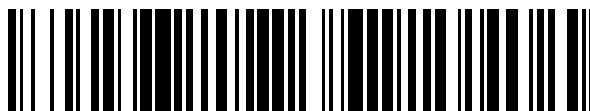


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 788**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.01.2012 PCT/EP2012/051080**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2012 WO12101142**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.01.2012 E 12702473 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2668507**

54 Título: **Método para evaluar el riesgo de un sujeto de tener una enfermedad cardiovascular**

30 Prioridad:

26.01.2011 EP 11305080
26.01.2011 US 201161436239 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.01.2018

73 Titular/es:

INSERM - INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (50.0%)
101, rue de Tolbiac
75013 Paris, FR y
CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE TOULOUSE (50.0%)

72 Inventor/es:

MARTINEZ, LAURENT;
PERRET, BERTRAND y
GENOUX, ANNELEISE

74 Agente/Representante:

VEIGA SERRANO, Mikel

ES 2 648 788 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

Método para evaluar el riesgo de un sujeto de tener una enfermedad cardiovascular

5 **Sector de la técnica**

La presente invención se refiere a un método para evaluar el riesgo de un sujeto de tener una enfermedad cardiovascular.

10 **Estado de la técnica**

A pesar de los importantes avances en el tratamiento de la enfermedad cardiovascular (ECV), sigue siendo una de las principales causas de muerte en los países desarrollados. Algunos estudios epidemiológicos prospectivos realizados a gran escala proporcionan una evidencia significativa de que los bajos niveles en plasma del colesterol con lipoproteína de alta densidad (HDL-C) es un factor de riesgo importante independiente de la ECV. Los estudios en modelos de animales genéticamente modificados y en sujetos con trastornos raros del metabolismo del HDL respaldan una relación causal entre bajos niveles de HDL y el desarrollo de la enfermedad vascular aterosclerótica. Es algo notable que un bajo nivel de HDL-C (considerado generalmente por las actuales directrices de tratamiento en <40 mg/dl o <1,0 mmol/l en hombres y <50 mg/dl o <1.3 mmol/l en mujeres) sigue siendo predictivo del futuro riesgo cardiovascular, incluso aunque la concentración de colesterol en el LDL haya alcanzado bajos niveles por tratamiento con estatinas (Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. N Engl J Med. Sep 27 2007; 357(13):1301-1310).

Aunque esta actividad ateroprotectora del HDL no está ampliamente aceptada, el mecanismo que respalda este efecto continúa siendo objeto de debate. El mecanismo mejor establecido mediante el cual los HDL protegen contra la aterosclerosis es estimulando la salida del colesterol de los macrófagos y el transporte del colesterol hasta el hígado para su excreción en la bilis y heces, un proceso denominado 'transporte inverso del colesterol' (RCT). Además, este papel ateroprotector de los HDL puede estar también relacionado con sus propiedades protectoras antiinflamatorias, anti-apoptóticas, o protectoras del endotelio, lo que se denominan efectos pleiotrópicos (Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1 de octubre de 2013; 23(10):1724-1731; von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. Mar 2005; 8(2):147-152). Estos efectos pleiotrópicos protectores del HDL conducen al concepto de que las terapias dirigidas a mejorar los niveles de HDL-C en plasma serían antiaterogénicas y protectoras contra los eventos cardiovasculares. Sin embargo, los HDL son muy heterogéneos, con subclases que difieren en densidad, tamaño, carga y composición de proteínas, que tienen diferentes funciones y pueden diferir en sus propiedades antiaterogénicas funcionales. Además, varios factores ambientales, como el tabaquismo, consumo de alcohol y actividad física o enfermedad inflamatoria, son conocidos por afectar los niveles de HDL-C en plasma. Dada la complejidad del sistema del HDL, se ha teorizado que una sola medición de los niveles de HDL-C frecuentemente fracasan en proporcionar una predicción fiable de las actividades biológicas del HDL para proteger contra la ECV y, por tanto, es frecuentemente un mal indicador de la protección o el riesgo de un sujeto individual. Por lo tanto, se necesitan nuevos marcadores que reflejan las actividades metabólicas o vasculares de las partículas de HDL para poder evaluar mejor el estado del sujeto en lo que respecta al riesgo cardiovascular, o para evaluar la sensibilidad de los sujetos a los tratamientos novedosos relacionados con el HDL.

