

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 760**

51 Int. Cl.:

G01N 33/92 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.08.2011 PCT/US2011/048733**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.03.2012 WO12027318**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.08.2011 E 11785815 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 2609432**

54 Título: **Ensayo para la determinación de niveles de partículas de lipoproteína en fluidos corporales**

30 Prioridad:

08.09.2010 US 877733
24.08.2010 US 861829

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.09.2017

73 Titular/es:

HELENA LABORATORIES CORPORATION
(100.0%)
1530 Lindbergh Drive
BeaumontTexas 77704, US

72 Inventor/es:

GUADAGNO, PHILIP;
HICKS, DEBRA LINN y
MCCONNELL, JOSEPH PAUL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 632 760 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

Ensayo para la determinación de niveles de partículas de lipoproteína en fluidos corporales

Campo técnico

5 Un conjunto, método, sistema y aparato para determinar los niveles de sustancias en fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial o fluido ascítico. Específicamente, los niveles determinados pueden usarse para predecir el riesgo de desarrollar diversas enfermedades relacionadas con las partículas de lipoproteínas y para monitorizar los cambios fisiológicos, las rutinas de tratamiento y los efectos farmacéuticos.

Antecedentes de la invención

10 La función de las partículas de lipoproteínas es el transporte de lípidos insolubles en agua a través del torrente sanguíneo a diversas ubicaciones en el cuerpo. Las partículas de lipoproteínas contienen proteínas y lípidos. Una partícula de lipoproteína incluye colesterol esterificado y libre, triacilglicerol (triglicérido), fosfolípidos y apolipoproteínas. El colesterol (esterificado y libre) y los triglicéridos son los dos componentes principales encontrados en las partículas de lipoproteínas. El colesterol es un metabolito esteroide que se utiliza en las membranas de las células animales. Los triglicéridos son ésteres que están hechos de glicerol y tres ácidos grasos.

15 Los fosfolípidos son una parte importante de las membranas celulares. Las apolipoproteínas identifican los diferentes tipos de partículas de lipoproteínas mientras que otras proporcionan ligandos enzimáticos para facilitar el proceso de equilibrio bioquímico de los lípidos y la función celular. Los componentes hidrófilos de las partículas de lipoproteínas se encuentran en el exterior de la partícula de lipoproteína. Los componentes hidrófilos incluyen al menos porciones de apolipoproteínas, fosfolípidos y colesterol. Los componentes hidrófobos se encuentran en el interior de la partícula de lipoproteína e incluyen triglicéridos y ésteres de colesterol.

20 Existen varios tipos de partículas de lipoproteínas que incluyen partículas de lipoproteínas de alta densidad (HDL-P), partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL-P), partículas de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-P), partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P), partículas de quilomicrones (CM-P) y partículas de lipoproteína (a) (Lp(a)-P). Las VLDL-P hidrolizadas se denominan lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-P).

25 Cada uno varía en tamaño, densidad, proteína y composición lipídica.

Las clases y subclases de apolipoproteínas son la apolipoproteína A (Apo A-I, Apo A-II, Apo A-IV y Apo A-V), apolipoproteína B (Apo B-48 y Apo B-100), apolipoproteína C (Apo C-I, Apo C-II, Apo C-III y Apo C-IV), apolipoproteína D, apolipoproteína E (Apo E-2, E-3 y E-4) y apolipoproteína H.

30 Diferentes partículas de lipoproteínas tienen diferentes apolipoproteínas en la superficie. Las apolipoproteínas presentes en HDL-P son Apo A-I, A-II, A-IV, A-V, C-I, C-II, C-III, D, E-2, E-3 y E-4. La apolipoproteína en LDL-P es Apo B-100. Las apolipoproteínas en IDL-P son Apo B-100, C, E-2, E-3 y E-4. Las apolipoproteínas en VLDL-P son Apo A-V, B-100, C-I, C-II, C-III, C-IV, E-2, E-3 y E-4. Las apolipoproteínas en quilomicrones son Apo A-I, A-II, A-IV, B-48, C-I, C-II, C-III y E-2, E-3 y E-4.

35 Una partícula de lipoproteína(a) (Lp(a)-P) es una partícula de tipo LDL con la apolipoproteína A unida a la apolipoproteína B por un enlace disulfuro. La Lp(a)-P se compone de Apo B en la superficie de la partícula de tipo LDL. Los niveles más altos de Lp(a)-P están relacionados con un mayor riesgo de enfermedad coronaria.

40 La separación de partículas de lipoproteínas en fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial o fluido ascítico proporciona información sobre los niveles de varias partículas de lipoproteínas. Varios estados patológicos están relacionados con los niveles de apolipoproteínas y/o partículas de lipoproteínas incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad cardiovascular, enfermedad de Alzheimer, hiperlipidemia, abetalipoproteinemia, hipotiroidismo, enfermedad hepática, diabetes mellitus y problemas renales. Los niveles más altos de las partículas de apolipoproteína B y LDL se han asociado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Se ha descrito que las diferencias en la cantidad de colesterol en una partícula también pueden jugar un papel en el riesgo de la enfermedad cardiovascular. Las pequeñas LDL-P densas, que tienen más éster de colesterol, parecen estar correlacionadas con un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, los niveles aumentados de HDL-P se correlacionan con una disminución en el riesgo de la enfermedad cardiovascular.

45 Un ensayo de un solo tipo de partícula de lipoproteína puede no ser suficiente para determinar con precisión si un individuo está en riesgo de una enfermedad porque determinar la cantidad total de una lipoproteína o apolipoproteína no indica con qué componentes está asociado. Por ejemplo, una apolipoproteína particular unida a una lipoproteína particular puede no ser indicativa de un riesgo para desarrollar una enfermedad mientras que la misma apolipoproteína unida a una lipoproteína diferente puede indicar que el individuo está en riesgo para esa enfermedad.

50 Por lo tanto, la medición de los niveles de diversas partículas de lipoproteínas en fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial o ascitis utilizando la combinación de detección inmunológica y separación de lipoproteínas simultáneamente en la misma matriz es un mejor indicador del riesgo de varios estados patológicos.

Se necesitan pronósticos exactos del riesgo de que un individuo desarrolle diversas enfermedades relacionadas con las partículas de lipoproteínas para fines de investigación, diagnósticos y terapéuticos.

Sumario

5 Una realización es un conjunto para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en un fluido corporal que comprende: un sustrato que recibe una muestra de fluido corporal; un anticuerpo que detecta un agente inmunológicamente activo asociado con las partículas de lipoproteínas o componentes de partículas de lipoproteínas; un reactivo aplicado al sustrato para la detección de la presencia de proteínas o lípidos; y mientras que una señal indica la presencia de partículas de lipoproteínas específicas. Una realización, que comprende además un dispositivo para detectar una señal utilizada para cuantificar el nivel de dichas partículas de lipoproteínas específicas. En una realización, dicho sustrato es un gel para la electroforesis en gel. En una realización, el agente inmunológicamente activo detectado se selecciona del grupo que consiste en apolipoproteína A, apolipoproteína B, apolipoproteína C, apolipoproteína D, apolipoproteína E, apolipoproteína H, lipoproteína (a), lipoproteína de alta densidad, lipoproteína de densidad intermedia, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de muy baja densidad, y mezclas de los mismos. En una realización, dicho conjunto comprende además un procesador para cuantificar el nivel de partículas de lipoproteínas. En una realización, un nivel elevado de apolipoproteína B y partículas de lipoproteína de baja densidad significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular. En otra realización, un nivel elevado de partículas de apolipoproteína B y lipoproteína (a) significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular. En otra realización, un nivel elevado de partículas de lipoproteína B y de lipoproteína de baja densidad y partículas de lipoproteína (a) elevadas, significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular.

Una realización es un método para evaluar el nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en un fluido corporal que comprende: separar las partículas de lipoproteína presentes en una muestra de fluido corporal en un sustrato; exponer el sustrato a un anticuerpo para detectar un agente inmunológicamente activo asociado con partículas de lipoproteínas o componentes de partículas de lipoproteínas; exponer el sustrato a un reactivo para la detección de la presencia de proteínas o lípidos; determinar el nivel de partículas de lipoproteínas específicas. En una realización, la separación se produce mediante electroforesis en gel y el sustrato es un gel. Una realización comprende además la determinación de la densidad óptica de una señal sobre el sustrato que indica el nivel de una partícula de lipoproteína específica. Otra realización comprende además la detección visual de una señal en el sustrato que indica el nivel de una partícula de lipoproteína específica. En una realización, el agente inmunológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en apolipoproteína A, apolipoproteína B, apolipoproteína C, apolipoproteína D, apolipoproteína E, apolipoproteína H, lipoproteína (a), lipoproteína de alta densidad, lipoproteína de densidad intermedia, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de muy baja densidad, y mezclas de los mismos. En una realización, el componente es la apolipoproteína B.

Una realización es un sistema para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en un fluido corporal que comprende: un aparato de separación para separar las partículas de lipoproteínas presentes en una muestra de fluido corporal; un anticuerpo para detectar un agente inmunológicamente activo asociado con las partículas de lipoproteínas o componentes de partículas de lipoproteínas; y un reactivo aplicado al sustrato para la detección de la presencia de las partículas de lipoproteínas. En una realización, el aparato de separación es un aparato electroforético. En una realización, un patrón electroforético de la muestra de fluido corporal se detecta visualmente. Una realización comprende además un densitómetro para determinar la densidad óptica de un patrón electroforético de la muestra de fluido corporal para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas. Una realización que comprende además un procesador para cuantificar el nivel de partículas de lipoproteínas. En una realización, el agente inmunológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en apolipoproteína A, apolipoproteína B; apolipoproteína C; apolipoproteína D; apolipoproteína E; apolipoproteína H; lipoproteína (a), lipoproteína de alta densidad, lipoproteína de densidad intermedia, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de muy baja densidad, y mezclas de los mismos. En una realización, el componente es la apolipoproteína B.

