basados en la determinación de nivel OxPL/apoB en la muestra, la determinación del nivel apoB en la muestra, y luego calcular la relación OxPL/apoB.

El nivel del OxPL y el nivel del apoB en la muestra obtenida del sujeto se miden con dos o más diferentes biomoléculas. La primera biomolécula interactúa específicamente con el OxPL y la segunda biomolécula interactúa específicamente con el apoB. En algunos aspectos, las biomoléculas son anticuerpos, tales como, anticuerpos monoclonales. El anticuerpo que interactúa con el OxPL puede ser, por ejemplo, E06 o DLH3.

En otros aspectos, las biomoléculas son antígenos. En algunos ejemplos las biomoléculas son inmovilizadas para formar un arreglo que comprende un primer conjunto de una pluralidad de la primera biomolécula y el segundo conjunto de una pluralidad de la segunda biomolécula.

Ejemplos de fosfolípidos oxidados incluyen las formas oxidadas de 1-palmitoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforicolina (Ox-PAPC), 1-palmitoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforil-colina (POVPC,) 1-palmitoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (PGPC), 1-palmitoil-2-epoxiisoprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina (PEIPC), 1-estearoil-2-araquidonoil-sn-glicero-3-fosforilcolin-a oxidada (OxSAPC), 1-estearoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SOVPC, 1-estearoil-2-glutaroil-sn-glicero-3-fosforilcolina (SGPC), 1-estearoil-2-epoxiisoprostano-sn-glicero-3-fosforilcolina

(SIPC), 1-estearoil-2-araquidonil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (Ox-SAPE), 1-estearoil-2-oxovaleroil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SOVPE), 1-estearoil-2-gluaroil-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SGPE), 1-estearoil-2-epoxiisoprostano-sn-glicero-3-fosforiletanolamina (SEIPE).

5 Como se utilizan aquí, los términos “moléculas biológicas” y “biomoléculas” se pueden utilizar intercambiamente. Estos términos pretenden ser interpretados ampliamente, y generalmente comprenden polipéptidos, péptidos, oligosacáridos, polisacáridos, oligopéptidos, proteínas, oligonucleótidos, y polinucleótidos. Los Oligonucleótidos y los polinucleótidos incluyen, por ejemplo, ADN y ARN, por ejemplo, en la forma de aptámeros. Las biomoléculas también incluyen compuestos orgánicos, compuestos organometálicos, sales de compuestos orgánicos y organometálicos, sacáridos, aminoácidos, y nucleótidos, lípidos, carbohidratos, drogas, esteroides, lectinas, vitaminas, minerales, metabolitos, cofactores, y coenzimas. Las biomoléculas incluyen además derivados de las moléculas descritas. Por ejemplo, derivados de biomoléculas incluyen derivados de lípido y glicosilación de oligopéptidos, polipéptidos, péptidos y proteínas, tales como anticuerpos. Ejemplos adicionales de derivados de biomoléculas incluyen derivados de lípido de oligosacáridos y polisacáridos, por ejemplo, lipopolisacáridos.

15 Un ensayo bioquímico de ejemplo para identificar proteínas específicas tales como OxPL y apoB, emplean un formato de ensayo estandarizado, tal como el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima o la prueba ELISA, aunque la información suministrada aquí puede aplicar al desarrollo de otros bioquímicos o ensayos de diagnóstico y no está limitada al desarrollo de una prueba ELISA (ver, por ejemplo, Molecular Immunology: A Textbook, edited by Atassi et al. Marcel Dekker Inc., New York and Basel 1984, para una descripción de la prueba ELISA). Se entiende que están disponibles kits para el ensayo inmunosorbente ligado a enzima del ensayo comercial (ELISA) para varios constituyentes de plasma.

20 Los métodos mejorados para medición de la relación OxPL/apoB se describe en el documento WO01/88547. Dichos métodos mejorados pretenden estandarizar el ensayo al utilizar una fosforilcolina (PC). De acuerdo con dicho método, el inmunoensayo se puede efectuar al capturar primero el LDL sobre un poso de microtítulo al utilizar un anticuerpo que une tanto el LDL oxidado como no oxidado (por ejemplo anti-apoB), y luego la detección del OxLDL mediante un anticuerpo E06 marcado. Alternativamente, el anticuerpo E06 se puede encontrar en el fondo del pozo microtítulo y la cantidad del OxLDL unido determinada por el uso del anticuerpo anti-LDL marcado. El OxLDL también se podría utilizar para recubrir los posos de microtítulo y varias concentraciones de suero de paciente, que contienen putativamente OxLDL, se podrían mezclar con una cantidad límite constante de E06 o T15 marcado (por ejemplo biotinilado) para competir por la unión al OxLDL sobre la placa. Para cada ensayo, bajo condiciones estándar, se podría desarrollar una curva estándar que utiliza PC como un agente competente. Alternativamente, un conjunto paralelo de reacciones pueden ser corridas utilizando PC como una fuente de agente competente en lugar de suero de paciente. El PC se puede utilizar solo, obligado a una proteína portadora, tal como seroalbúmina de bobino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH).

35 La medición obtenida de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y opcionalmente otros factores de riesgo cardiovascular se combinan en análisis estadísticos, en donde el valor combinado de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y opcionalmente otros factores de riesgo cardiovascular son indicativos de tener o de desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular.

40 Como lo apreciará el experto en la técnica, existen muchas maneras de utilizar la medición de dos o más factores de riesgo con el fin de mejorar la cuestión de diagnóstico/pronóstico bajo investigación.

45 En una aproximación muy simple pero sin embargo a menudo efectiva, se asume un resultado positivo si una muestra es positiva para al menos uno de los marcadores investigados. Este puede ser por ejemplo el caso cuando se diagnostica una enfermedad infecciosa, como por ejemplo el SIDA. Frecuentemente, sin embargo, se evalúa una combinación de factores de riesgo. Preferiblemente las mediciones obtenidas para la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y opcionalmente otros factores de riesgo cardiovascular se combinan matemáticamente y el valor combinado se correlaciona con la cuestión de diagnóstico/pronósticos subyacente. Las mediciones del factor de riesgo se pueden combinar por cualquier estado apropiado del método matemático de la técnica. Los métodos matemáticos bien conocidos para correlacionar una combinación marcadora con una enfermedad emplean métodos como, análisis discriminario (DA) (es decir Da lineal, cuadrático, regularizado) Métodos Kernel (es decir SVM), Métodos no Paramétricos (es decir Clasificadores Vecinos más Cercanos a k), PLS (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos Basados en Árbol (es decir regresión lógica, CART, Métodos Aleatorios de Selva, los métodos “Boosting/Bagging”), modelos lineales generalizados (es decir Regresión Logística), métodos basados en componentes principales (es decir SIMCA), Modelos Aditivos Generalizados, Métodos basados en Lógica Difusa, Redes Neuronales y Métodos basados en Algoritmos Genéticos. El experto en la técnica no tendrá problema en seleccionar un método apropiado para evaluar una combinación marcadora.

60 Preferiblemente el método utilizado para correlacionar la combinación de factores de riesgo están en riesgo de tener una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular si se selecciona DA (es decir Análisis Discriminatorio Lineal, Cuadrático, Regularizado), Métodos Kernel (es decir SVM), Métodos no Paramétricos (es decir Clasificadores Vecinos más Cercanos k), PLS (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos basados en Árbol (es decir Regresión

Lógica, CART, Métodos Aleatorios de Selva, Métodos “Boosting”), o Modelos Lineales Generalizados (es decir Regresión Logística). Los detalles que se relacionan con estos métodos estadísticos se encuentran en las siguientes referencias. Ruczinski, I., Kooperberg C. LeBlanc, M., Logic regression, *J. of Computational and Graphical Statistics*, 12 (2003) 475- 511; Friedman, J. H., Regularized Discriminant Analysis, *J. of the American Statistical Association*, 84 (1989) 165-175; Trevor Hastie, Robert Tibshirani and Jerome Friedman, *the Elements of Statistical Learning*, Springer Verlag, 2001; Breiman, J. H., Olshen, R. A., Stone, C. J. (1984) *Classification and regression trees*, California: Wadsworth; Breiman, L., *Random Forests*, *Machine Learning*, 45 (2001) 5-32; Pepe, M. S., *The Statistical Evaluation of Medical Tests for Classification and Prediction*, Oxford Statistical Science Series, 28 (2003); and Duda, R. O. Hart, P. E., Stork, D. G., *Pattern Classification*, Wiley Interscience, 2nd Edition (2001).