Rouslin et al (J Bioenerg Biomembr. agosto de 1995; 27(4):459-66) muestra la medición de IF1 que implica sonicar mitocondrias e incubar extractos que contienen IF1 con partículas submitocondriales de corazón de rata.

Di Pancrazio et al (Biochim Biophys Acta. 4 de noviembre de 2004;1659(1):52-62) muestra la determinación de IF1 mediante electroforesis en gel SDS, SDS PAGE bidimensional e inmunotransferencia con un anticuerpo dirigido contra IF1 tras la extracción de IF1 de biopsias.

Navab et al (Circulation. 29 de junio de 2004; 109(25):3215-20) divulga que D-4F (un péptido mimético de la apolipoproteína A-I oral) reduce la aterosclerosis en ratones.

Chapman et al (Eur Heart J. 2010 Jan; 31(2):149-64) evalúan la implicación de las proteínas de transferencia del éster de colesterol (CETP) en la acción de los actuales agentes moduladores de líquido con potencial para aumentar el HDL, y comparan el mecanismo de acción con el de aquellos agentes farmacológicos en desarrollo que inhiben directamente la proteína de transferencia del éster de colesterol.

Mousa et al (Drugs Future. enero de 2010; 35(1):33-39) divulgan varias posibilidades para modular en nivel de HDH.

Spillman et al (Curr Pharm Des. mayo de 2010; 16(13):1517-30) divulga diferentes estrategias para aumentar los niveles de HDL.

65

Besler et al (Curr Pharm Des. mayo de 2010; 16(13):1480-93) divulga varios agentes que aumentan el nivel de HDL en enfermedades cardiovasculares.

5 La solicitud de patente PCT publicada con el número WO2006/029982 se refiere a las proteínas de transferencia del éster de colesterol para el tratamiento de la aterosclerosis.

Waksman et al (J Am Coll Cardiol. 15 de junio de 2010; 55(24):2727-35) divulga infusiones autólogas en serie de plasma deslipidado selectivo para HDL para tratar pacientes con síndrome coronario agudo.

10 Nissen et al (JAMA. 5 de noviembre de 2003; 290(17):2292-300) evalúa los efectos de la ApoA-I Milano recombinante sobre la aterosclerosis coronaria en pacientes con síndromes coronarios agudos.

Objeto de la invención

15 La invención está definida en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a un método para evaluar el riesgo de un sujeto de tener una enfermedad cardiovascular que comprende la etapa de medir el nivel del factor de inhibición 1 (IF1) en una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en la que el nivel de IF1 está correlacionado negativamente con el riesgo de dicho sujeto de tener una enfermedad cardiovascular.

Un nivel alto de IF1 es predictivo de un bajo riesgo de tener una enfermedad cardiovascular.

25 Un nivel bajo de IF1 es predictivo de un riesgo alto de tener una enfermedad cardiovascular.

La presente invención también se refiere a un método para medir el nivel de IF1 en un sujeto que comprende la etapa de medir el nivel de IF1 en una muestra de sangre o en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenido de dicho sujeto.

30 La presente invención proporciona un kit que comprende medios para medir el nivel de IF1 en una muestra de fluido corporal.

La invención también se refiere a un agente que aumenta el nivel de HDL seleccionado del grupo que consiste en apoA-I baja en lípidos, apoA-I asociada con una mezcla de fosfolípidos, miméticos de apoA-I e inhibidores de CETP para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto que tiene un bajo nivel de IF1 en sangre.

Descripción detallada de la invención

40 Definiciones

Enfermedad cardiovascular (ECV) es el término general para las enfermedades del corazón y los vasos sanguíneos, incluyendo aterosclerosis, cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad aortoiliaca, y enfermedad vascular periférica. Los sujetos con ECV pueden desarrollar numerosas complicaciones, incluyendo, pero sin limitaciones, infarto de miocardio, ictus, angina de pecho, ataques isquémicos transitorios, insuficiencia cardíaca congestiva, aneurisma de la aorta y la muerte.

50 Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" denota un mamífero, tal como un roedor, un felino, un canino y un primate. Preferentemente, un sujeto de acuerdo con la invención es un ser humano.

El término "IF1" deberá ser comprendido ampliamente, abarca el IF1 maduro, sus isoformas y sus fragmentos.