Una realización es un aparato para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en un fluido corporal que comprende: un aparato de separación para separar las partículas de lipoproteínas presentes en una muestra de fluido corporal sobre un gel; un densitómetro para determinar la densidad óptica de un patrón electroforético de la muestra de fluido corporal para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas; y un procesador para correlacionar el nivel de dicha densidad óptica del patrón electroforético de la muestra de fluido corporal para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas. En una realización, el aparato de separación es un aparato electroforético.

Breve descripción de los dibujos

55 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente descripción. La descripción puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de las realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

La figura 1 muestra un diagrama del metabolismo de las partículas de lipoproteínas.

La Fig. 2 muestra un gel sondado para detectar la presencia de Apo-AI, Apo-AII y Apo-B y teñido para detectar la presencia de partículas de lipoproteína.

5 La Figura 3 representa un gel que contiene muestras de múltiples pacientes, sondadas para detectar la presencia de Apo-B y teñidas para detectar la presencia de partículas de lipoproteína. Los marcadores presentes en los carriles indican el número del paciente.

La figura 4 representa una exploración densitométrica de las bandas presentes en el carril para el paciente 1 (marcado con 1) en el gel representado en la Fig. 3. Los valores de fracciones representan el porcentaje del área del pico. La Figura 4 ilustra dos bandas en el área de donde migra Lp(a)-P, una de las cuales emigra conjuntamente con HDL-P. (Marcadores de fracciones: Lp(a)-PI, Lp(a)-P2, VLDL-P, LDL-P)

10 La figura 5 representa una exploración densitométrica de las bandas presentes en el carril para el paciente 2 (marcado con 2) en el gel representado en la Fig. 3. Los valores de fracciones representan el porcentaje del área del pico. (Marcadores de fracciones: Lp(a)-PI, Lp(a)-P2, VLDL-P, LDL-P)

15 La figura 6 representa una exploración densitométrica de las bandas presentes en el carril para el paciente 10 (marcado con 10) en el gel representado en la Fig. 3. Los valores de fracciones representan el porcentaje del área del pico. (Marcadores de fracciones: Lp(a)-PI, Lp(a)-P2, LDL-P)

La Fig. 7 representa una exploración densitométrica de las bandas presentes en el carril para el paciente 12 (marcado con 12) en el gel representado en la Fig. 3. Los valores de fracciones representan el porcentaje del área del pico. (Marcadores de fracciones: Lp(a)-PI, Lp(a)-P2, VLDL-P, LDL-P)

Descripción detallada

20 La presente invención se refiere a un conjunto, método, sistema y aparato para la determinación integrada de niveles de apolipoproteínas, partículas de lipoproteínas, proteínas y lípidos en fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial y fluido ascítico como un indicador del número de partículas de lipoproteínas. Estos niveles pueden usarse como predictores del riesgo de desarrollar diversas enfermedades relacionadas con el número de partículas de las lipoproteínas. Además, se exponen numerosos detalles específicos con el fin de proporcionar una comprensión completa de las realizaciones ejemplares descritas en la presente memoria. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que las realizaciones ejemplares descritas en la presente memoria se pueden practicar sin estos detalles específicos. En otros casos, los métodos, procedimientos y componentes no se han descrito en detalle para no oscurecer las realizaciones descritas en la presente memoria.

30 Las siguientes definiciones y explicaciones están destinadas a ser controladas en cualquier construcción futura, a menos que sean claramente y sin ambigüedades modificadas en la siguiente descripción o cuando la aplicación del significado haga que cualquier construcción carezca de sentido o que esencialmente carezca de sentido. La definición debe tomarse del Webster's Dictionary, 3ª Edición. Las definiciones y/o interpretaciones no deben ser incorporadas de otras solicitudes de patentes, patentes o publicaciones, relacionadas o no, a menos que se indique específicamente en esta memoria descriptiva o si la incorporación es necesaria para mantener la validez.

35 La expresión "partícula de lipoproteína", tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una partícula que contiene proteínas y lípidos.

La expresión "número de partículas de lipoproteína" se refiere al número de partículas de lipoproteínas presentes en el fluido corporal.

40 El término "apolipoproteína", como se usa en este documento, se refiere a una proteína que se combina con lípidos para formar una partícula de lipoproteína. La naturaleza única de la apolipoproteína es su relación estequiométrica con las partículas de lipoproteínas, proporcionando una estimación del número de partículas de la lipoproteína.

La expresión "partícula de lipoproteína (a)" también denominada lipoproteína 'a' pequeña y designada como (Lp(a)-P), como se usa en la presente memoria, se refiere a una partícula de tipo LDL con apolipoproteína(a) unida a la apolipoproteína B por un enlace disulfuro.

45 Las expresiones enfermedad cardiovascular (ECV), enfermedad arterial coronaria (CAD) y enfermedad coronaria (CHD) se usan indistintamente en el presente documento.

50 Se describe un conjunto, método, aparato y sistema para separar y ensayar partículas de lipoproteínas y apolipoproteínas. El conjunto, método, aparato y sistema se usan para determinar qué individuos tienen un riesgo más alto de padecer un estado de enfermedad dado por el nivel de partículas de lipoproteínas comprendidas de diversas partículas de lipoproteínas y apolipoproteínas. La presencia de colesterol, fosfolípidos y triglicéridos como parte de una partícula de lipoproteína dada también es detectable.

Se describe un conjunto, método, aparato y sistema que permite que las separaciones de partículas de lipoproteínas de carga/tamaño simultáneas, modificables, sean probadas inmunológicamente para varias apolipoproteínas. El conjunto, método, aparato y sistema proporcionan un método mejorado para la medición directa de partículas de

lipoproteínas. Se sabe que los niveles elevados de partículas de Apo B, Lp(a)-P y LDL-P se correlacionan con el aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular.

5 Hay muchas variaciones que pueden mejorar la separación y la detección. Sin embargo, la combinación de separación electroforética y detección inmunológica ofrece información clínica hasta ahora no disponible para la evaluación del riesgo de enfermedad, incluida la enfermedad cardiovascular.

10 Una ventaja de los presentes sistemas, métodos, ensamblajes y aparatos son que la separación de partículas de lipoproteína y la detección integrada de componentes y el inmuno-reconocimiento están disponibles simultáneamente en el mismo gel, proporcionando la capacidad de distinguir en qué cantidad de las lipoproteínas u otros componentes incluyendo, pero no limitados a, triglicéridos, fosfolípidos y colesterol están unidos a qué cantidades de ciertas partículas de lipoproteínas. Es beneficioso no tener que usar múltiples geles, múltiples instrumentos y/o múltiples métodos para detectar esta información. Las razones para detectar esta información simultáneamente son que se produce un sesgo cuando se utilizan geles, múltiples instrumentos y/o múltiples métodos. La detección simultánea elimina esta fuente de variabilidad.

Metabolismo de los lípidos

15 Los ácidos grasos, el colesterol, los monoacilglicérols y los ácidos biliares se absorben en el intestino. Los ácidos biliares se encuentran en la bilis intestinal y ayudan en la digestión de las grasas mediante la formación de micelas para emulsionar las grasas. Los ácidos biliares se almacenan en la vesícula biliar hasta que se secretan en el intestino después de comer. Las células epiteliales intestinales sintetizan triacilglicérols. Una porción del colesterol se esterifica para formar ésteres de colesterol. Las células intestinales forman quilomicrones de triacilglicérols, ésteres de colesterol, fosfolípidos, colesterol libre y apolipoproteínas.

Apolipoproteínas

25 Las apolipoproteínas son el componente proteico de las partículas de lipoproteínas. Las apolipoproteínas recubren las partículas de lipoproteínas que incluyen ésteres de colesterol y triacilglicéridos. La capa de la partícula de lipoproteína está formada por colesterol no esterificado, fosfolípidos y apolipoproteínas. La naturaleza única de la apolipoproteína es su relación estequiométrica con las partículas de lipoproteínas, proporcionando una estimación del número de partículas de la lipoproteína. Estas partículas de lipoproteínas proporcionan una forma de hacer circular los componentes hidrófobos a través del torrente sanguíneo. Diferentes partículas de lipoproteínas incluyen quilomicro-P, VLDL-P, IDL-P, LDL-P y HDL-P. Las partículas de lipoproteína varían en tamaño, densidad, composición de apolipoproteínas y composición lipídica. Hay heterogeneidad dentro de cada clase, compartiendo cada clase características físicas similares. Variando las condiciones, es posible visualizar diferentes partículas dentro de una clase. Hay mérito clínico al hacerlo porque, por ejemplo, una clase puede ser aterogénica y una clase puede ser ateroprotectora. La Figura 1 ilustra un diagrama del metabolismo de partículas de lipoproteínas.

35 La familia de la apolipoproteína A (Apo A) constituye las principales proteínas encontradas en HDL-P y partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos. La Apo A, como parte del HDL-P, participa en la eliminación del colesterol libre de los tejidos extrahepáticos y también desempeña un papel en la activación de la lecitina aciltransferasa. La apolipoproteína A activa las enzimas que conducen la transferencia de colesterol de los tejidos a HDL-P y también está implicada en el reconocimiento del HDL-P y en los receptores que se unen en el hígado.

40 Existen múltiples formas de la apolipoproteína A. Las formas más comunes son Apo A-I y Apo A-II. La apolipoproteína A (A-I, A-II y A-IV) se encuentra en los quilomicrones y HDL-P. La Apo A-I es la apolipoproteína A principal unida a HDL-P. La Apo A-I es responsable de activar la lecitina-colesterol aciltransferasa y la Apo A-II modula esa activación. La lecitina-colesterol aciltransferasa convierte el colesterol libre en un éster de colesterol. Las secreciones de Apo A-IV aumentan cuando la grasa se absorbe en los intestinos. La Apo A-IV también puede funcionar en la activación de lecitina-colesterol aciltransferasa.