Un corte multivariado optimizado para la combinación subyacente de los factores de riesgo se utiliza para discriminar el estado A del estado B, por ejemplo, enfermado y sustancialmente saludable. En ese tipo de análisis, los factores de riesgo ya no son independientes sino que forman un panel de factor de riesgo. Combinar las mediciones de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB no mejora significativamente la precisión del diagnóstico/pronóstico para enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular comparado con sujetos sustancialmente saludables o comparados con sujetos que han sido diagnosticados para una enfermedad o evento cardiovascular.

El análisis estadístico de las mediciones de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y opcionalmente otros factores de riesgo cardiovascular se basan en la determinación de posibilidades relativas (OR) utilizando procedimientos estándar. La posibilidad relativa se calcula al dividir las posibilidades en el grupo de ensayo por las posibilidades en el grupo de control. Las posibilidades de un evento se calculan como el número de eventos divididos por el número de no eventos. Si la posibilidades de un evento es mayor que el evento es más probable que pase que no (las posibilidades de un evento que es cierto que pase son infinitas); si las posibilidades son menores que uno las posibilidades de que el evento no pasará (las posibilidades de un evento imposible son cero). En general, la resistencia de asociación se reporta por las posibilidades relativas (OR) con 95% menor de (LCL) y un límite de confianza superior (UCL), que indica el factor por medio del cual el riesgo de tener una enfermedad o estar en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad se incrementa ($OR > 1$), el intervalo de confianza del 95% (95% CI) es el rango de los valores numéricos en los cuales podemos estar confiados (con una probabilidad computada, aquí del 95%) de que se encontrará el valor de la población que se estima. Los intervalos de confianza indican la resistencia de la evidencia; donde los intervalos de confianza son amplios, y ellos indican estimados menos precisos de efectuar. Entre mayor sea el tamaño de la muestra del ensayo, mayor será el número de eventos resultantes y mayor se volverá la confianza de que la reducción del riesgo relativo real es cercano al valor establecido. Así, los intervalos de confianza son más estrechos y la “precisión” se incrementa. Para aceptar de manera confiable un OR calculado como confiable, importante o clínicamente significativo, el límite inferior del intervalo de confianza, o el límite de confianza, debe ser > 1 si el $OR > 1$, o el límite superior del intervalo de confianza debe ser < 1 si $OR < 1$.

La precisión de un método de diagnóstico/pronóstico se describe mejor por sus características operativas del receptor (ROC) (ver especialmente Zweig, M. H., and Campbell, G., *Clin. Chem.* 39 (1993) 561-577). La gráfica ROC es una gráfica de todos los pares de sensibilidad/especificidad que resultan de una variación continua del umbral de decisión sobre el rango completo de datos observados.

El desempeño clínico de un ensayo de laboratorio depende de su precisión diagnóstica, o de su capacidad de clasificar correctamente los sujetos en subgrupos clínicamente relevantes. Las mediciones de la precisión diagnóstica de la capacidad de ensayo para distinguir correctamente dos diferentes condiciones de los sujetos investigados. Tales condiciones son por ejemplo salud y enfermedad.

En cada caso, la gráfica ROC describe el traslapo entre dos distribuciones al graficar la sensibilidad versus $1 -$ especificidad para el rango completo de umbrales de decisión. Sobre un eje de la y esta la sensibilidad, o la fracción positiva cierta [definida como (el número de resultados de ensayos positivos ciertos)/(número de positivos ciertos + número de resultados de ensayo negativos falsos)]. Este se ha denominado como positividad en la presencia de una enfermedad o condición. Este se calcula solamente del subgrupo afectado. Sobre el eje de las x está la fracción positiva falsa, o $1 -$ especificidad [definido como (el número de resultados positivos falsos)/(el número de negativos ciertos + números de resultados positivos falsos)]. Este es un índice de la especificidad y se calcula completamente de un subgrupo no afectado. Porque ya que las fracciones ciertas y falsas positivas se calculan completamente de manera separada, al utilizar los resultados del ensayo de dos diferentes subgrupos, la gráfica ROC es independiente de la prevalencia de la enfermedad en la muestra. Cada punto de la gráfica ORC representa un par de sensibilidad/ $1 -$ especificidad que corresponde a un umbral de decisión particular. Un ensayo con una discriminación perfecta (sin traslapo en las dos distribuciones de resultados tiene una gráfica ROC que pasa a través de la esquina izquierda superior, donde la fracción positiva cierta es 1.0, o 100% (sensibilidad perfecta), y la fracción positiva falsa es 0 (especificidad perfecta). La grafica teórica para el ensayo sin discriminación (identifica las distribuciones de los resultados para los dos grupos) es una línea diagonal a 45° de la esquina izquierda inferior a la esquina derecha superior. La mayoría de las gráficas caen entre estos dos extremos. (Si la gráfica ROC se cae completamente por debajo de la diagonal de 45° , esto se remedia fácilmente al reversar el criterio para “positividad” de “mayor que” a “menor que” o viceversa). Cualitativamente, entre más cercana sea la gráfica a la esquina izquierda superior, mayor será la precisión total del ensayo.

Uno de los objetivos convenientes para cuantificar la precisión diagnóstica de una prueba de laboratorio es expresar su desempeño por un único número. La medida global más común es el área bajo el gráfico ROC. Por convención, esta área es siempre 0.5 (si no lo es, se puede invertir la regla de decisión para que así sea). Los valores varían entre 1.0 (separación perfecta de los valores de prueba de los dos grupos) y 0.5 (diferencia de distribución no evidente entre los dos grupos de valores de prueba). El área no depende sólo de una porción determinada de la gráfica tal como el punto más cercano a la diagonal o la sensibilidad a 90% de especificidad, sino en toda la gráfica. Esta es una expresión cuantitativa, descriptiva de cómo está cerca la gráfica ROC a ser la perfecta (área = 1.0).

5
10 El valor combinado de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y, opcionalmente, otros factores de riesgo se compara con un valor de referencia.

15 El valor de referencia puede ser un valor de índice o se puede derivar de uno o más algoritmos de predicción de riesgos más uno o índices calculados para la enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular. Un valor de referencia puede estar relacionado con un número o valor derivado de los estudios de población, que incluyen, sin limitación, dichos sujetos que tienen un índice de masa corporal, niveles de colesterol total, niveles LDL/HDL, presión arterial sistólica o diastólica similares, los sujetos de la misma o similar edad gama, sujetos en el mismo o similar grupo étnico, sujetos que tienen antecedentes familiares de aterosclerosis, la aterotrombosis, o CAD, PAD, o CVD, o que se relacionan con la muestra a partir de un sujeto sometido a tratamiento por una enfermedad arteriovascular, como aterosclerosis, aterotrombosis, CAD, PAD, o CVD. Dichos valores de referencia se pueden derivar de análisis estadísticos y/o datos de predicción de riesgo de poblaciones obtenidos a partir de algoritmos matemáticos e índices calculados de la enfermedad arteriovascular, tales como, pero no limitados a, los algoritmos reportados en el Estudio Framingham, NCEP/ATP III, entre otros. El valor de referencia del Factor de Riesgo Cardiovascular también se puede interpretar y utilizar utilizando algoritmos y otros métodos de clasificación estadística y estructural.