El IF1 (factor de inhibición 1) regula la actividad ATPasa de la sintasa F₁F₀-ATP mitocondrial (Pullman ME et al. (1963)). IF1 es una proteína mitocondrial básica de 10 kDa codificada por un gen nuclear con un grado significativo de homología entre varias especies (Green DW et al. (2000)). El IF1 se une a través de su región del extremo N en la interfase entre las subunidades α y β del sector catalítico de F₁ de la ATP sintasa mitocondrial, bloqueando de esta forma la catálisis rotatoria (Cabezón E et al., (2003)). Se ha notificado que el IF1 exógeno podría unirse específicamente a la ATP sintasa de la superficial celular (también denominada ecto-F₁-ATPasa) sobre hepatocitos y células endoteliales y reduce su actividad hidrolítica (Martínez LO et al. (2003); Mangiullo R et al., (2008); (Burwick NR et al., (2005)). Los ejemplos de documentos que divulgan IF1 son Lebowitz et al. (1993); Jackson et al., (1988); Martínez et al. (2003); Mimura et al., (1993); Solaini et al., (1997) y W098/33909.

65 Los informes recientes han descrito la presencia de IF1 en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares tales como hepatocitos y células endoteliales (Burwick NR et al., (2005); Cortes-Hernández P et al. (2005); Contessi S et al. (2007); Giorgio V et al. (2010)).

Se produce corte y empalme alternativo en el locus de IF1 y se han identificado en seres humanos tres variantes del transcrito que codifican diferentes isoformas de IF1 (proporcionado en Ref Seq <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>). Todas las isoformas precursoras contienen un péptido señal mitocondrial idéntico (o péptido de tránsito) de 25 aminoácidos. Las isoformas maduras y funcionales de IF1 no contienen este péptido de tránsito. La variante 1 de IF1

5 codifica la isoforma más larga, IF1 isoforma 1, que consiste en una proteína precursora de 106 aminoácidos y una proteína madura de 81 aminoácidos (ATIF1_HUMAN; REFSEQ: n.º de registro NM_016311.3, n.º de registro Swiss-Prot: Q9UII2 (Ichikawa N et al.; (1999))).

10 La variante 2 de IF1 codifica la IF1 isoforma 2 que consiste en una proteína precursora de 71 aminoácidos y una proteína madura de 46 aminoácidos (A6NE74_HUMAN; REFSEQ: n.º de registro NM_178190.1). La isoforma 2 tiene un extremo C diferente y más corto, comparado con la isoforma 1, debido a un sitio de corte y empalme alternativo en la región de codificación 3' y un desplazamiento de fase.

15 La variante 3 de IF1 codifica la isoforma más corta, IF1 isoforma 3, que consiste en una proteína precursora de 60 aminoácidos y una proteína madura de 35 aminoácidos (REFSEQ: n.º de registro NM_178191.1). La variante 3 es idéntica a la variante 1, pero sin los últimos 46 aminoácidos del extremo C.

En una realización preferida, IF1 es IF1 isoforma 1.

20 En otra realización, IF1 es IF1 isoforma 2.

En otra realización, IF1 es IF1 isoforma 3.

Método de ensayo

25 La presente invención se refiere a un método para medir el nivel de IF1 en un sujeto que comprende la etapa de medir el nivel de IF1 en una muestra de sangre o en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenido de dicho sujeto.

30 De hecho, los inventores han demostrado sorprendentemente que IF1, de la que se sabía hasta ahora que estaba presente en las mitocondrias o en la membrana plasmática, es una proteína en circulación presente en la sangre.

35 En una realización, la muestra de sangre a utilizar en los métodos de acuerdo con la invención es una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma. En una realización preferida, la muestra de sangre es una muestra de suero.

En otra realización, el nivel de IF1 se mide en una muestra de líquido cefalorraquídeo.

40 De hecho, la ATP sintasa inhibida por IF1 está presente en la membrana plasmática de algunas células cerebrales. En particular, la ATP sintasa se ha descubierto en la superficial celular de neuronas del hipocampo y astrocitos cultivados (Schmidt C et al., (2008)).

45 Una vez que la muestra de fluido corporal del sujeto está preparada, se puede medir el nivel de IF1 por cualquier método conocido en la materia.

50 Por ejemplo, la concentración de IF1 se puede medir usando técnicas convencionales electroforéticas y de inmunodiagnóstico, incluidos inmunoensayos tales como competición, reacción directa o ensayos de tipo sándwich. Dichos ensayos incluyen, aunque sin limitación, transferencia Western, ensayos de aglutinación, inmunoensayos con marcación enzimática e inmunoensayos mediados tales como ELISA, ensayos de tipo biotina/avidina, radioinmunoensayos, inmunoelectroforesis, inmunoprecipitación, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de exclusión por tamaño, afinidad en fase sólida, etc.