45 La Apo A-I se encuentra en mayor proporción que la Apo A-II (aproximadamente 3 a 1). Los niveles más bajos de Apo A comúnmente se correlacionan con la presencia de la enfermedad cardiovascular (ECV) y la enfermedad vascular periférica. La Apo A-I puede ser un mejor predictor del riesgo aterogénico que el HDL-colesterol (HDL-C). Ciertos trastornos genéticos causan deficiencias de Apo A-I y niveles bajos asociados de partículas de HDL. Estos pacientes también tienden a tener hiperlipidemia con partículas elevadas de LDL. Esto contribuye a acelerar las tasas de aterosclerosis. Los niveles de Apo A pueden ser extremadamente bajos en la anafalipoproteinemia (también conocida como deficiencia familiar de lipoproteína de alta densidad).

55 El papel del HDL y su apolipoproteína Apo A-I principal en el flujo de colesterol de los macrófagos ha sido estudiado extensivamente. Mientras que HDL-P compite por la unión de Apo A-I, la Apo A-I no es un competidor para la unión de HDL-P. Esta observación sugiere que HDL-P y Apo A-I se unen a macrófagos al menos en parte por receptores distintos. Por ejemplo, el pre-β-HDL-P y el Apo A-I sin lípidos son ligandos pobres para el receptor secuestrante (SR-BI), lo que explica la falta de competencia de la unión de HDL-P por Apo A-I. Por el contrario, se ha demostrado que Apo A-I puede disociarse de HDL-P, de modo que la Apo A-I libre de lípidos podría estar disponible para la competencia del sitio de unión de Apo A-I por HDL. Lorenzi I, et al., *BIJ Mol Med*. 2008; 86: 171 -

183. Apo A-II, otro componente de HDL, ha demostrado ser pro-aterogénico en modelos animales. Meyers CD y Kashyap ML., *Curr Opin Cardiol.* 2004; 19 (4): 366 - 373.

La apolipoproteína B (Apo B-100 y Apo B-48) es el componente proteico de la LDL-P. Una molécula de Apo B está presente en la capa de fosfolípidos de cada LDL-P. Más del 90% de la partícula de LDL se compone de Apo B. La Apo B funciona para solubilizar el colesterol dentro del complejo de LDL-P, lo que a su vez aumenta la capacidad de transporte de LDL-P para el posterior depósito del colesterol LDL-P en la pared arterial. El depósito contribuye a las enfermedades cardiovasculares. La Apo B es también un componente proteico de los quilomicrones, VLDL-P, IDL-P y Lp(a)-P. La Apo B es una glicoproteína helicoidal anfipática grande con 2 isoformas: Apo B-100 (sintetizada en los hepatocitos) y Apo B-48 (la proteína estructural de los quilomicrones). Los quilomicrones contienen Apo B-48 mientras que otras partículas de lipoproteínas que contienen Apo B contienen Apo B-100.

La Apo B modula la actividad de enzimas que actúan sobre las partículas de lipoproteínas, mantiene la integridad estructural del complejo de partículas de lipoproteínas y facilita la captación de partículas de lipoproteínas actuando como ligandos para receptores específicos de la superficie celular. Las enzimas que actúan sobre las partículas de lipoproteínas incluyen, pero no se limitan a lipoproteína lipasa, lecitina-colesterol aciltransferasa, lipasa hepática-triglicérida y proteína de transferencia de éster de colesterol. Los niveles elevados de Apo B se encuentran en la hiperlipoproteinemia. La Apo B-100 está ausente en formas de abetalipoproteinemia. Los niveles altos de Apo B-100 pueden estar presentes en la hiperlipoproteinemia, angina aguda e infarto de miocardio. La Apo B-48 permanece en el intestino en la enfermedad de retención del quilomicrón.

Está bien establecido que el aumento de la concentración plasmática de partículas de lipoproteínas que contienen Apo B se asocia con un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad aterosclerótica. Los estudios de control de casos han encontrado que las concentraciones plasmáticas de Apo B son más discriminantes que otros lípidos plasmáticos y partículas de lipoproteínas en la identificación de pacientes con enfermedad coronaria (CHD). Walldius G, y col., *Eur Heart J.* 2003; 24: 1601 - 10; Walldius G y Jungner I. *J Intern Med.* 2004;255/2: 188 - 205; Walldius G, et al., *J Intern Med.* 2006; 259-66; Yusuf S, et al. *Lancet.* 2004; 364: 937-52. La utilidad de la Apo B en la determinación del riesgo de la cardiopatía coronaria ha sido confirmada por estudios prospectivos, aunque el grado en que las concentraciones de Apo B fueron mejores que los lípidos séricos en la predicción del riesgo fue variable. La Apo B es un componente de todas las partículas aterogénicas o potencialmente aterogénicas, incluyendo las partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P), partículas de lipoproteínas de densidad intermedia (IDL-P), partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL-P) y partículas de lipoproteína (a) (Lp(a)-P) y cada partícula contiene una molécula de Apo B. El riesgo de un individuo de desarrollar CVD es proporcional a la distribución y tipo de partículas de las lipoproteínas del individuo. Sin embargo, las partículas lipoproteicas que contienen Apo-B aterogénicas son diferencialmente aterogénicas. Aunque la Apo B proporciona una medida directa del número de partículas de lipoproteínas aterogénicas en la circulación, el mérito clínico óptimo se logra sólo cuando se usan las mediciones de Apo-B para cuantificar la distribución y el tipo de partículas de lipoproteína presentes. La evaluación del riesgo de ECV en relación con la Apo B total se verá influenciada por su presencia en las diversas partículas anteriores. Medir el Apo B total solo sin separar las partículas no indica con qué partícula se asocia.

Ahora existe un claro consenso de que la Apo B es más fuertemente predictiva de la enfermedad cardiovascular (CVD) que el colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL-C) y un reciente informe de la American Diabetes Association (ADA) y la American College of Cardiology ACC) reconoce la importancia de la medición de Apo B. Kannel WB, et al., *Ann Intern Med* 1979; 90: 85-91 y Jeyarajah, EJ, et al., *Clin Lab Med* 2006; 26: 847-70. En una realización, un nivel elevado de Apo B y LDL-P significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular. En una realización, un nivel elevado de Apo B, LDL-P y Lp(a)-P significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular.

La apolipoproteína C (Apo C-I, C-II, C-III) es un componente de las partículas de quilomicrones, partículas de VLDL, partículas de IDL y partículas de HDL. La Apo C-II es un activador de la lipoproteína lipasa y su deficiencia resulta en una acumulación de quilomicrones y triacilglicerolos. Los niveles altos de Apo C-II son indicadores de angina e infarto de miocardio. La apolipoproteína C-II (Apo C-II) es un tipo específico de proteína que se encuentra en partículas grandes absorbidas por el tracto gastrointestinal. También se encuentra en partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P) que se compone principalmente de colesterol. La Apo C-II es una apolipoproteína responsable de la activación de la lipoproteína lipasa (LPL) en los capilares y así comienza el catabolismo de las partículas de quilomicrón y VLDL-P. También se encuentra en HDL-P. Los déficits de esta Apo C-II presentan hipertrigliceridemia grave e hiperquilomicronemia durante el ayuno.

Las mediciones de Apo C-II pueden ayudar a determinar el tipo específico o la causa de los lípidos sanguíneos altos (hiperlipidemia). Las personas con deficiencia familiar de lipoproteína lipasa pueden tener altas cantidades de Apo C-II. Otros trastornos que pueden estar asociados con los altos niveles de Apo C-II incluyen la angina de pecho y el ataque al corazón. Los niveles bajos de Apo C-II se observan en personas con una enfermedad rara llamada deficiencia familiar de Apo C-II.

La apolipoproteína C-III (Apo C-III) se encuentra en las partículas de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL-P). La Apo C-III inhibe la lipoproteína lipasa y la lipasa hepática y se cree que inhibe la absorción hepática de las partículas ricas en triglicéridos. La Apo C-IV se encuentra en al menos VLDL-P y HDL-P.

Los genes Apo A-I, Apo C-III y Apo A-IV están estrechamente relacionados tanto en los genomas de rata como en los humanos. Los genes A-I y A-IV se transcriben a partir de la misma cadena, mientras que los genes A-I y C-III se transcriben de forma convergente. Un aumento en los niveles de Apo C-III induce el desarrollo de la hipertrigliceridemia.

- 5 La apolipoproteína D es un componente menor de la HDL-P. Las altas concentraciones de Apo D se correlacionan con diversas enfermedades tales como la enfermedad quística macroscópica de la mama y la enfermedad de Alzheimer.

10 La apolipoproteína E (Apo E-2, E-3 y E-4) se encuentra en los quilomicrones e IDL-P. La Apo E se une a un receptor en los hepatocitos y las células periféricas. La Apo E es esencial para el catabolismo normal de los constituyentes de partículas de lipoproteínas ricas en triglicéridos. La Apo E fue inicialmente reconocida por su importancia en el metabolismo de las partículas de lipoproteínas y las enfermedades cardiovasculares. Desempeña un papel en el transporte de los lípidos a los tejidos, el transporte del colesterol de los órganos al hígado, el metabolismo de las partículas de lipoproteínas mediante el aclaramiento de VLDL-P y los quilomicrones y la formación de lesiones ateroscleróticas. La porción de Apo E de las partículas de lipoproteína media la unión de las partículas de lipoproteína Apo E al receptor de LDL-P. La Apo E unida a HDL-P inhibe la agregación plaquetaria inducida por agonistas por la unión a sitios en las plaquetas. Existen tres alelos diferentes del gen Apo E, Apo E e2, e3 y e4. El Apo E e4 se asocia con un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.

15 La apolipoproteína H funciona uniendo la cardiolipina. Los anticuerpos anti-cardiolipina se encuentran en la sífilis, esclerosis y lupus y en algunas enfermedades los anticuerpos requieren que Apo H sea activa e inhiba la liberación de serotonina por las plaquetas y prevenga la agregación de plaquetas. La Apo H también inhibe la liberación de serotonina por plaquetas y previene la agregación de plaquetas.