20
25 El valor de referencia se deriva de la combinación de OxPL/apoB y actividad de sPLA2 y opcionalmente otros factores de riesgo cardiovascular en una muestra de control derivada de uno o más sujetos que son sustancialmente saludables como definió aquí anteriormente. Dichos sujetos que son sustancialmente saludables carecen de factores de riesgo tradicionales para una enfermedad cardiovascular: por ejemplo, aquellos sujetos tienen un nivel de colesterol en suero menor de 200 mg/dl, presión arterial sistólica de menos de o igual a 120 mm Hg, presión arterial diastólica menor o igual a 80 mm Hg, fumador pasivo, sin antecedentes de diabetes diagnosticada, ni síndrome coronario agudo o hipertensión diagnosticada previamente, entre otros factores de riesgo anteriormente mencionados, o se puede verificar mediante otra prueba diagnóstica invasiva o no invasiva de la enfermedad cardiovascular conocida en la técnica, tal como, pero no limitado a, electrocardiograma (ECG), ecografía de carótida en modo B (para medición del espesor de la íntima-media), tomografía computarizada de haz de electrones (EBCT), clasificación del calcio coronario, tomografía computarizada de alta resolución de múltiples cortes, resonancia magnética nuclear, prueba de esfuerzo de estrés, angiografía, ecografía intravascular (IVUS), otras técnicas de formación de imagen de contraste y/o radioisotópicas, u otras técnicas de pruebas de provocación.

30
35
40 Dichos sujetos se monitorizan y/o periódicamente se vuelven a probar durante un período de tiempo de diagnóstico importante ("estudios longitudinales") después de dicha prueba para verificar la ausencia continua de enfermedad cardiovascular o eventos cardiovasculares agudos (supervivencia libre de enfermedad o evento). Dicho periodo de tiempo podrá ser de un año, dos años, dos a cinco años, cinco años, cinco a diez años, diez años, o diez años o más desde la fecha de prueba inicial para la determinación del valor de referencia. Adicionalmente, la medición retrospectiva de los niveles actividad de sPLA2 y OxPL/apoB en muestras históricas de sujetos adecuadamente inclinados puede ser utilizado en el establecimiento de estos valores de referencia, acortando de esta manera el tiempo de estudio requerido, presumiendo que los sujetos han sido seguidos adecuadamente durante el período de intervención a través del horizonte previsto de la reivindicación de producto.

45
50 Un valor de referencia también se puede derivar de la combinación de la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y, opcionalmente, otros factores de riesgo cardiovascular en una muestra derivada de uno o más sujetos que (1) han sido diagnosticados o identificado previamente para una enfermedad cardiovascular o evento cardiovascular por una de las técnicas invasivas o no invasivas anteriores, o que ha sufrido un evento cardiovascular o ruptura de placa, y (2) no ha experimentado un evento cardiovascular recurrente.

55
60 Un valor de referencia también se puede derivar de la combinación de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y, opcionalmente, otros factores de riesgo cardiovascular en una muestra derivada de uno o más sujetos que están en alto riesgo de desarrollar un evento cardiovascular, o que están en alto riesgo de desarrollar una ruptura de placa aterosclerótica o aterotrombótica.

65 Un valor de referencia también se puede derivar de la combinación de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB y, opcionalmente, otros factores de riesgo cardiovascular en una muestra derivada de uno o más sujetos que muestran una mejora en los factores de riesgo cardiovascular como resultado de los tratamientos y/o terapias para enfermedades cardiovasculares. Dichas mejoras incluyen una reducción en el índice de masa corporal, una

reducción en el colesterol total, una reducción en los niveles de LDL, un aumento en los niveles de HDLC, una reducción en la presión arterial sistólica y/o diastólica, u otros factores de riesgo anteriormente mencionados o combinaciones de los mismos.

5 El valor de referencia es un valor de índice o un valor inicial. Un valor de índice o valor de referencia se deriva de uno o más sujetos que no tienen una enfermedad cardiovascular, como la aterosclerosis, la aterotrombosis, CAD, PAD, o CVD, o de sujetos que son asintomáticos para una enfermedad cardiovascular. Un valor inicial también se puede derivar de un sujeto que ha mostrado una mejora en los factores de riesgo cardiovascular (como resultado de tratamientos o terapias cardiovasculares. Dichas mejoras incluyen, sin limitación, reducción en el índice de masa corporal, reducción en el colesterol total, reducción en los niveles de LDL, aumento en los niveles de HDLC, reducción en la presión arterial sistólica y/o diastólica, o combinaciones de los mismos.

10 El método comprende combinar la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB con indicios clínicos y biológicos tales como edad, antecedentes de hipertensión, diabetes, infarto del miocardio, insuficiencia cardíaca, angiografía coronaria o angioplastia, clase Killip, desviación del segmento ST, revascularización coronaria (cirugía de bypass de la arteria coronaria o angioplastia) y creatinina.

En otro ejemplo, el método comprende:

20 - medir, en una muestra obtenida de dicho sujeto, por lo menos dos factores de riesgo cardiovascular:

a) actividad de sPLA2 y

b) fosfolípidos oxidados en partículas B-100 de apolipoproteína (OxPL/apoB),

25 y por lo menos un factor de riesgo cardiovascular seleccionado del grupo de Clasificación de Riesgo Framingham (FRS), CRP, IgM IC (Complejos Inmunes de Ig4D) de apoB100 o IgM MDA-LDL (IgM Malondialdehído LDL), actividad Lp-PLA2 y masa de sPLA2,

30 - combinar dichas mediciones, el valor combinado es indicador de que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular.

De acuerdo con dicho ejemplo, el FRS se calcula utilizando un algoritmo reportado anteriormente, que tiene en cuenta la edad, sexo, colesterol total, HDL-C, presión arterial sistólica y diastólica, tabaquismo y presencia de diabetes (Wilson PW et al., *Circulation*. 1998; 97: 1837 hasta 1847).

35 De acuerdo con dicho ejemplo, la CRP se puede medir por métodos conocidos en la técnica, tales como el método descrito en Arima et al (*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008 Jul; 28 (7): 1385-91) y Ridker et al. (*New England Journal of Medicine*, 2000, 342: 836-843).

40 De acuerdo con dicho ejemplo, el IgM IC de apoB100 e IgM MDA-LDL se pueden medir por métodos conocidos en la técnica tales como aquellos de acuerdo con Tsimikas et al (2004, *Circulation*, 110: 1406-1412 y 2003 *J. Am. Coll. Cardiol.* 41: 360-370).

45 De acuerdo con dicho ejemplo, la actividad de Lp-PLA-2 se puede medir por métodos conocidos en la técnica tales como aquellos de acuerdo con Kiechl et al. (2007, *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol* 27: 1788-1795). Por ejemplo, la actividad de Lp-PLA2 se puede medir utilizando un equipo disponible comercialmente (Azwel Inc) con base en el método de Kosaka et al (2000 *Clin. Chim. Acta.* 296: 151-161). La actividad de LpPLA2 también se puede medir por el método descrito en WO2005074604.

50 De acuerdo con dicho ejemplo, la masa de sPLA2 se puede medir utilizando un ensayo inmunométrico con un anticuerpo monoclonal específico para sPLA2-IIA (Cayman Chemical Company).

En una realización, el método de la invención comprende la combinación de las mediciones de actividad de sPLA2, OxPL/apoB y FRS.

55 En otra realización, el método de la invención comprende las mediciones de actividad de sPLA2, OxPL/apoB, FRS y CRP.

En otro ejemplo, el método comprende las mediciones de actividad de sPLA2, OxPL/apoB, FRS y masa de sPLA2

60 El método como se describió aquí anteriormente es para identificar si un sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular.

65 En una realización de la invención, dicha enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular es Síndrome Metabólico, Síndrome de Cromosoma X, aterosclerosis, aterotrombosis, enfermedad de la arteria coronaria, angina

de pecho estable e inestable, apoplejía, enfermedades de la aorta y sus ramificaciones (tal como trombosis aórtica o aneurisma aórtico), enfermedad de arteria periférica, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, y cualquier evento cardiovascular isquémico agudo.

5 Opcionalmente, los sujetos identificados que tienen, o tienen un aumento en el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular o evento cardiovascular se escogen para recibir un régimen terapéutico para ralentizar el progreso de una enfermedad cardiovascular, o reducir o evitar el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular o un evento cardiovascular.

10 El método como se describió aquí anteriormente es para monitorizar una enfermedad o evento cardiovascular en un sujeto en necesidad de esto, dicha enfermedad o evento cardiovascular es Síndrome Metabólico, Síndrome de Cromosoma X, aterosclerosis, aterotrombosis, enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho estable e inestable, apoplejía, enfermedades de la aorta y sus ramificaciones (tal como trombosis aórtica o aneurisma aórtico), enfermedad de arteria periférica, enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, y cualquier evento cardiovascular isquémico agudo.