55 En una realización particular, dichos métodos comprenden poner en contacto la muestra de fluido corporal con un ligando.

Tal como se usa en el presente documento, ligando se refiere a una molécula capaz de interactuar selectivamente con IF 1.

60 El ligando puede ser generalmente un anticuerpo que puede ser policlonal o monoclonal, preferentemente monoclonal. Los anticuerpos policlonales dirigidos contra IF1 se pueden sensibilizar de acuerdo con métodos conocidos administrando el antígeno o epítipo adecuado a un animal hospedador seleccionado, por ejemplo, de cerdos, vacas, caballos, conejos, cabras, ovejas, y ratones, entre otros. Se pueden usar varios adyuvantes conocidos en la materia para potenciar la producción de anticuerpos. Aunque los anticuerpos de utilidad en la práctica de la invención pueden ser policlonales, se prefieren los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales contra IF1 se pueden preparar y aislar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpo mediante líneas celulares continuas en cultivo. Las técnicas para la producción y el

aislamiento incluyen, aunque no se limitan, a la técnica de los hibridomas originalmente descrita por Kohler et al. Nature. 1975; 256(5517):495-7; la técnica del hibridoma de linfocitos B humanos (Cote et al Proc Natl Acad Sci USA. 1983; 80(7):2026-30); y la técnica del hibridoma EBV (Cole et al., 1985, en "Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy", Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase por ejemplo la patente de Estados Unidos 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios dirigidos contra IF1. Los anticuerpos útiles en la práctica de la presente invención también incluyen los dirigidos contra IF1, que incluyen pero no se limitan a fragmentos F(ab')₂, que se pueden generar mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo, y fragmentos Fab, que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos F(ab')₂. Como alternativa, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab o scFv para permitir una rápida identificación de los fragmentos que tienen la especificidad deseada contra IF1. Por ejemplo, se pueden usar bibliotecas de expresión de anticuerpos en fagos. En tal procedimiento, fragmentos Fab monocatenarios (scFv) o fragmentos Fab, se expresan sobre la superficie de un bacteriófago adecuado, por ejemplo, M13. En resumen, las células del bazo de un hospedador adecuado, por ejemplo, ratón, que se ha inmunizado con una proteína, se extirpan. Las regiones de codificación de las cadenas VL y VH se obtienen de dichas células que producen el anticuerpo deseado contra la proteína. A continuación, estas regiones de codificación se fusionan con un extremo de la secuencia del fago. Una vez que el fago se inserta en un transportador adecuado, por ejemplo, bacterias, la fago expresa el fragmentos de anticuerpo. La expresión de anticuerpos en fagos se puede proporcionar también por métodos combinatorios conocidos por los expertos en la materia. Los fragmentos de anticuerpo expresados en un fago pueden usarse a continuación como parte de un inmunoensayo.

En otra realización, el ligando puede ser un aptámero. Los aptámeros son una clase de molécula que representa una alternativa a los anticuerpos en términos de reconocimiento molecular. Los aptámeros son secuencias de oligonucleótidos u oligopéptidos con la capacidad de reconocer prácticamente cualquier clase de moléculas diana con elevada afinidad y especificidad. Dichos ligandos se pueden aislar mediante evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX) de una biblioteca de secuencias aleatorias, como se describe en Tuerk et al. (1990) Science, 249, 505-510. La biblioteca de secuencias aleatorias se puede obtener mediante síntesis química combinatoria del ADN. En esta biblioteca, cada miembro es un oligómero lineal, eventualmente modificado químicamente, de una secuencia única. Las posibles modificaciones, usos y ventajas de esta clase de moléculas se han revisado en Jayasena 1999. Los aptámeros peptídicos consisten en regiones variables de anticuerpos conformacionalmente restringidas expresados en una plataforma proteica, como tioxirredoxina A de E. coli, que se selecciona a partir de bibliotecas combinatorias mediante dos métodos híbridos (Colas et al. (1996) Nature, 380, 548-50).

Los ligandos de la invención, tales como anticuerpos o aptámeros, se pueden marcar con una molécula o sustancia detectable, tal como una molécula fluorescente, una molécula radioactiva u otras etiquetas conocidas en la materia. Se conocen en la técnica etiquetas que proporcionan de forma general una señal (tanto directa como indirectamente).