Partículas lipoproteicas

25 Los perfiles de partículas de lipoproteínas son diferentes para diferentes individuos y para el mismo individuo en diferentes momentos. Los quilomicrones se producen en el intestino y transportan la grasa digerida a los tejidos. La lipoproteína lipasa hidroliza el triacilglicerol para formar ácidos grasos. Los quilomicrones son una de las partículas flotantes más grandes. VLDL-P se forma a partir de ácidos grasos libres bajo el metabolismo de los quilomicrones en el hígado. La lipoproteína lipasa hidroliza el triacilglicerol para formar ácidos grasos. IDL-P es el triacilglicerol no hidrolizado de VLDL-P. IDL-P se convierte en LDL-P debido a la lipasa hepática. HDL-P desempeña un papel en la transferencia de colesterol al hígado de los tejidos periféricos. HDL-P se sintetiza en el hígado y los intestinos.

30 Las partículas de LDL se unen a los receptores de LDL-P. Tras la unión al receptor, el LDL-P se elimina de la sangre. Las células usan colesterol dentro del LDL-P para las membranas y la síntesis de hormonas. La LDL-P deposita el colesterol LDL en la pared arterial, lo que contribuye a la enfermedad cardiovascular. Figura 1. La LDL-P causa inflamación cuando se acumula dentro de la pared arterial. Los macrófagos son atraídos por la inflamación y se convierten en células de espuma cuando toman LDL-P, causando más inflamación. Los LDL-P más pequeños y densos contienen más éster de colesterol que el LDL-P más grande y boyante.

35 La estructura de las partículas de lipoproteína (a) (Lp(a)-P) es la de una partícula de tipo LDL con apolipoproteína A unida a la apolipoproteína B por un enlace disulfuro. Las partículas de lipoproteína (a) parecen desempeñar un papel en la coagulación y pueden estimular las células inmunes a depositar el colesterol en las paredes arteriales. Un anticuerpo frente a la apolipoproteína B reconoce dos bandas en el área donde Lp(a)-P migra. Una banda previamente emigra conjuntamente con HDL-P y se detectó usando el método de separación simultánea de partículas de lipoproteína y detección inmunológica como se describe en la presente memoria. Las diferencias de migración pueden estar asociadas con la diferenciación de carga/tamaño de las isoformas de Lp(a)-P. Un nivel alto de lipoproteína(a)-P indica un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. Específicamente, un nivel alto para la banda de migración más lenta, más catódica, de los dos es un indicador de alto riesgo de enfermedad cardiovascular. Por lo tanto, la Lp(a)-P es útil en la evaluación diagnóstica y estadística del riesgo. La Lp(a)-P puede servir para facilitar la deposición de la placa de LDL-P. Los niveles de Lp(a)-P se incrementan en los eventos aterogénicos. La Lp(a)-P anódica fue previamente no reconocida.

40 La Lp(a)-P puede tener una relación entre la trombosis y la aterosclerosis, interfiriendo con la función del plasminógeno en la cascada fibrinolítica. Numerosos estudios han documentado la relación de altas concentraciones plasmáticas de Lp(a)-P en una variedad de trastornos cardiovasculares, incluyendo la enfermedad vascular periférica, enfermedad cerebrovascular y enfermedad coronaria prematura. Un gran estudio de estadounidenses de edad avanzada, en particular, demostró que niveles elevados de Lp(a)-P independientemente predicen un mayor riesgo de accidente cerebrovascular, muerte por enfermedad vascular y muerte por todas las causas en los hombres. Fried LP, y col. Ann Epidemiol 1991; 3: 263 - 76.

55 El colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C), se ha utilizado para medir el riesgo cardiovascular. Sin embargo, debido a la variabilidad del HDL-C, la Apo B es una mejor medida del número de partículas de LDL circulante (LDL-P) y, por lo tanto, un indicador de riesgo más fiable que el LDL-C tradicional porque existe una estequiometría 1:1 de partículas Apo B y LDL. La suma de Apo B total incluye, pero no se limita a, el complemento

de Apo B de LDL-P (partículas de flotación grandes y pequeñas partículas densas), + VLDL + IDL + Lp(a) + quilomicrones. La medición de los niveles de Apo B como indicador cuantitativo de partículas de lipoproteínas proporciona información adicional respecto al riesgo de la enfermedad cardíaca aterosclerótica más allá de las mediciones individuales o de los ensayos tradicionales de LDL-C. La medición de los niveles de insulina plasmática en ayunas y el tamaño de partícula LDL también proporcionan información útil.

Ensayos para partículas de lipoproteínas y apolipoproteínas

Los presentes sistemas, métodos, aparatos y conjuntos pueden usarse para determinar concentraciones de niveles de componentes de fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial y fluido ascítico que son indicadores del riesgo de desarrollar una enfermedad particular. Una vez que se haya identificado una correlación, se diseñará una prueba diagnóstica para proporcionar un método eficiente y rentable para determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad, diagnosticar una enfermedad o monitorear el tratamiento de una enfermedad. La prueba de diagnóstico puede utilizar métodos que incluyen, pero no se limitan a, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) u otro método conocido en la técnica.

En una realización, un nivel elevado de Apo B y LDL-P significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de enfermedad cardiovascular. En una realización, un nivel elevado de Apo B y Lp(a)-P significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular. Los presentes sistemas, métodos, aparatos y conjuntos permiten la determinación de la aterogenicidad de Apo B y LDL-P o Apo B y Lp(a)-P. Los presentes sistemas, métodos, aparatos y conjuntos proporcionan la capacidad de separar diversas fracciones, tales como las de Lp(a)-P.

En una realización, se crean anticuerpos policlonales frente a una apolipoproteína inyectando una apolipoproteína purificada y un adyuvante en un conejo o animal huésped similar. Pueden realizarse inmunizaciones adicionales periódicamente. Se recoge sangre periódicamente para determinar el título del anticuerpo. Los anticuerpos se purifican de la sangre permitiendo que la sangre se coagule y se decante del suero. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser adquiridos a partir de una fuente comercial o ser producidos por cualquier otro método conocido por los expertos en la técnica.

En una realización, la electroforesis puede utilizarse para separar las partículas de lipoproteínas para determinar los niveles relativos de partículas de lipoproteínas y apolipoproteínas. Durante la electroforesis, se aplica un campo eléctrico a una matriz (polímero reticulado), La matriz o el medio puede ser la poli(acrilamida), agarosa, acetato de celulosa, u otras sustancias matrices conductoras adecuadas.

En una realización, la electroforesis en gel puede ser unidimensional. En otra realización, la electroforesis en gel puede ser bidimensional. En una realización, se puede realizar un enfoque isoeléctrico. En una realización, la electroforesis en gel utilizará agarosa o poli(acrilamida). Los geles de SDS-PAGE (poli(acrilamida)) separan las proteínas basándose en su tamaño porque el SDS recubre las proteínas con una carga negativa. La separación de las proteínas en el gel de agarosa es por la carga. En una realización, se puede usar cualquier tipo adecuado de electroforesis conocido en la técnica.

En una realización, se puede realizar una electroforesis en acetato de celulosa. La electroforesis en acetato de celulosa separa las proteínas basándose en su carga. Después de la separación de las partículas de lipoproteína por electroforesis, la matriz puede teñirse para detectar los lípidos usando una tinción de lípidos tal como Fat Red 7B, Sudan B negro, Luxol azul rápido, o tetróxido de osmio. El colesterol puede ser visualizado usando un reactivo enzimático. Amido negro 10B se puede utilizar para teñir las proteínas del suero. En otra realización, las partículas de lipoproteínas particulares pueden detectarse por otros métodos diferentes a la tinción. En ciertas realizaciones, puede usarse un anticuerpo u otra sustancia específica para la partícula de lipoproteína de interés. El colesterol puede desarrollarse usando cualquier reactivo en la técnica conocido para detectar colesterol. En una realización, el formazán se usa para detectar el colesterol.

En una realización, las partículas de lipoproteínas separadas sobre el gel pueden transferirse a una membrana tal como nitrocelulosa y exponerse al método de detección deseado. Los geles o membranas pueden estar expuestos a tinción o el anticuerpo por incubación en un lavado que contiene el reactivo, exponiendo el gel o la membrana a una película que contiene el reactivo u otro método conocido en la técnica. En una realización, las películas que contienen el reactivo o reactivos deben ser transparentes, disolverse rápidamente, estar soportadas y ser complementarias a la sensibilidad requerida para el sistema. Diferentes reactivos pueden estar presentes en la película en diferentes lugares que corresponden a un carril particular en un gel a ser probado. En una realización, la membrana se sonda con el anticuerpo frente a la partícula de lipoproteína, seguido de la detección con un anticuerpo secundario marcado. El anticuerpo secundario puede ser marcado radiactivamente o enzimáticamente. La densidad óptica de cada banda puede determinarse por densitometría. En una realización, se puede usar un procesador para correlacionar las densidades ópticas.

Se pueden hacer geles de diferentes tamaños que contengan varios números de carriles. El suero (u otro fluido corporal tal como plasma, líquido sinovial o ascitis) para un individuo puede ser probado para identificar múltiples componentes y/o el suero de múltiples individuos. En una realización, los protocolos para ejecutar diferentes

tamaños de geles serán similares excepto para las modificaciones que se pueden realizar para optimizar la separación en ese tamaño de gel.

5 En una realización, la inmunofijación puede usarse para detectar la cantidad de una apolipoproteína dada asociada con una partícula de lipoproteína dada proporcionando, por tanto, el número de partículas de la lipoproteína debido a la relación estequiométrica 1:1. En una realización, el antígeno (apolipoproteína dentro de la partícula de lipoproteína) se separa sobre el gel. En la electroforesis en gel de agarosa, la lipoproteína migra según su tamaño y carga. Dadas las circunstancias apropiadas, la unión del antígeno y el anticuerpo hace que el complejo precipite fuera del gel.