15 El método como se describió aquí anteriormente es para evaluar el progreso de una enfermedad cardiovascular en un sujeto en necesidad del mismo.

20 El método como se describió aquí anteriormente es para monitorizar la efectividad de un tratamiento para una enfermedad cardiovascular. La eficacia del tratamiento se reflejará por los cambios en las mediciones de los factores de riesgo cardiovascular. Si un tratamiento tiene un efecto deseado, las mediciones y de esta manera el valor combinado de los factores de riesgo cardiovascular será inferior en comparación con las mediciones y valor combinado obtenido antes del tratamiento.

25 El método como se describió aquí anteriormente es para seleccionar un régimen de tratamiento para un sujeto diagnosticado con o que está en riesgo de una enfermedad cardiovascular.

30 Otro objeto de la invención es el uso de un equipo para identificar si un sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular, que comprende:

- medios para medir actividad de sPLA2 y
- medios para medir OxPL/apoB.

35 Dicho equipo comprende adicionalmente medios para combinar las mediciones con el fin de obtener un valor combinado.

40 Dichos medios para combinar las mediciones de los factores de riesgo cardiovascular son algoritmos que permiten análisis estadístico como DA (es decir, Análisis Discriminante Regularizado, Lineal, cuadrático), Métodos de Kernel (es decir, SVM), Métodos no Paramétricos (es decir, Clasificadores Vecinos Más Cercanos a k), PLS (Mínimos Cuadrados Parciales), Métodos con Base en Árboles (es decir, Lógica de Regresión, CART, Métodos Estimados Aleatorios, Métodos de Refuerzo), o Modelos Lineales Generalizados (es decir, de Regresión Logística).

45 En otra realización, dichos medios para medir actividad de sPLA2 son

- un regulador sPLA2,
- un compuesto confiable para ser hidrolizado por sPLA2, cuyos productos hidrolíticos se pueden cuantificar directa o indirectamente,
- una muestra de actividad de sPLA2 de control.

55 El compuesto confiable para ser hidrolizado por sPLA2, es un sustrato natural o no natural de la enzima. En el caso de los productos de hidrólisis que no son cuantificables por sí mismos, se pueden utilizar compuestos que pueden reaccionar con estos productos y que producen compuestos cuantificables, dicho método es una cuantificación indirecta. En general, los compuestos confiables para ser hidrolizados por sPLA2 son un fosfolípido o un análogo de fosfolípidos que comprende una unidad estructural fluorogénica o cromogénica. Por ejemplo, dicho fosfolípidos es un glicerolfosfolípido que se sustituye en la posición 2 mediante un acilo fluorescente; tal como 1-hexadecanoil-2-(1-pirenododecanoil)-sn-glicero-3-fosfometanol o el acilo fluorescente 1-pirenododecanoilo, el sustrato para peroxidasa de rábano es por ejemplo 3,3',5,5' tetrametil-bencidina (TMB).

60 Los acilos fluorescentes confiables que se van a utilizar son por ejemplo acilos sustituidos por grupos fluorescentes bien conocidos en la técnica, tales como pireno o fluoresceína. Alternativamente, se pueden utilizar

glicerolfosfolípidos, tales como glicerolfosfolípidos sustituidos en la posición 2 mediante acilos radioactivos o fosfatidil etanolamina radioactiva.

La muestra de actividad de sPLA2 de control comprende por ejemplo veneno de abaja sPLA2.

- 5 En otra realización, dichos medios para medir OxPL/apoB son
- un anticuerpo que interactúa específicamente con OxPL tal como por ejemplo E06, T15 o DLH3 y
- 10 -un anticuerpo que interactúa específicamente con apoB tal como por ejemplo MB47,
- opcionalmente una muestra OxPL de control.

Dicha muestra OxPL control puede ser una muestra que contiene una fosforilcolina (PC). La PC se puede utilizar sola o unida a una proteína portadora, tal como albúmina de suero bovino (BSA) o hemocianina de lapa californiana (KLH).

20 En otra realización de la invención, dicho equipo puede comprender adicionalmente medios para medir por lo menos un factor de riesgo cardiovascular seleccionado del grupo de Clasificación de Riesgo de Framingham (FRS), CRP, IgM IC de apoB100 o IgM MDA-LDL y LpPLA-2.

La Clasificación de Riesgo de Framingham (FRS) se determina por el método conocido en la técnica, tal como el método descrito en Wilson PW et al. (Circulation. 1998 May 12; 97(18):1837-47) y D'Agostino et al. (JAMA: The Journal of the American Medical Association. 2001;286:180-187).

25 Los medios para medir de CRP son por ejemplo:

- un regulador CRP
- un anticuerpo monoclonal que interactúa específicamente con CRP,
- un anticuerpo conjugado con enzima específico para CRP,
- 30 - un nivel de CRP de control.

Los medios para medir IgM IC del apoB100 o son por ejemplo:

- un regulador IgM de apoB 100,
- 35 - un reactivo quimioluminiscente
- un anticuerpo monoclonal específico para apoB100 humano,
- un IgM anti humano marcado con fosfatasa alcalina,
- un IgM IC de control de la muestra de nivel apoB100.

40 Los medios para medir IgM MDA-LDL son, por ejemplo:

- un regulador MDA-LDL,
- un reactivo quimioluminiscente
- un IgM anti humano marcado con fosfatasa alcalina,
- 45 - un IgM MDA-LDL de control de muestra de nivel de apoB100.

Los medios para medir Lp-PLA-2 son, por ejemplo:

- Un compuesto que reduce tiol activo en una muestra, y
- 50 - un sustrato convertido a un producto tiol libre en presencia de Lp-PLA2enzimáticamente activa.

Opcionalmente, dichos medios pueden comprender adicionalmente un anticuerpo que interactúa específicamente con Lp-PLA2 tal como por ejemplo el anticuerpo monoclonal 2C10, 4B4, B200, B501, 90D1E, 90E3A, 90E6C, 90G11D o 90F2D.

55 Por ejemplo, dicho compuesto que reduce tiol activo y dicho sustrato convertido a un producto de tiol libre en presencia de Lp-PLA2 enzimáticamente activa se describen en el documento WO2005074604.

Los medios para medir la masa sPLA2 son por ejemplo:

- 60 - un regulador de masa de sPLA2
- un anticuerpo monoclonal que interactúa específicamente con sPLA2-IIA,
- un anticuerpo conjugado con enzima específico para sPLA2 IIA,
- un nivel de masa de sPLA2 de control.

65 Descripción de las figuras

Figura 1: Características iniciales de los participantes del estudio.

Figura 2: Relaciones de posibilidades no ajustadas de enfermedad arterial coronaria incidente durante el seguimiento de acuerdo con los terciles combinados de actividad de sPLA2 o actividad de Lp-PLA2 y OxPL/apoB.

Figura 3: Relaciones de posibilidades no ajustadas de enfermedad arterial coronaria incidente durante el seguimiento de acuerdo con los terciles combinados de actividad de sPLA2 o actividad de Lp-PLA2 y OxPL/apoB.

Figura 4: Área bajo ROC para FRS y combinación con por lo menos uno de OxPL/apoB, actividad de Lp-PLA2, actividad de sPLA2 y CRP.

Figura 5: Relaciones de posibilidades para CAD con base en terciles de OxPL/apoB y actividad de sPLA2, masa sPLA2 y Lp-PLA2.

Los puntos de corte terciles para OxPL/apoB son <1150 RLU, 1151-2249 RLU y > 2249 RLU, para niveles de actividad de sPLA2 <4.05 nmol/min por ml, 4.05 a 4.83 nmol/min por ml y > 4.83 nmol/min por ml, para los niveles de masa de sPLA2 <6.80 mg/dl, 6.80 a 11.29 mg/dl y > 11.19 mg/dl, y para la actividad de Lp-PLA2 <44.05 nmol/min por ml, 44.05-56.23 nmol/min por ml y > 56.23 nmol/min por ml.