Tal como se usa en el presente documento, el término "marcado", con respecto al ligando, pretende abarcar el marcado directo del anticuerpo o aptámero mediante el acoplamiento (es decir, el enlace físico) de una sustancia detectable, tal como un agente radioactivo o un fluoróforo (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) o indocianina (Cy5)) con el anticuerpo o aptámero, así como un marcado indirecto de la sonda o el anticuerpo por reactividad con una sustancia detectable. Un anticuerpo o aptámero de la invención puede estar marcado con una molécula radioactiva por algún método conocido en la técnica. Por ejemplo, las moléculas radioactivas incluyen, pero no se limitan a los átomos radiactivos para estudios de gammagrafía tales como I123, I124, In111, Re186, Re188.

Los ensayos anteriormente mencionados implican por lo general la unión del ligando (es decir, el anticuerpo o aptámero) a un soporte sólido. Los soportes sólidos que se van a utilizar en la práctica de la invención incluyen sustratos tales como nitrocelulosa (por ejemplo, en forma de membrana o pocillo de microtitulación); poli(cloruro de vinilo) (por ejemplo, láminas o pocillos de microtitulación); látex de poliestireno (por ejemplo, perlas o placas de microtitulación); poli(fluoruro de vinilideno); papel diazotado; membranas de nylon; perlas activadas, perlas magnéticamente sensibles, y similares. Más particularmente, se puede usar un método ELISA, en el que los pocillos de una placa de microvaloración se revisten con un conjunto de anticuerpos dirigidos contra IF1.

Una muestra de fluido corporal que contiene o con la sospecha de contener IF1 se añade a continuación a los pocillos revestidos. Después de un período de incubación suficiente para permitir la formación de los complejos de ligando-IF1, la una o más placas se pueden lavar para eliminar el material no unido y se añade una molécula de unión secundaria marcada. Se deja que la molécula de unión secundaria reaccione con cualquier proteína marcadora capturada en la muestra, se lava la placa, y se detecta la presencia de la molécula de unión secundaria usando métodos bien conocidos en la técnica.

Como ligando, la molécula de unión secundaria puede estar marcada.

Se han descrito en la materia diferentes inmunoensayos, tales como el radioinmunoensayo o el ensayo ELISA.

La medición de la concentración de IF1 con o sin métodos basados en inmunoensayos puede incluir también la separación de las proteínas: centrifugación basada en el peso molecular de la proteína; electroforesis basada en la masa y en la carga; HPLC basada en la hidrofobicidad; cromatografía de exclusión molecular dependiendo del tamaño; cualquier afinidad en fase sólida basada en la afinidad de la proteína por la fase sólida concreta que se utilice. Una vez separado, IF1 se puede identificar basándose en un "perfil de separación" conocido, por ejemplo, tiempo de retención, para dicha proteína que se mide usando técnicas convencionales. Como alternativa, las proteínas separadas se pueden detectar y medir mediante, por ejemplo, un espectrómetro de masas.

La concentración de IF1 también se puede determinar midiendo la actividad de la F₁-ATPasa usando un sistema con regeneración de ATP que se ha descrito anteriormente (van Raaij MJ et al., (1996)). Una unidad de IF1 se define como la cantidad que inhibe 0,2 U de la ATPasa en un 50%, donde 1 U de ATPasa hidroliza 1 μmol de ATP/min. La actividad de IF1 se puede analizar para determinar la inhibición de la ATPasa tanto de partículas submitocondriales bovinas que han sido privadas de IF1 endógeno, o bien de F₁-ATPasa aislada, sin nucleótidos y exenta de inhibidores, (van Raaij MJ et al., (1996)).

En una realización preferida, el método para medir el nivel de IF1 comprende la etapa de poner en contacto la muestra de líquido cefalorraquídeo con un ligando capaz de interactuar selectivamente con IF1 para permitir la formación de un complejo ligando-IF1.

En una realización más preferida, el método de acuerdo con la invención comprende además las etapas de separar cualquier material no ligado de la muestra de sangre o de la muestra de líquido cefalorraquídeo del complejo ligando-IF1, poner en contacto el complejo ligando-IF1 con una molécula de unión secundaria marcada, separar cualquier molécula de unión secundaria no unida de los complejos de molécula de unión secundaria-IF1 y medir el nivel de la molécula de unión secundaria en los complejos de molécula de unión secundaria-IF1.

La invención también proporciona el uso de un kit que comprende medios para medir el nivel de IF1 en una muestra de fluido corporal para llevar a cabo los métodos de acuerdo con la invención.