10 En otra realización, el anticuerpo está unido a un soporte. Se puede añadir al soporte un fluido a ensayar, que contiene la lipoproteína unida al antígeno. La unión del antígeno al anticuerpo permite la determinación de la cantidad de una apolipoproteína dada asociada con una partícula de lipoproteína dada proporcionando, por lo tanto, el número de partículas de lipoproteína.

15 En una realización, la determinación de los niveles de sustancias en fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial y fluido ascítico se usa como un ensayo de diagnóstico que detecta dianas específicas asociadas con ciertas enfermedades. En otras realizaciones, el ensayo de diagnóstico detecta numerosas partículas de lipoproteínas, apolipoproteínas y otras sustancias presentes en fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial y fluido ascítico. En ciertas realizaciones, pueden utilizarse diversas formas de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) en el ensayo.

20 Haciendo referencia a la Fig. 2, las partículas de lipoproteína se separaron en un gel sondado para Apo-AI, Apo-AII y Apo-B y se tiñeron. La figura 3 representa un gel que contiene muestras de múltiples pacientes y se sondeó la presencia de Apo-B. Los marcadores presentes en los carriles indican el número del paciente. Las Figuras 4-8 representan las exploraciones densitométricas de las bandas presentes en los carriles para varias muestras de pacientes en la Figura 3. Los valores de fracciones representan el porcentaje del área del pico. La figura 4 representa una exploración densitométrica del carril para el paciente 1 (marcado con 1). La figura 5 representa una exploración densitométrica del carril para el paciente 2 (marcado con 2). La figura 6 representa una exploración densitométrica del carril para el paciente 10 (marcado con 10). La figura 7 muestra una exploración densitométrica del carril para el paciente 12 (marcado con 12). La figura 8 representa una exploración densitométrica del carril para el paciente 74 (marcado 74).

30 La ultracentrifugación separa las partículas de lipoproteínas basándose en sus densidades. En una realización, se puede usar un gradiente discontinuo de NaCl/sacarosa para la separación por ultracentrifugación. En una realización, los fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido sinovial y fluido ascítico pueden ser teñidos previamente con Fat Red 7B para visualizar las bandas para los lípidos o violeta ácido para visualizar la proteína. Las fracciones pueden aislarse por punción en el fondo del tubo. En una realización, las fracciones de las partículas individuales de lipoproteína pueden ser sondadas para detectar la cantidad de una apolipoproteína dada.

35 Las partículas de lipoproteína pueden separarse por diversos métodos. En una realización, las partículas de lipoproteínas pueden separarse por cromatografía en columna. En una realización, la cromatografía en columna se puede realizar en una HPLC. Las fracciones de HPLC se pueden recoger y sondar para detectar la presencia de una apolipoproteína dada. En una realización, la separación puede conseguirse mediante ELISA o precipitación. Alternativamente, se puede usar cualquier tipo adecuado de protocolo de separación conocido en la técnica.

40 En una realización, se usa la densitometría para cuantificar los niveles de partículas de lipoproteínas y apolipoproteínas. La densidad óptica de las bandas se determina exponiendo las bandas a la luz y midiendo la disminución de la cantidad de luz que se desplaza a través del gel transparente. Pueden usarse otros métodos para cuantificar la cantidad de partículas de lipoproteína y apolipoproteína presentes en las bandas. Se puede unir un procesador al densitómetro para determinar y analizar la densidad óptica de la banda para cada partícula de lipoproteína y apolipoproteína. Los valores determinados por el densitómetro pueden darse como una relación entre el valor real y el control positivo. El uso de la densitometría en bandas de cuantificación es bien conocido en la técnica. Véase la Patente de Estados Unidos N° 4.572.671; y la Patente de Estados Unidos N° 7.682.795.

45 En una realización, una apolipoproteína se detectará por precipitación tras la unión de la apolipoproteína y el anticuerpo policlonal dirigido a ella. En una realización, la presencia o ausencia de partículas de lipoproteína o apolipoproteína puede detectarse visualmente. En otra realización, se puede utilizar una tinción de proteínas para detectar la unión de la apolipoproteína y el anticuerpo. En una realización, se puede utilizar un anticuerpo secundario con un marcador para detectar la unión de la apolipoproteína y el anticuerpo.

55 El riesgo de desarrollar una enfermedad en particular puede determinarse basándose en una proporción de un componente a otro o basado en los niveles reales de los componentes. Diferentes métodos de separación o detección pueden prestarse al uso de relaciones o niveles reales. Por ejemplo, pueden preferirse relaciones para detectar el riesgo si se utilizó electroforesis en gel o se pueden preferir niveles reales si se utilizó ELISA. Sin embargo, cualquiera puede ser utilizado para cualquier método de detección.

Después de que las posibles partículas de lipoproteínas y/o apolipoproteínas se identifiquen como posibles indicadores de riesgo para una enfermedad, se investigarán diversas combinaciones para determinar qué combinaciones son los mejores indicadores. Por ejemplo, el nivel de una partícula de lipoproteína puede ser un buen indicador de riesgo para una enfermedad en particular, pero analizar el nivel de un componente adicional puede mejorar la capacidad de predecir el riesgo de un individuo de desarrollar esa enfermedad. Se analizarán los niveles de las partículas de lipoproteínas diana y las apolipoproteínas en una gran colección de muestras y se compararán con los datos de enfermedad disponibles para esas muestras para determinar cuáles son los mejores indicadores de riesgo para una enfermedad particular. En una realización, se puede preparar un ensayo de diagnóstico utilizando esta información.

5
10 Ensayos para determinar el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular

Los LDL depositan el colesterol LDL en la pared arterial, lo que contribuye a la enfermedad cardiovascular. La inflamación ocurre cuando el colesterol se acumula dentro de la pared arterial. Los macrófagos aparecen debido a la inflamación. Los macrófagos se convierten en células de espuma cuando toman LDL, causando la inflamación adicional. La inflamación indica el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.

15 Una realización de la presente descripción determina la cantidad de Apo B presente en diversas fuentes de partículas de lipoproteínas. Este ensayo hace posible la evaluación de la aterogenicidad de partículas de lipoproteínas individuales y apolipoproteínas. Estas mediciones proporcionan un ensayo para la determinación del riesgo de que un individuo desarrolle una enfermedad cardiovascular y proporciona una forma de monitorear el tratamiento. Los altos niveles de Apo B y partículas LDL indican un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. En una realización, el método proporciona un método para la evaluación de las partículas de lipoproteínas específicas del número. El método permite que las separaciones de partículas de lipoproteínas por cargas/tamaños simultáneas, modificables, sean probadas inmunológicamente para varias apolipoproteínas. El método proporciona una medición directa de las partículas de lipoproteínas. El método también proporciona un mecanismo para determinar qué niveles de partículas de lipoproteínas específicas son indicativos de un riesgo aumentado para una enfermedad dada.

20
25

En una realización de la presente descripción, la inmunoespecificidad y el potencial de separación simultánea por la carga se combinan para determinar el nivel de partículas de lipoproteínas específicas. Existe una estequiometría 1:1 del contenido de Apo B para cada uno de los tipos de partículas de lipoproteínas del que es un componente. La separación de las partículas de lipoproteína sérica, tal como por electroforesis en gel, proporciona el fraccionamiento de Apo B. El método de detección proporciona una información clínica que puede utilizarse para desarrollar un ensayo de diagnóstico simple, fácil de usar y rápido que detecta las partículas de lipoproteína de interés para una enfermedad específica. Otros métodos de separación conocidos en la técnica pueden usarse en lugar o además de la electroforesis en gel. Este ensayo detecta las partículas de lipoproteínas con una tinción de proteínas o de lípidos y las apolipoproteínas con un anticuerpo. Figura 2. Pueden utilizarse otros métodos de detección conocidos en la técnica. El contenido del gel se puede transferir a una membrana tal como de nitrocelulosa. Los geles o membranas pueden estar expuestos a tinción o el anticuerpo por incubación en un lavado que contiene el reactivo, exponiendo el gel o la membrana a una película que contiene el reactivo u otro método conocido en la técnica. En una realización, el gel se tiñe con ácido violeta. En una realización, el gel se tiñe con Oil Red O. En una realización, las películas que contienen el reactivo o los reactivos deben ser transparentes, disolviéndose rápidamente, soportadas y complementarias a la sensibilidad requerida para el sistema. Diferentes reactivos pueden estar presentes en la película en diferentes lugares que corresponden a un carril particular en un gel a ser probado. En otra realización, se usaron reactivos líquidos. La densidad óptica de cada banda puede determinarse por densitometría. La densidad óptica se puede correlacionar usando un procesador, tal como un ordenador, cálculo a mano, o por cualquier otro método conocido en la técnica.

30
35
40

Un anticuerpo frente a la apolipoproteína B reconoce dos bandas en el área de donde Lp(a) migra. Una banda que emigró previamente con HDL, se detectó utilizando el método de separación simultánea de partículas de lipoproteínas y detección inmunológica como se describe en la presente memoria. La banda de migración más lenta es aterogénica. Por lo tanto, un alto nivel de esa banda indica un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. Las partículas de lipoproteínas presentes en fluidos corporales tales como suero, plasma, fluido sinovial y fluido ascítico pueden ser separadas y expuestas a reactivos que detectan partículas de lipoproteínas y apolipoproteínas. Apo B-100 está presente como parte de Lp(a) por lo que la sonda con un anticuerpo Apo B-100 detectará Lp(a). Un ejemplo de una tinción de proteína adecuada es el violeta ácido y una tinción de lípido adecuada es el Oil Red O. Se pueden usar cualesquiera otras tinciones adecuadas conocidas en la técnica.