Figura 6: Área bajo ROC para FRS y combinación con por lo menos uno de OxPL/apoB, actividad de Lp-PLA2, actividad de sPLA2 y CRP.

Figura 7: Relación entre grupos terciles de OxPL/apoB (<1150, 1151-2249 y >2.249 RLU, (A)), actividad de sPLA2 (<4.05, 4.05-4.83 y >4.83 nmol/min por ml; (B)), masa de sPLA2 (<6.80, 6.80-11.29 y > 11.19 mg/dl; (C)), actividad de Lp-PLA (<44.05, 44.05-56.23 y > 56.23 nmol/min por ml; (D)), y riesgo futuro de CAD dentro de cada Grupo de Clasificación de Riesgo de Framingham. La Clasificación de Riesgo de Framingham se calcula como riesgo bajo (<10% de riesgo de eventos mayores a 10 años), riesgo moderado (10% a 20%) y riesgo alto (> 20%). Los valores de p en la figura representan la comparación de cada tercil de los respectivos marcadores biológicos con el tercil más bajo de la categoría de FRS bajo de cada biomarcador.

EJEMPLOS

Métodos

La descripción detallada del estudio de seguimiento de la European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (EPIC -Norfolk) se ha publicado previamente (Day N. et al., Br. J. Cancer, 1999; 80 Suppl. I: 95-103). En resumen, este estudio poblacional prospectivo de 25,663 hombres y mujeres vinculados de los registros por edad y sexo de las prácticas generales en Norfolk, con edades comprendidas entre los 45 y 79 años, fue diseñado para investigar la dieta y otros determinantes del cáncer. Los participantes completaron un cuestionario inicial entre 1993 y 1997, asistieron a una visita clínica y se les hizo seguimiento hasta noviembre de 2003, un promedio de aproximadamente 6 años. Todos los individuos se han marcado para la certificación de muerte en la Oficina de Estadísticas Nacionales del Reino Unido, con el estado vital comprobado para toda la cohorte. Adicionalmente, los participantes admitidos en el hospital fueron identificados con su número del Servicio Nacional de Salud único por enlace de datos con la base de datos de la Autoridad Sanitaria del East Norfolk, que identifica todos los contactos hospitalarios en toda Inglaterra y Gales para los residentes de Norfolk. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Autoridad de Salud de Norwich, y todos los participantes proporcionaron autorización informada por escrito.

Población de estudio (figura 1)

Un estudio de control de caso anidado se realizó a cabo entre los participantes en el estudio Epic- Norfolk. La determinación del caso se ha descrito en detalle en otra parte (Boekholdt, SM, Circulation 2004; 110: 1418-1423). En resumen, 25,663 hombres y mujeres sanos, de edades comprendidas entre 45 y 79 años, fueron vinculados de los registros por edad y sexo de las prácticas generales en Norfolk. Los participantes completaron un cuestionario inicial entre 1993 y 1997, asistieron a una visita clínica y se les hizo seguimiento durante un promedio de 6 años. Se excluyeron los individuos que reportaron un antecedente de ataque al corazón o una apoplejía en la visita inicial. Se ha descrito previamente la comprobación del caso. Todos los individuos se han marcado para la certificación de muerte en la Oficina de Estadísticas Nacionales del Reino Unido, con el estado vital comprobado para toda la cohorte. Adicionalmente, los participantes admitidos en los hospitales fueron identificados con su número del Servicio Nacional de Salud por el enlace de datos con la base de datos de la Autoridad Sanitaria de East Norfolk, que identifica todos los contactos hospitalarios en toda Inglaterra y Gales para los residentes de Norfolk. Fueron identificados si los participantes que tenían CAD durante el seguimiento habían ingresado al hospital y/o murieron con CAD como la causa subyacente. El CAD se define como los códigos 410 a 414 de acuerdo con la Clasificación Internacional de Enfermedades 9ª revisión. Estos códigos abarcan el espectro clínico de CAD, tal como angina

inestable, angina estable, e infarto del miocardio. Los controles fueron los participantes del estudio que permanecieron sin ninguna enfermedad cardiovascular durante el seguimiento. Fueron excluidos todos los individuos que reportaron antecedentes de ataque al corazón o apoplejía en la visita clínica inicial. Fueron emparejados dos controles para cada caso por sexo, edad (dentro de los 5 años) y al momento de la inscripción (dentro de 3 meses). No se han recogido datos sobre eventos no cardíacos. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Autoridad de Salud de Norwich, y todos los participantes proporcionaron autorización informada por escrito.

Mediciones del estudio

Las muestras de sangre se almacenaron a -80°C en el Departamento de Bioquímica Clínica, Universidad de Cambridge. Se midieron los niveles de colesterol total, colesterol HDL (HDL-C) y triglicéridos en suero en muestras frescas con el RA 1000 (Bayer Diagnostics, Basingstoke, Reino Unido), y los niveles de colesterol LDL (LDL-C) se calcularon con la fórmula de Friedewald (Friedewald WT. et al., *CHn Chem.* 1972; 18: 499-502. Los niveles de CRP se midieron con un ELISA tipo intercalado como se describió anteriormente (Bruins P. et al. *Circulation* 1997; 96: 3542-3548).

La actividad de sPLA2 en suero se midió mediante un ensayo fluorimétrico selectivo de Radvanyi et al. (*Anal Biochem.* 1989;177:103-109), según se modifica por Pernas et al. (*Biophys Res Commun.* 1991; 178:1298-1305). La actividad de sPLA2 se midió utilizando sustrato fluorescente 1-hexadecanoilo-2- (1-pirenodecanoil) -sn-glicero-3 fosfometanol, sal de sodio (Interchim, Montluçon, Francia) como se describió previamente (Mallat Z. et al. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 1249-1257). El cien por ciento de hidrólisis del sustrato fluorescente se midió utilizando 0.1 de unidad de PLA2 de veneno de abeja (Sigma Chemical Co., Francia). La hidrólisis del sustrato en ausencia de plasma se utilizó como control negativo y se dedujo de la actividad de PLA2. Todas las muestras se probaron por duplicado y la actividad en plasma se expresó como nmoles/min/ml. La actividad mínima detectable fue de 0.10 nmol/min/ml. La imprecisión del ensayo fluorimétrico de actividad de sPLA2 se determinó mediante medición de muestras con actividad de sPLA2 baja (1.25 nmol/min/ml) y alta (9.5 nmol/min/ml). Dentro de las tandas los CV varían entre 2.7% (muestra de baja actividad) a 3.2% (muestra de alta actividad) y el CV entre tanda era 5.7%.

Los niveles de OxPL/apoB se midieron con el anticuerpo E06 como en Tsimikas et al (*Current Opinion in Lipidology*, 2008, 19: 369-377).

Se analizaron todas las muestras en orden aleatorio para evitar el sesgo sistémico. Los investigadores y personal de laboratorio fueron cegados a la información de identificación personal, y pudieron identificar muestras por solo el número.

Análisis estadístico

Las características iniciales fueron comparadas entre los casos y controles emparejados teniendo en cuenta la coincidencia entre ellas. Un modelo de efectos mezclados fue utilizado para las variables continuas y la regresión logística condicional se utilizó para las variables categóricas. Debido a que niveles de triglicéridos, CRP, OxPL/apoB, antígeno de sPLA2 y actividad de sPLA2 tuvieron una distribución sesgados, los valores fueron transformados logarítmicamente antes de ser utilizados como variables continuas en los análisis estadísticos; sin embargo, en las tablas, se muestran los rangos interterciles correspondientes y las medianas no transformadas.

Los terciles se basaron en la distribución en los controles Para los análisis específicos de sexo, se utilizaron terciles específicos a sexo, y para los análisis agrupados, se utilizaron cuartiles con base en sexos combinados.

Adicionalmente, se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson para evaluar la relación entre la actividad de sPLA2 como una variable continua y otros biomarcadores de riesgo continuos. La relación de posibilidades y los intervalos de confianza al 95% correspondientes (CI 95%) como una estimación del riesgo relativo de CAD incidente se calcularon utilizando análisis de regresión logística condicional. La actividad de sPLA2 más baja o la actividad de Lp-PLA2 más baja y los terciles de OxPL/apoB más bajos fueron utilizados como categoría de referencia.