El kit puede comprender un soporte sólido, un ligando capaz de interactuar selectivamente con IF1 que está unido a dicho soporte sólido, y un ensayo para medir el nivel del complejo ligando-IF1.

En una realización preferida, el ligando de la invención es un anticuerpo que se une al IF1 en circulación.

Tal como se usa en el presente documento, IF1 en circulación se refiere a IF1 que se encuentra en un líquido corporal de un sujeto, en particular, dentro de la circulación sanguínea.

Algunos anticuerpos contra IF1 no se unen a IF1 en circulación. Por ejemplo, el anti-IF1 comercialmente disponible de Invitrogen del clon ID 5ED7, no se une al F1 en circulación.

Para analizar si un anticuerpo dirigido contra IF1 se une al IF1 en circulación, el anticuerpo dirigido contra IF1 se debe analizar mediante inmunoprecipitación, como se describe, por ejemplo, en Plosone, septiembre de 2011, de Genoux A. et al.

Por ejemplo, la inmunoprecipitación del IF1 en circulación se puede llevar a cabo con el kit de inmunoprecipitación Pierce H Crosslink (Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 10 mg de anticuerpo dirigido contra IF1 a analizar se reticulan covalentemente sobre resina de proteína A/G y se incuban a continuación durante la noche con 2 mg de 500 mg de proteínas de un suero enriquecido en proteínas poco abundantes. 2 mg de IF1 recombinante (rIF1) o 500 mg de proteínas de células HepG2 tras la lisis celular se puede usar control positivo.

Tras el lavado, las proteínas unidas se eluyen en glicina 0,2 M pH 2,8 y se añade tampón de muestra 56 Laemmli. La presencia de IF1 se controla en las fracciones eluidas.

En una realización preferida, el kit es para un ELISA.

Método de diagnóstico:

La invención proporciona un también un método para evaluar el riesgo de un sujeto de tener una enfermedad cardiovascular que comprende la etapa de medir el nivel del IF1 en una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en la que el nivel de IF1 está correlacionado negativamente con el riesgo de dicho sujeto de tener una enfermedad cardiovascular.

De hecho, además de haber descubierto que IF1 está en circulación, los inventores también han demostrado que el nivel de IF1 en circulación también está correlacionado negativamente con el riesgo de ECV.

Un nivel alto de IF1 es predictivo de un bajo riesgo de tener una enfermedad cardiovascular.

Un nivel bajo de IF1 es predictivo de un riesgo alto de tener una enfermedad cardiovascular.

- 5 En una realización preferida, la muestra de fluido corporal es una muestra de sangre (por ejemplo, una muestra de sangre completa, una muestra de suero, o una muestra de plasma).

Típicamente, un nivel alto o bajo de IF1 se obtiene por comparación con una mediana de valor de control o por comparación, respectivamente, con un valor de control superior o inferior.

- 10 Dichos valores de control se pueden determinar con respecto al nivel de IF1 presente en muestras tomadas de uno o más sujetos sanos o de la distribución de IF1 en una población de control.

- 15 En una realización, el método de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de comparar dicho nivel de IF1 con un valor de control superior y/o inferior en el que un nivel de IF1 por encima de dicho valor de control superior es predictivo de un bajo riesgo de tener una enfermedad cardiovascular y un nivel de IF1 por debajo de dicho valor de control inferior es predictiva de un alto riesgo de tener una enfermedad cardiovascular.

- 20 Los valores de control pueden depender de varios parámetros tales como los métodos utilizados para medir el nivel de IF1 o el sexo del sujeto.

- 25 Típicamente, para un nivel de IF1 en una muestra de suero medido usando un inmunoensayo competitivo con un anticuerpo policlonal sensibilizado contra IF1 humano, un nivel de IF1 superior a 0,65 µg/ml, a 0,7 µg/ml, a 0,75 µg/ml, a 0,8 µg/ml o de 0,85 µg/ml es predictivo de un bajo riesgo de tener una enfermedad cardiovascular, y un nivel de IF1 inferior a 0,45 µg/ml, a 0,4 µg/ml, a 0,35 µg/ml, a 0,3 µg/ml, a 0,25 µg/ml es predictivo de un alto riesgo de tener una enfermedad cardiovascular.

- 30 Esta correlación entre el nivel de IF1 y el riesgo de tener una ECV es independiente de marcadores ambientales del riesgo de ECV tales como la actividad física, tabaquismo, etc...