45
50

Ensayos para determinar el riesgo de aparición tardía de la enfermedad de Alzheimer

La Apo E se ha asociado con el riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. Existen tres alelos diferentes del gen Apo E, Apo E e2, e3 o e4. Los alelos difieren entre sí por uno o dos pares de bases. La presencia de Apo E e4 se correlaciona con un mayor riesgo de aparición tardía de la enfermedad de Alzheimer. Cada persona tiene un par de genes Apo E que son una combinación de e2, e3 y e4. Apo E e3/e3 es el genotipo más común. Apo E e4/e4 y e4/e3 indican un riesgo de padecer aterosclerosis. Apo E e4 también se asocia con un mayor riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío, siendo e4/e4 el riesgo más alto. Una ventaja de los presentes

55
60

sistemas, métodos, aparatos y conjuntos es la capacidad de detectar qué proteínas Apo E están presentes con qué partículas de lipoproteínas y a qué niveles. Se utilizarán antisueros específicos de Apo E e2, e3 o e4 para determinar cuál está presente. La medición del Apo E total no es suficiente porque no proporciona información sobre qué partícula de lipoproteína Apo E está presente.

5 **EJEMPLOS**

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la presente descripción. Los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente descripción, apreciar que se pueden realizar muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y que todavía obtienen un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu o alcance de la descripción. Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

Ejemplo 1. Preparación de anticuerpos contra apolipoproteínas

Los anticuerpos policlonales contra una apolipoproteína se produjeron inyectando un huésped animal adecuado, tal como un conejo, con la apolipoproteína de interés y un adyuvante. Se inyectaron aproximadamente 0,02 mililitros y se volvieron a inyectar cada 21 días hasta que alcanzar el título máximo de anticuerpos. El título del anticuerpo se verificó mediante un sangrado de la oreja. De esta manera se pueden producir anticuerpos contra Apo B-100 u otra apolipoproteína. Alternativamente, los anticuerpos contra Apo B-100 u otra apolipoproteína pueden adquirirse comercialmente.

Ejemplo 2. Procedimiento Apo-B

Se utilizó un sistema de electroforesis SPIFE por Helena Laboratories Corporation para analizar muestras de suero de varios pacientes. En las filas 2, 3, 4 y 5 de la bandeja de taza de muestra se colocaron tiras de vasos desechables de pocillo profundo. Las cuchillas se colocaron en las ranuras verticales numeradas A, 9, 13 y 16 del conjunto aplicador. Se pipetearon 50 microlitros de una muestra de paciente o control en los vasos de muestra apropiadas. En otras realizaciones, pueden usarse diferentes volúmenes de muestras de pacientes. En una realización, se pipetearon 75 microlitros de una muestra de paciente o control en los vasos de muestra apropiados.

Se distribuyeron aproximadamente 2 mililitros de REP Prep de Helena Laboratories Corporation en el lado izquierdo de la cámara de electroforesis. REP es un término acuñado para la electroforesis rápida. El gel se colocó en el REP Prep y se usó un tejido sin pelusa para limpiar los bordes del soporte de gel para eliminar el exceso de REP Prep. Se prestó especial atención a limpiar al lado de los postes de electrodo. La capa protectora de gel se retiró del gel y se desechó. Se usó un Secante C para secar suavemente toda la superficie. Después se retiró el secante.

Se colocó un electrodo de carbono en el reborde exterior del bloque del gel del cátodo (izquierda) fuera de los postes magnéticos. Se colocó un electrodo de acero inoxidable en el reborde exterior del bloque del gel del ánodo (derecha) fuera de los postes magnéticos. Se colocó un secante de electrodos bajo los extremos del electrodo de carbono de manera que tocasen los extremos del bloque de gel. Los parámetros de funcionamiento de la matriz para la electroforesis fueron los siguientes: se cargaron las muestras en 30 segundos, se aplicaron las muestras en 60 segundos y se sometieron a electroforesis durante 20 minutos a 16°C y 400 voltios.

Los electrodos se retiraron después de la electroforesis y se retiraron los bloques de gel y se desecharon. El antisuero Apo-B se diluyó 1:4 con solución salina (1 parte de antisuero con 3 partes de solución salina). En otras realizaciones, se puede usar una concentración diferente de antisuero. La plantilla de antisueros se colocó suavemente sobre la superficie del gel. Se pipetearon 250 microlitros del antisuero diluido en las ranuras ovales en el extremo derecho de cada canal de antisueros en la plantilla. El antisuero se dejó absorber durante 10 minutos a 20°C.

Una vez completada la absorción, se colocó un secante de peine en las ranuras en el extremo derecho de los canales de los antisueros de tal manera que las puntas del peine tocaran el gel. La plantilla de antisueros y el secante de peine se retiraron después de 3 minutos. La superficie del gel se secó con un secante C y el secante C se retiró y se desechó.

Dos secantes C se mojaron en solución salina normal y se colocaron sobre la superficie del gel. Cuatro secantes D se colocaron en la parte superior del secante C mojado. La plantilla de antisueros se colocó en la parte superior y se secó durante 2 minutos. La plantilla de antisueros y los secantes se eliminaron y se desecharon. Se mojaron dos secantes C y se colocaron en el gel, se colocaron cuatro secantes D en los secantes C, y la plantilla de antisueros se colocó en la parte superior y se secó durante otros 2 minutos.

Se colocó un electrodo en cada extremo del gel, contra los postes magnéticos, para asegurar un buen contacto del gel con el suelo durante el secado. El gel se secó a 50°C durante 8 minutos.

El gel se retiró de la cámara de electroforesis y se unió al soporte de gel de la Unidad Stainer con el gel orientado hacia la parte posterior de la unidad. El soporte del gel y el gel se colocaron en la Unidad Stainer. El gel se lavó en TBS durante 10 minutos, se tiñó en coloración de ácido violeta durante 4 minutos, se destiñó dos veces en ácido

cítrico Destain durante 1 minuto cada vez y se secó a 63°C durante 8 minutos. El gel se destiñó a continuación en ácido cítrico Destain durante 1 minuto y se secó a 63°C durante 5 minutos.

Ejemplo 3. Determinación del riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular usando los niveles de Apo B y LDL

5 Se extrajo suero de un individuo para ser probado para detectar el riesgo de enfermedad cardiovascular. La electroforesis en gel se realizó sobre el suero. Las partículas de lipoproteína migran en función de su tamaño/carga. Una parte del gel se desarrolló con Fat Red 7B para detectar los lípidos. El colesterol se detectó con cualquier reactivo de colesterol conocido en la técnica. En una realización, el reactivo de colesterol es formazano. Otra parte del gel se desarrolló con un anticuerpo policlonal contra Apo B-100 usando inmunofijación. La precipitación ocurre cuando el anticuerpo se une a su antígeno, Apo B-100. En una realización, la unión de un anticuerpo y su antígeno puede detectarse usando un anticuerpo que está marcado o usando un anticuerpo secundario marcado.

10 La densitometría se realiza sobre las bandas para diversas partículas de lipoproteínas específicas. La densitometría también se realiza sobre las bandas reconocidas por el anticuerpo contra Apo B-100. La matriz o medio se tiñó con ácido violeta después de la detección por el anticuerpo. Un alto nivel de Apo B-100 y partículas de LDL se correlaciona con un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. El presente método también proporciona un método para partículas de lipoproteínas específicas además de un método para detectar niveles de colesterol de partículas de lipoproteínas y niveles de triglicéridos de lipoproteínas.

Ejemplo 4. Determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular usando los niveles de Lp(a)-P

20 Una parte del gel se desarrolla con violeta ácido para detectar proteínas o Fat Red 7B para detectar lípidos. El gel también se desarrolla con un anticuerpo policlonal contra Apo B-100. En una realización, la unión de un anticuerpo y su antígeno puede detectarse usando un anticuerpo que está marcado o usando un anticuerpo secundario marcado. Un anticuerpo frente a la apolipoproteína B reconoce dos bandas en el área de donde Lp(a) migra. El mismo anticuerpo reconoce Apo-B en todas las partículas de lipoproteínas que contienen Apolipoproteína-B, no sólo el "par" de Lp(a). Una banda que emigra previamente con HDL se detectó utilizando el método de separación simultánea de partículas de lipoproteínas y detección inmunológica como se describe en la presente memoria. Si se desea, el colesterol se detecta con cualquier reactivo de colesterol conocido en la técnica. En una realización, el reactivo de colesterol produce un colorante de formazano para la detección.

25 Se realiza una densitometría sobre las bandas para diversas partículas de lipoproteínas detectadas usando Fat Red 7B, violeta ácido, un agente de colesterol, y el anticuerpo Apo B-100, (la densitometría no puede usarse en el anticuerpo Apo-B sin protocolos de visualización adecuados ya que aquí no hay ningún color visiblemente ópticamente activo intrínseco a la unión antígeno-anticuerpo sin un ligando o conjugado detectable apropiado), para determinar el nivel de partículas de lipoproteínas. Un mayor nivel de partículas de lipoproteínas que contienen Lp(a) indica un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular.

30 Ejemplo 5. Determinar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío usando los niveles de Apo E

35 Se extrae suero de un individuo para ser probado para detectar el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer de inicio tardío. La electroforesis en gel se realiza en el suero. Las partículas de lipoproteína migran basándose en su tamaño/carga. El gel se desarrolla con partículas de lipoproteínas de violeta ácido o Fat Red 7B. El colesterol puede detectarse con cualquier reactivo de colesterol conocido en la técnica. En una realización, el reactivo de colesterol produce un colorante de formazano para la detección. Otra porción del gel se desarrolla con anticuerpos policlonales frente a los alelos e2, e3, y e4. En una realización, la unión de un anticuerpo y su antígeno puede detectarse usando un anticuerpo que está marcado o usando un anticuerpo secundario marcado.

40 La densitometría se realiza sobre las bandas para diversas partículas de lipoproteínas detectadas usando violeta ácido. La densitometría también se puede realizar en las bandas reconocidas por el anticuerpo frente a e2, e3 y e4. El desarrollo de complejos sondados de antiseros requiere una tinción de proteína/lípido adecuada y/o un conjugado o ligando visualmente activo. La presencia de alelos e4 se correlaciona con un mayor riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular, especialmente si un individuo posee dos alelos e4.