La relación de posibilidades se ajustó por los siguientes factores de riesgo cardiovascular: índice de masa corporal, diabetes, presión arterial sistólica, LDL-C, HDL-C, y tabaquismo (nunca, anteriormente, actualmente).

Las relaciones de posibilidades también se ajustaron para la clasificación FRS. La Clasificación de Riesgo de Framingham se calculó utilizando un algoritmo reportado anteriormente, que tiene en cuenta la edad, sexo, colesterol total, HDL-C, presión arterial sistólica y diastólica, tabaquismo y presencia de diabetes (Wilson P.W. et al., *Circulation.* 1998; 97:1837-1847). Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software SPSS (versión 12.0.1; Chicago, Ill). Un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Mediciones combinadas de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB para evaluar el riesgo de CAD incidente

5 Se seleccionaron los casos que desarrollaron CHD durante el seguimiento y los controles seleccionados que permanecieron sin enfermedad cardiovascular, y fueron emparejados a casos por sexo, edad y tiempo de inscripción. El riesgo de eventos de CHD se potenció significativamente por la actividad elevada de sPLA2 y Lp-PLA2 y por el OxPL/apoB elevado. La gente en los más altos terciles de OxPL/apoB y actividad de Lp-PLA2 tenían una relación de posibilidades de 2.22 (1.51-3.27) y los pacientes en los más altos terciles de OxPL/apoB y actividad de sPLA2 tuvieron una relación de posibilidades de 4.34 (2.84-6.64) ($p < 0.0001$ para ambos en comparación con aquellos en los terciles más bajos para ambos) (Figura 2 y Figura 3 para los OR's ajustados para la clasificación FRS).

15 Los resultados mostrados en la figura 5 se basan en 763 casos y 1397 controles en donde todas características de los sujetos enumerados en la tabla 1 están disponibles.

20 La Figura 5 muestra que los sujetos en los terciles más altos, para la actividad de sPLA2 y OxPL/apoB tuvieron un riesgo significativamente elevado de CAD en el futuro, con un OR de 3.46 (2.22 a 5.42) en comparación con los sujetos en los terciles más bajos. Se observó una relación similar pero más débil para los terciles más altos de masa de sPLA2 y OxPL/apoB (OR 2.39 (1.58-3.61)).

El área bajo la curva de operación del receptor revela significativamente aumento de los valores al agregar actividad de sPLA2 y OxPL/apoB a los factores de riesgo tradicionales y al FRS (figura 4).

25 Los resultados mostrados en la figura 6 se basan en 763 casos y 1397 controles en donde todas las características de los sujetos enumerados en la Tabla 1 estaban disponibles y confirmaron que agregar actividad de sPLA2 y OxPL/apoB a factores de riesgo tradicionales y al FRS aumenta el valor predictivo.

30 Para evaluar si los biomarcadores oxidativos proporcionan valor predictivo adicional a los FRS, los terciles de OxPL/apoB, masa de sPLA2, actividad de sPLA2 y actividad de Lp-PLA2 fueron evaluados dentro de cada estimación de riesgo de FRS (figura 7). En las categorías de FRS bajas, la medida de OxPL/apoB no proporcionó valor predictivo adicional, pero la masa y la actividad de sPLA2 mostró casi un triplicado de la relación de posibilidades. Sin embargo, en las estimaciones de FRS altas, el OxPL/apoB es más del doble en la relación de posibilidades para predecir nuevos eventos cardiovasculares, la masa y actividad de sPLA2 son poco menos predictivas. La combinación de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB fue particularmente útil en reflejar el ajuste del riesgo entre las categorías de FRS. Por ejemplo, en la categoría de FRS baja, en comparación con los terciles más bajos, los terciles más altos de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB se asociaron con un OR (CI 95%) de 8.48 (2.98-24.16; $p < 0.001$), en la categoría FRS media 5.01 (2.28-11.41, $P < .001$) y en la categoría de FRS alta 14.35 (6.21-33.17, $P < .001$).

40 Este estudio de control de casos anidados dentro de la cohorte EPIC-Norfolk prospectiva seguida demuestra que los niveles iniciales elevados de OxPL/apoB están fuertemente asociados con un mayor riesgo de futuros eventos de CAD fatales y no fatales. Adicionalmente, el aumento de los niveles de fosfolipasas involucradas en el metabolismo de OxPL, particularmente la actividad de sPLA2, potenció el riesgo de eventos de CAD fatales y no fatales mediados por cualquiera de OxPL/apoB.

45 En el estudio Bruneck, la relación de riesgo de enfermedades cardiovasculares mediada por niveles OxPL/apoB se incrementó de aproximadamente 2 a 4 por la actividad de Lp-PLA2 (Kiechl et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1788-1795). Sin embargo, se observó una asociación débil en este estudio EPIC-Norfolk. Las explicaciones no son obvias, pero se pueden relacionar con diferencias en la metodología (prospectivos versus controles de caso) o más probablemente con el tamaño del estudio (82 eventos en el estudio Bruneck frente a 763 eventos en el estudio EPIC-Norfolk).

REIVINDICACIONES

1. Un método para identificar un sujeto que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular, que comprende:
- 5 - medir, en una muestra obtenida de dicho sujeto, por lo menos dos factores de riesgo cardiovascular:
- a) actividad de fosfolipasa A2 secretada (sPLA2) y
- b) fosfolípidos oxidados en partículas B-100 de apolipoproteína (OxPL/apoB),
- 10 - combinar dichas mediciones, el valor combinado de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB es indicador de que tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho valor combinado de actividad de sPLA2 y OxPL/apoB se compara con un valor de referencia.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, comprende adicionalmente medir por lo menos un factor de riesgo cardiovascular seleccionado del grupo de Clasificación de Riesgo Framingham (FRS), proteína reactiva C (CRP), IgM IC de apoB100 o IgM MDA-LDL, fosfolipasa A2 de lipoproteína)Lp-PLA2) y masa de sPLA2.
- 20 4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde se miden la actividad de sPLA2, OxPL/apoB y FRS.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde se miden la actividad de sPLA2, OxPL/apoB, FRS y CRP.
- 25 6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicha muestra es una muestra de sangre.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha enfermedad cardiovascular y/o evento cardiovascular es Síndrome Metabólico, Síndrome de Cromosoma X, aterosclerosis, aterotrombosis, enfermedad de la arteria coronaria, angina de pecho estable e inestable, apoplejía, enfermedades de la aorta y sus ramificaciones (tales como trombosis aórtica o aneurisma aórtico), enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular, y cualquier evento cardiovascular isquémico agudo.
- 30 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el OxPL/apoB se mide en un inmunoensayo utilizando un anticuerpo que interactúa con OxPL y un anticuerpo que interactúa con apoB.
- 35 9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la actividad de sPLA2 se mide en un ensayo fluorimétrico utilizando un sustrato para sPLA2.
- 40 10. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para monitorizar la eficacia de un tratamiento para una enfermedad cardiovascular.
- 45 11. Uso de un equipo para identificar si un sujeto tiene o está en riesgo de tener o desarrollar una enfermedad cardiovascular y/o un evento cardiovascular de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicho equipo comprende:
- medios para medir la actividad de sPLA2 y
- medios para medir OxPL/apoB.
- 50 12. El uso de un equipo de acuerdo con la reivindicación 11 en donde dicho equipo comprende adicionalmente medios para combinar las mediciones con el fin de obtener un valor combinado.
13. El uso de un equipo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde los medios para medir la actividad de sPLA2 son
- 55 - un regulador sPLA2,
- un compuesto susceptible de ser hidrolizado por sPLA2, productos hidrolíticos los cuales se pueden cuantificar directa o indirectamente, tal como 1-pirenedocanoilo,
- 60 - una muestra de actividad de sPLA2 de control.
14. El uso de un equipo de acuerdo con la reivindicación 11 o 13, en donde los medios para medir OxPL/apoB son
- 65 - un anticuerpo que interactúa específicamente con OxPL tal como por ejemplo E06, T15 o DLH3 y

-un anticuerpo que interactúa específicamente con apoB tal como por ejemplo MB47

- una muestra OxPL de control.