Por lo tanto, IF1 es un marcador nuevo y eficaz del riesgo de ECV.

- 35 En una realización, no se sabe, por otra parte, que el sujeto esté en riesgo elevado de tener una enfermedad cardiovascular.

El método de acuerdo con la invención también se puede combinar con otros métodos para evaluar el riesgo de tener una enfermedad cardiovascular. Los ejemplos de dichos métodos son bien conocidos en la técnica.

- 40 Los métodos clásicos para evaluar los factores de riesgo incluyen, aunque sin limitación, evaluación de los antecedentes médicos personales y/o familiares de ECV, consumo de tabaco, mediciones de la presión arterial, glucosa en plasma, colesterol de lipoproteína de baja densidad (LDL) y lipoproteína de alta densidad (HDL), colesterol, triacilglicéridos y similares.

- 45 En particular, los niveles de IF1 proporcionarán valor predictivo adicional en aquellos pacientes con bajos niveles de HDL-colesterol y/o apolipoproteína A-I.

- 50 La presente invención también se refiere a un método para evaluar la gravedad de una enfermedad cardiovascular en un sujeto que tiene dicha enfermedad cardiovascular que comprende la etapa de medir el nivel de IF1 en una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en la que el nivel de IF1 está correlacionado negativamente con la gravedad de la enfermedad cardiovascular en dicho sujeto.

- 55 De hecho, los inventores han descubierto que en un análisis bivarianza, la puntuación Gensini promedio, que refleja la gravedad de la arteriopatía coronaria, disminuye regularmente a medida que las concentraciones plasmáticas de IF1 son más elevadas.

- 60 La puntuación de Gensine es uno de los ensayos más utilizados para estimar la gravedad de la arteriopatía coronaria (AC), tal como se define anteriormente. Combina el número de estenosis observadas, recibiendo cada una un número de puntuación según la importancia del estrechamiento y un coeficiente que refleja la localización de la lesión en el árbol de la coronaria (Gensini GG. (1983)). Estos resultados se confirmaron mediante angiografía, otro método para evaluar la gravedad de una enfermedad cardiovascular. La angiografía objetiviza la gravedad de las lesiones en la arteria coronaria. Los angiogramas se interpretan por dos operadores independientes. Se pueden calcular diferentes puntuaciones teniendo en cuenta el número de estenosis, el grado de estrechamiento intraluminal y la importancia geográfica de la estenosis en el árbol de la coronaria.

- 65 El método para evaluar la gravedad de una enfermedad cardiovascular de acuerdo con la invención se podría combinar con otros métodos bien conocidos, tal como la puntuación de Gensini o para cada estenosis coronaria, el

grado de estrechamiento luminal y su importancia geográfica.

La presente invención también se refiere a un método para controlar el efecto de una terapia para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto que comprende la etapa de medir el nivel de IF1 en una primera muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en t1 y medir el nivel IF1 en una segunda muestra de fluido obtenida de dicho sujeto en t2 en la que cuando t1 es anterior a la terapia, t2 es durante o después de la terapia, y cuando t1 es durante la terapia, t2 es posterior durante la terapia o después de la terapia, y en el que un aumento en el nivel de IF1 en la segunda muestra en comparación con el nivel de IF1 en la primera muestra es indicativo de un efecto positivo de la terapia sobre la enfermedad cardiovascular del sujeto tratado.

Además de las terapias actuales con estatinas para la enfermedad cardiovascular, se han desarrollado terapias de HDL. Estas terapias están destinadas a aumentar el nivel de HDL. De hecho, como se ha descrito anteriormente, existe una correlación inversa entre HDL y el riesgo de ECV. Por tanto, se ha divulgado que aumentar el HDL 1 mg/dl reduce el riesgo de ECV en 2 o 3% (Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989; 321: 1311-1316; Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease: The Framingham Study. *Ann Epidemiol.* 1992; 2: 23-28).