Ejemplo 6. Ensayo de múltiples muestras de suero

45 La electroforesis en gel se ha realizado utilizando un gran número de carriles (por ejemplo 80) de muestras de suero. Figura 3. Las muestras de suero fueron sondeadas para Apo B. Cada carril representa una muestra de paciente. Los trazos densitométricos de las bandas en los carriles para los pacientes 1, 2, 3 y 9 se representan en las Figuras 4-7, respectivamente.

Ejemplo 7. Ensayo de diagnóstico

55 Un ensayo de diagnóstico, para detectar la presencia y/o los niveles de partículas de lipoproteínas específicas en fluidos corporales, tales como suero para la fines de identificar el riesgo de una enfermedad particular, utiliza, en

términos generales, un soporte o plataforma electroforética, una "membrana" o una película que contiene reactivo y un densitómetro, o el equivalente de uno o más de los anteriores. La membrana puede proporcionar las funciones duales de un soporte durante la electroforesis y puede contener el reactivo. La "membrana" o la "película que contiene el reactivo" puede contener los anticuerpos. Los anticuerpos frente a apolipoproteína A, apolipoproteína B, apolipoproteína C, apolipoproteína D, apolipoproteína E o apolipoproteína H estarán presentes en un punto en un carril en una membrana. Los anticuerpos frente a las partículas de lipoproteínas de alta densidad, partículas de lipoproteínas de densidad intermedia, partículas de lipoproteínas de baja densidad, partículas de lipoproteínas de muy baja densidad o partículas de lipoproteínas (a) estarán presentes en un punto de otro carril de la membrana. La membrana se bloqueará para evitar la unión no específica del antígeno a la membrana. El ensayo se proporcionará a un usuario después de lo cual la membrana se incubará con una muestra de suero a ser ensayada para una enfermedad dada, tal como una enfermedad cardiovascular. Los antígenos en el suero se unirán a los anticuerpos presentes en la membrana. El antígeno no unido se lavará de la membrana. La membrana se incubará entonces con un colorante o anticuerpo específico para el antígeno y que contenga un marcador detectable. Una banda será visible en la membrana donde el anticuerpo se une a su antígeno. Se utilizará un densitómetro para determinar la cantidad de antígeno presente en el suero.

Las variaciones y modificaciones de las realizaciones preferidas descritas en la presente memoria serán evidentes para los expertos en la técnica. Se pretende que tales variaciones y modificaciones puedan hacerse sin apartarse del alcance y sin disminuir sus ventajas concomitantes. El término densitometría se refiere convencionalmente a cambios de color detectables/medibles visualmente. Sin embargo, cualquier radiación electromagnética espectral emitida unida al análisis de interés con un detector complementario puede "densitometrar" las partículas de lipoproteínas.

Todas las composiciones y métodos descritos y reivindicados en el presente documento pueden fabricarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos descritos en la presente invención se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las composiciones y métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los métodos descritos en este documento sin apartarse del concepto y alcance. Más específicamente, será evidente que ciertos agentes que están tanto relacionados químicamente como fisiológicamente pueden sustituir a los agentes descritos en la presente memoria mientras se consigan los mismos resultados o resultados similares. Todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del concepto y alcance como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en un fluido corporal que comprende:
- separar las partículas de lipoproteínas presentes en una muestra de fluido corporal sobre un sustrato;
 - 5 exponer el sustrato a un anticuerpo para detectar un agente inmunológicamente activo asociado con partículas de lipoproteínas o componentes de partículas de lipoproteínas;
 - exponer el sustrato a un reactivo para la detección de la presencia de proteínas o lípidos;
 - determinar una densidad óptica de una señal en el sustrato que indica el nivel de una partícula de lipoproteína específica.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, en el que la separación se produce por electroforesis en gel y el sustrato es un gel.
3. El método de la reivindicación 1, que comprende además detectar visualmente una señal en el sustrato que indica el nivel de una partícula de lipoproteína específica.
- 15 4. El método según la reivindicación 1, en el que el agente inmunológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en apolipoproteína A, apolipoproteína B, apolipoproteína C, apolipoproteína D, apolipoproteína E, apolipoproteína H, lipoproteína (a), lipoproteína de alta densidad, lipoproteína de densidad intermedia, lipoproteína de baja densidad, lipoproteína de muy baja densidad, y mezclas de los mismos.
5. El método de la reivindicación 1, en el que el componente es la apolipoproteína B.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, en el que un nivel elevado de apolipoproteína B y de partículas de lipoproteínas de baja densidad significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular.
7. El método de la reivindicación 1, en el que un nivel elevado de partículas de apolipoproteína B y lipoproteína (a) significa que un individuo tiene un riesgo aumentado de padecer una enfermedad cardiovascular.
8. El uso de un aparato para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas presentes en un fluido corporal de acuerdo con el método de la reivindicación 1, comprendiendo dicho aparato:
- 25 un aparato de separación para separar las partículas de lipoproteínas presentes en una muestra de fluido corporal sobre un gel;
 - un densitómetro para determinar la densidad óptica de un patrón electroforético de la muestra de fluido corporal para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas; y un procesador para correlacionar el nivel de dicha densidad óptica del patrón electroforético de la muestra de fluido corporal
 - 30 para la evaluación del nivel de partículas de lipoproteínas específicas.
9. El uso del aparato de la reivindicación 8, en el que el aparato de separación es un aparato electroforético.