- 5 15. El uso de un equipo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde dicho equipo comprende adicionalmente medios para medir por lo menos un factor de riesgo cardiovascular seleccionado del grupo de Clasificación de Riesgo Framingham (FRS), CRP, IgM IC de apoB 100 o IgM MDA-LDL, Lp-PLA2 y masa de sPLA2.

10

| Características iniciales | Hombre y mujer | | |
|--|------------------|------------------|------------|
| | 1764 | 769 | |
| n | | | |
| sexo masculino | 61.6 (1086) | 62.8 (483) | Emparejado |
| Edad, años | 65 ± 7 | 65 ± 7 | Emparejado |
| Índice de masa corporal, kg/m ² | 26.2 ± 3.5 | 27.2 ± 3.8 | < 0.001 |
| Cintura, cm | 91 ± 11 | 94 ± 12 | < 0.001 |
| Diabetes mellitus | 1.8 (31) | 6.1 (470) | < 0.001 |
| Tabaquismo actualmente | 8.6 (151) | 15.2 (117) | |
| - anteriormente | 51.1 (901) | 51.9 (399) | < 0.001 |
| - nunca | 40.4 (712) | 32.9 (253) | |
| Presión arterial sistólica, mmHg | 139 ± 18 | 143 ± 19 | < 0.001 |
| Presión arterial diastólica, mmHg | 83 ± 11 | 86 ± 12 | < 0.001 |
| Colesterol total, mmol/l | 6.3 ± 1.1 | 6.5 ± 1.2 | < 0.001 |
| LDL-Colesterol, mmol/l | 4.1 ± 1.0 | 4.3 ± 1.1 | < 0.001 |
| HDL-Colesterol, mmol/l | 1.4 ± 0.4 | 1.3 ± 0.4 | < 0.001 |
| Triglicéridos, mmol/l | 1.6 (1.2-2.2) | 1.9 (1.4-2.6) | < 0.001 |
| Apolipoproteína A-I mg/dl | 163 ± 29 | 155 ± 29 | < 0.001 |
| Apolipoproteína B, mg/dl | 128 ± 30 | 136 ± 31 | < 0.001 |
| Proteína reactiva C | 1.5 (0.7-3.1) | 2.2 (1.0-4.9) | < 0.001 |
| Mieloperoxidasa | 521 (338-837) | 551 (352-874) | 0.07 |
| sPLA2 | 10.6 ± 8.4 | 12.4 ± 10.6 | < 0.001 |
| Actividad de sPLA2 | 4.5 ± 1.2 | 4.8 ± 1.5 | < 0.001 |
| Actividad de Lp-PLA2 | 51 ± 16 | 53 ± 16 | 0.002 |
| OxPL/apoB | 1667 (1141-2647) | 1899 (1242-3250) | < 0.001 |

Figura 1

| | | OR's no ajustado | | |
|-----------------------|----|--------------------------------|------------------|------------------|
| | | Terciles de Lp-PLA2 | | |
| | | T1 | T2 | T3 |
| Terciles de OxPL/apoB | T1 | 1.00 | 1.26 (0.84-1.90) | 1.53 (1.03-2.28) |
| | T2 | 1.13 (0.75-1.69) | 1.79 (1.20-2.66) | 1.72 (1.16-2.55) |
| | T3 | 1.75 (1.18-2.59) | 2.08 (1.40-3.08) | 2.22 (1.51-3.27) |
| | | Terciles de actividad de sPLA2 | | |
| | | T1 | T2 | T3 |
| Terciles de OxPL/apoB | T1 | 1.00 | 1.44 (0.94-2.23) | 2.87 (1.91-4.32) |
| | T2 | 1.35 (0.87-2.08) | 2.26 (1.48-3.45) | 2.67 (1.78-3.99) |
| | T3 | 1.99 (1.31-3.02) | 2.40 (1.60-3.60) | 4.34 (2.84-6.64) |

Figura 2

OR's ajustado para Clasificación de Riesgo Framingham

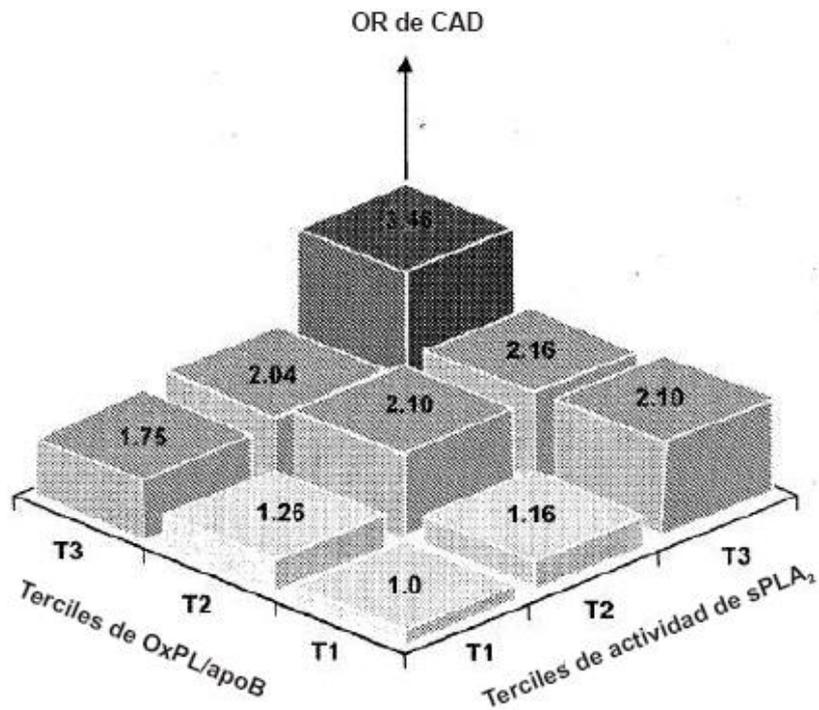
| | | Terciles de Lp-PLA2 | | |
|-----------------------|----|---------------------|------------------|------------------|
| | | T1 | T2 | T3 |
| Terciles de OxPL/apoB | T1 | 1,00 | 1.08 (0.71-1.63) | 1.22 (0.81-1.86) |
| | T2 | 1.09 (0.72-1.66) | 1.64 (1.09-2.47) | 1.50 (1.00-2.25) |
| | T3 | 1.66 (1.10-2.50) | 1.93 (1.29-2.90) | 1.86 (1.25-2.79) |

| | | Terciles de actividad de sPLA2 | | |
|-----------------------|----|--------------------------------|------------------|------------------|
| | | T1 | T2 | T3 |
| Terciles de OxPL/apoB | T1 | 1,00 | 1.30 (0.84-2.01) | 2.32 (1.53-3.53) |
| | T2 | 1.33 (0.86-2.07) | 2.16 (1.41-3.31) | 2.27 (1.51-3.42) |
| | T3 | 1.93 (1.27-2.96) | 2.21 (1.46-3.35) | 3.67 (2.38-5.65) |

Figura 3

| | Área bajo ROC (95% CI) |
|------------------------------------|------------------------|
| FRS | 0.587 (0.562-0.611) |
| FRS, oxPL | 0.599 (0.576-0.624) |
| FRS, actividad de Lp-PLA2 | 0.589 (0.565-0.613) |
| FRS, oxPL, actividad de Lp-PLA2 | 0.602 (0.579-0.626) |
| FRS, actividad de sPLA2 | 0.619 (0.596-0.643) |
| FRS, oxPL, actividad de sPLA2 | 0.627 (0.604-0.651) |
| FRS, oxPL, actividad de sPLA2, CRP | 0.636 (0.612-0.661) |