TÉCNICA ANTERIOR

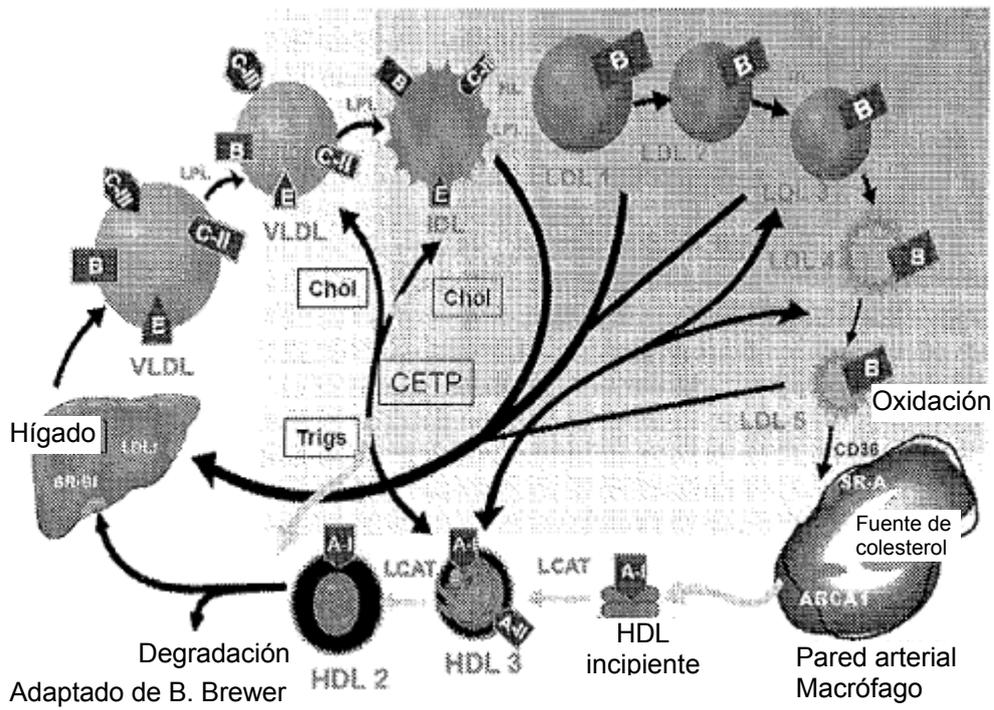


Figura 1

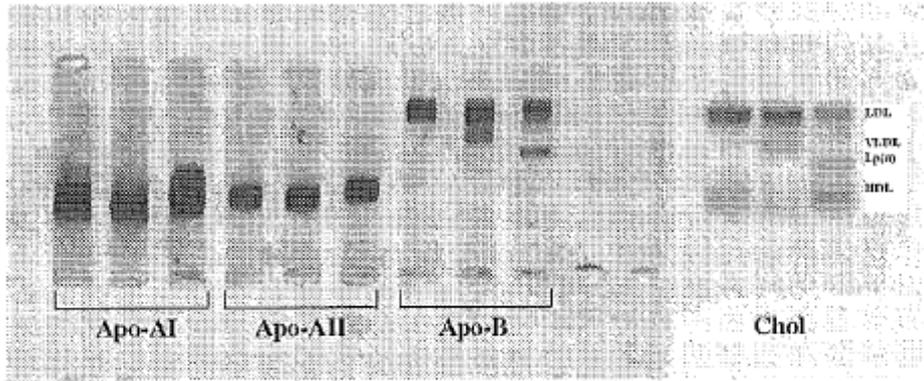


Figura 2

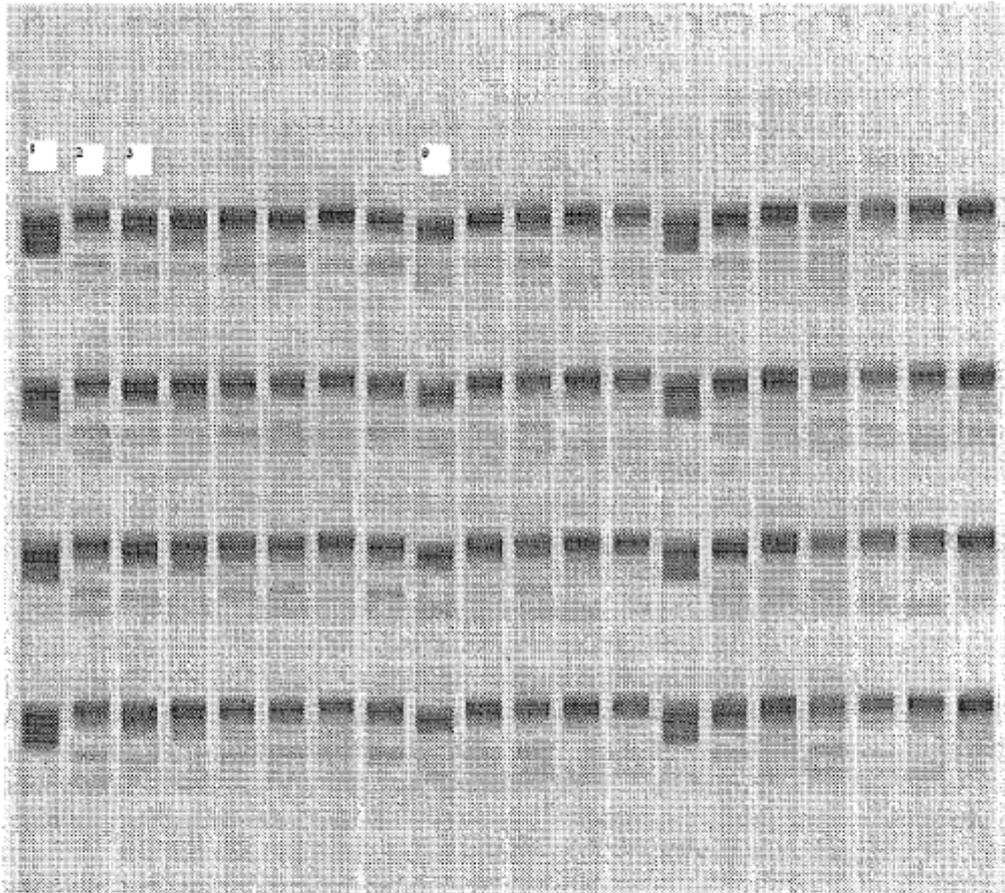
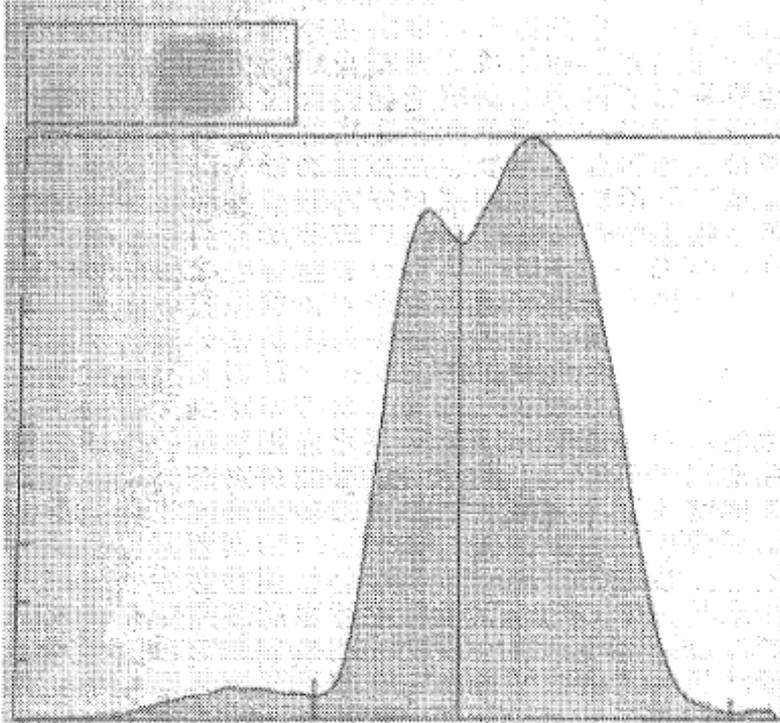


Figura 3

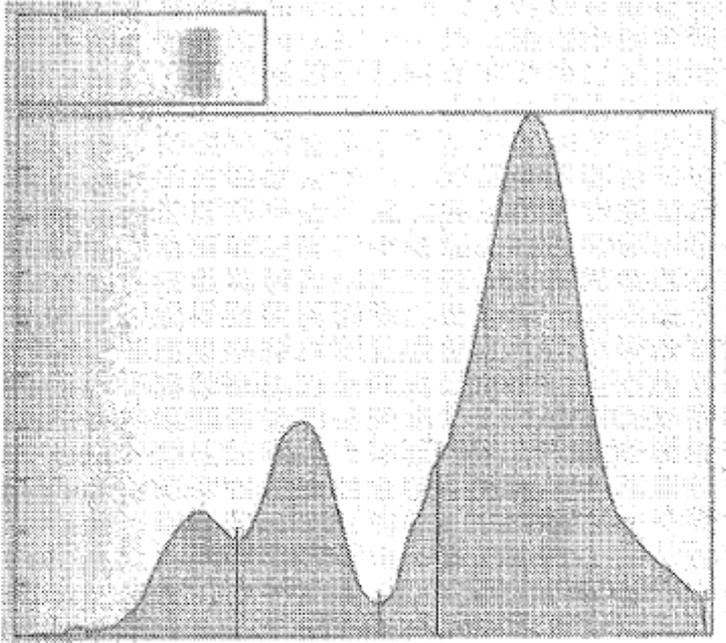
Plato: APO-B
Paciente: 1



| Fracción | % |
|----------|------|
| Lp(a)-P | 3.2 |
| VLDL-P | 32.4 |
| LDL-P | 64.4 |

Figura 4

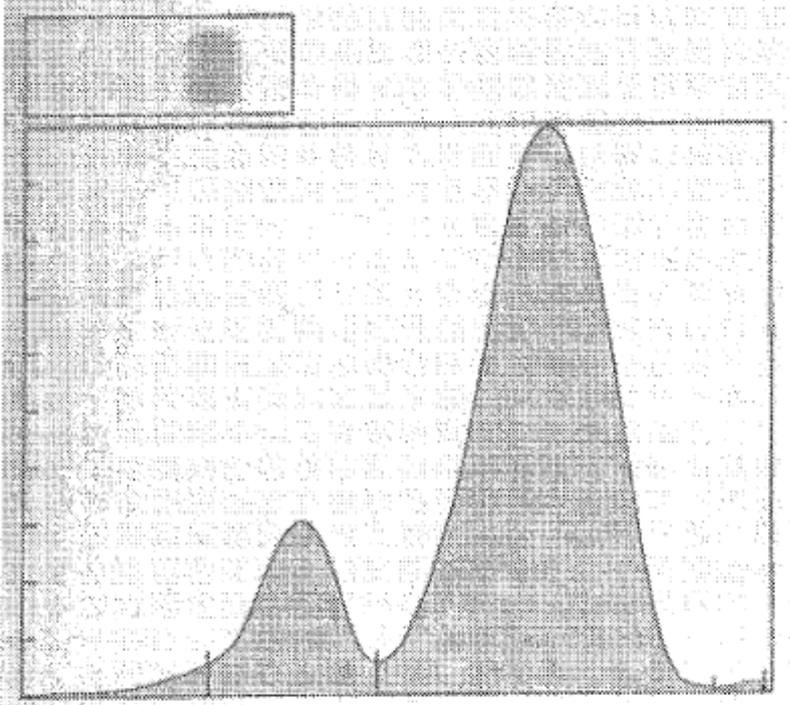
Plato: APO-B
Paciente: 2



| Fracción | % |
|-------------------------------------|------|
| Componente sondado ApoB 10.3 | |
| Lp(a)-P | 18.3 |
| VLDL-P | 5.6 |
| LDL-P | 65.7 |

Figura 5

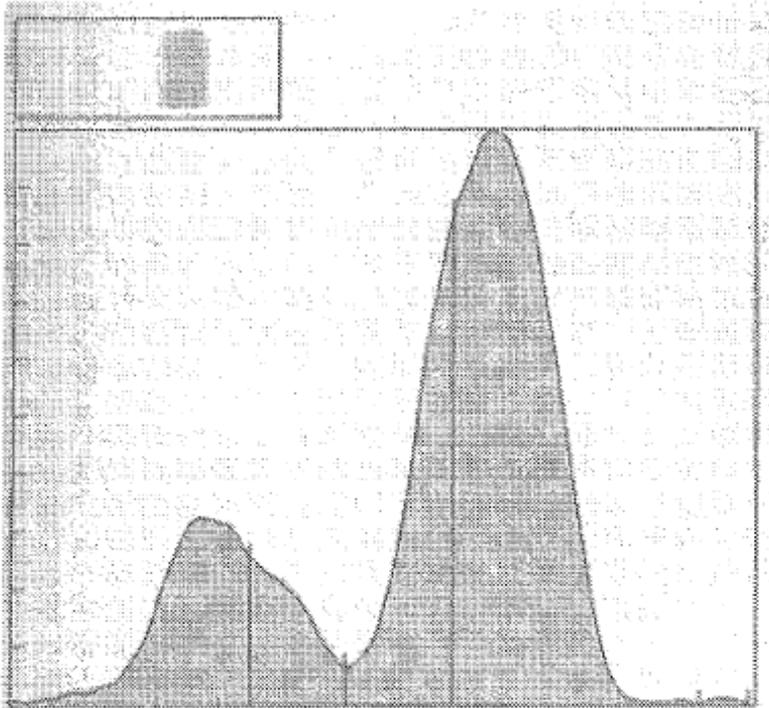
Plato: APO-B
Paciente: 3



| Fracción | % |
|-------------------------|------|
| Componente sondado ApoB | 1.6 |
| Lp(a)-P | 15.9 |
| LDL-P | 82.2 |

Figura 6

Plato: APO-B
Paciente: 9



| Fracción | % |
|-------------------------|------|
| Componente sondado ApoB | 17.0 |
| Lp(a)-P | 8.0 |
| VLDL-P | 20.7 |
| LDL-P | 54.1 |

Figura 7