Figura 4

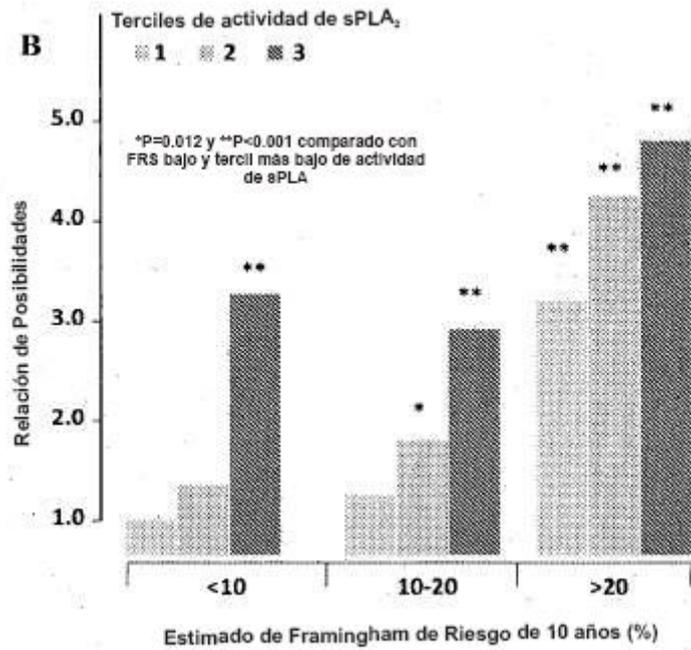
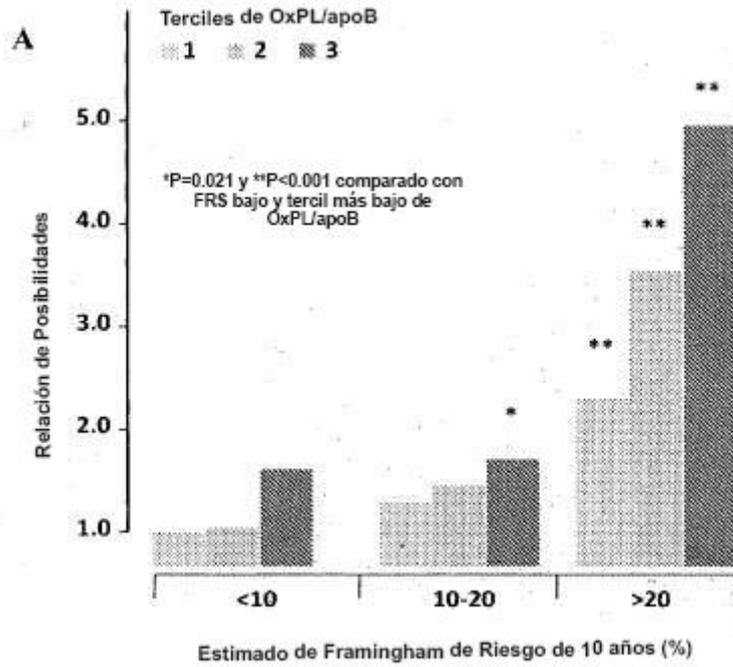


| | | OxPL/apoB | | |
|----------------------------------|----|------------------|------------------|------------------|
| | | T1 | T2 | T3 |
| Actividad de sPLA ₂ | T1 | 1.00 | 1.26 (0.81-1.98) | 1.75 (1.14-2.70) |
| | T2 | 1.16 (0.74-1.80) | 2.10 (1.36-3.25) | 2.04 (1.33-3.13) |
| | T3 | 2.10 (1.36-3.25) | 2.06 (1.36-3.13) | 3.46 (2.22-5.42) |
| masa de sPLA ₂ | T1 | 1.00 | 1.08 (0.69-1.67) | 1.69 (1.10-2.59) |
| | T2 | 1.18 (0.77-1.79) | 1.63 (1.07-2.47) | 1.81 (1.20-2.74) |
| | T3 | 1.47 (0.96-2.27) | 1.96 (1.30-2.96) | 2.39 (1.58-3.61) |
| Actividad de Lp-PLA ₂ | T1 | 1.00 | 1.09 (0.71-1.68) | 1.60 (1.04-2.45) |
| | T2 | 0.95 (0.61-1.47) | 1.70 (1.11-2.61) | 1.83 (1.19-2.81) |
| | T3 | 1.13 (0.72-1.77) | 1.28 (0.82-1.97) | 1.66 (1.08-2.56) |

Figura 5

| | Área bajo ROC (95% CI) |
|---|----------------------------|
| FRS | 0.584 (0.559-0.610) |
| FRS, OxPL/apoB | 0.597 (0.572-0.623) |
| FRS, Lp-PLA2 | 0.587 (0.562-0.613) |
| FRS, CRP | 0.605 (0.580-0.630) |
| FRS, masa de sPLA2 | 0.609 (0.584-0.634) |
| FRS, actividad de sPLA2 | 0.618 (0.593-0.642) |
| FRS, OxPL/apoB, Lp-PLA2 | 0.601 (0.575-0.626) |
| FRS, OxPL/apoB, actividad de sPLA2 | 0.626 (0.601-0.651) |
| FRS, OxPL/apoB, masa de sPLA2 | 0.619 (0.594-0.644) |
| FRS, OxPL/apoB, CRP | 0.613 (0.588-0.638) |
| FRS, OxPL/apoB, actividad de sPLA2, Lp-PLA2 | 0.627 (0.606-0.652) |
| FRS, OxPL/apoB, actividad de sPLA2, CRP | 0.636 (0.612-0.660) |
| FRS, OxPL/apoB, actividad de sPLA2, masa de sPLA2 | 0.637 (0.613-0.662) |

Figura 6



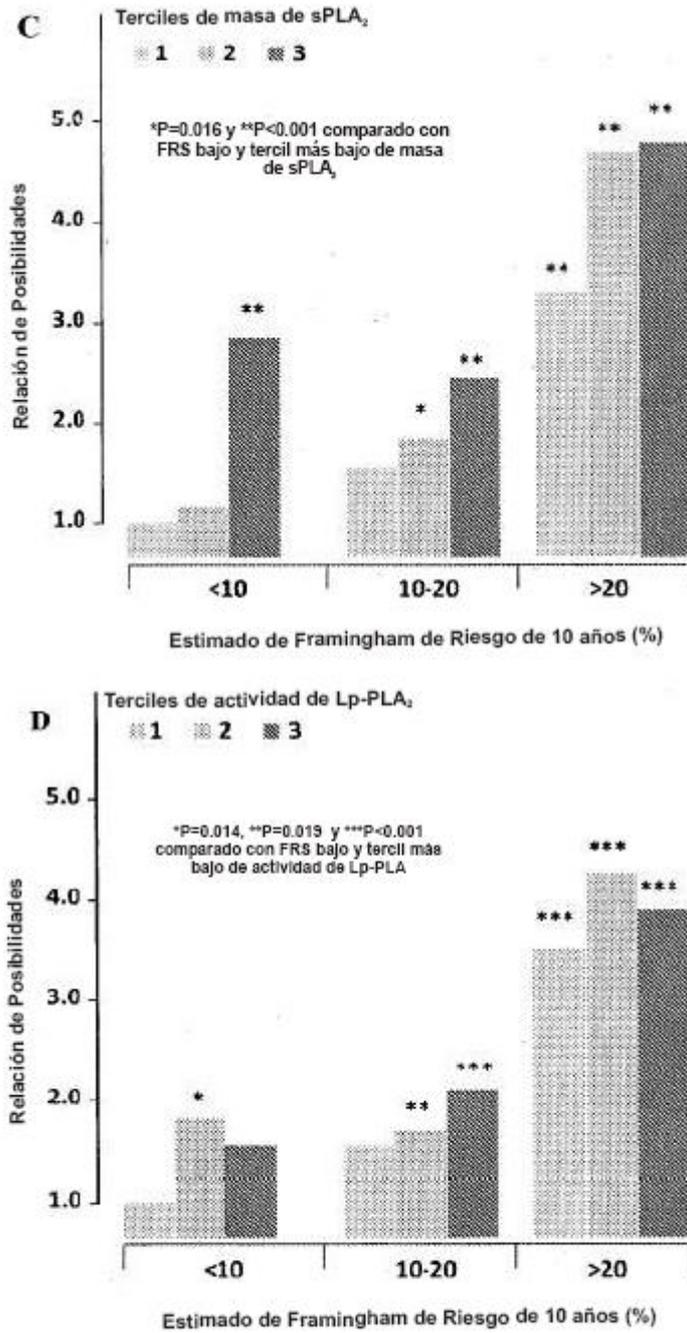


Figura 7