Existen diferentes enfoques terapéuticos para la terapia de HDL. Muchos enfoques se destinan a aumentar el nivel de HDL o de apolipoproteína A-I (apoA-I), la principal apolipoproteína ateroprotectora del HDL. Podría esperarse que la infusión parenteral de apoA-I o apoA-I con bajo contenido en lípidos de longitud completa asociada con una mezcla de fosfolípidos tuviera efectos beneficiosos de forma que, con infusiones repetidas, pudiera tener un impacto favorable sobre la aterosclerosis (Nissen SE et al., (2003)). La deslipidación selectiva del HDL *ex-vivo*, que genera apoA-I pobre en lípidos es una estrategia alternativa; en este modelo, el HDL deslipidado se vuelve a infundir en el paciente lo que disminuiría el desarrollo de la aterosclerosis (Waksman R et al., (2010)). Los miméticos de la ApoA-I son otros enfoques terapéuticos para la terapia de HDL. Estos miméticos de apoA-I son péptidos anfipáticos pequeños de 18-22 aminoácidos basados en cierta medida en la secuencia de la apoA-I que tiene propiedades similares a apoA-I, incluidas las habilidades para favorecer la eliminación del exceso de colesterol de los tejidos (Navab M et al., (2005)). Una ventaja importante de estos péptidos miméticos de la apoA-I respecto a la apoA-I de longitud completa es que es más barata y fácil de fabricar como molécula terapéutica.

Se han identificado algunos miméticos de ApoA-I; estos incluyen ETC-216 de Esperion, D-4F de Kos Pharmaceuticals, AVP-26452 de Astrazeneca. Los ejemplos de estos fármacos se divulgan en Navab M et al. (2005); Garber DW et al. (2001); Navab M et al. (2004); Navab M et al. (2006) y el documento WO2010093918.

La mayoría de fármacos conocidos que inhiben la degradación del HDL son inhibidores de CETP. La expresión "inhibidores de CTP" se refiere a compuestos que inhiben el transporte mediado por la proteína de transferencia del éster de colesterilo (CETP) de diferentes ésteres de colesterilo y triglicéridos desde HDL al LDL y VLDL.

Los inhibidores de la CETP son bien conocidos de los expertos en la materia. Los ejemplos de patentes que divulgan inhibidores de CETP son WO2009071509, WO2009059943, WO2008082567, EP2007726, EP1973889, US 6.140.343, US 6.197.786, 6.723.752, WO 2006/014357; WO2006/014413, WO2007/079186, EP1670765 o US 5,512,548.

Se han identificado varios inhibidores químicos de CETP eficaces; estos incluyen torcetrapib (Pfizer, New York, NY, EE.UU.), dalcetrapib (anteriormente denominado como RO4607381/JTT-705, Roche/Japan Tobacco, Basel, Suiza), y anacetrapib (MK-0859, Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, EE.UU.). Un vistazo molecular al mecanismo de acción de estos inhibidores ha sido posible como resultado de la estructura cristalina de la CETP (véase por ejemplo, et al., *European Heart Journal* (2010) 31, 149-164 para revisión).

La invención también se refiere a un agente que aumenta el nivel de HDL seleccionado del grupo que consiste en apoA-I baja en lípidos, apoA-I asociada con una mezcla de fosfolípidos, miméticos de apoA-I e inhibidores de CETP para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto que tiene un bajo nivel de IF1 en sangre.

Típicamente, se obtiene una muestra de fluido corporal del sujeto y se mide en esta muestra el nivel de IF1, junto con la evaluación de lípidos plasmáticos, HDL y LDL-colesterol y/o apolipoproteínas A-I y B. Por supuesto, los análisis estadísticos revelaron que el aumento en los niveles de IF1 sería especialmente beneficioso en aquellos pacientes que presenten niveles bajos de HDL-colesterol y/o apolipoproteína A-I.

En una realización preferida, la enfermedad cardiovascular es una arteriopatía coronaria.

En una realización preferida, la enfermedad cardiovascular es aterosclerosis.

La invención también se refiere al uso de IF1 como marcador del riesgo cardiovascular.

La invención se ilustrará adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos.

Descripción de las figuras

Figura 1: Curva patrón típica usada para la cuantificación de IF1.

Figura 2: Distribución de frecuencia de IF1 entre la población general. Histograma de densidades, con el gráfico de densidad normal de IF1. IF1 se midió en 669 controles con edades comprendidas entre 45-74.

Figura 3: Riesgo relativo de la ECV en función de IF1.

Figura 4: Riesgo relativo de ECV en función de IF1 tras ajuste según educación, actividad física, hábitos de tabaquismo y alcohol, diabetes, dislipidemia, hipertensión, niveles de proteína C reactiva (CRP) y de apoA-I.

Figura 5: Gravedad de las lesiones coronarias en función de IF1 - puntuación de Gensini

Figura 6: Gravedad de las lesiones coronarias en función de IF1 - fracción de eyección del ventrículo izquierdo (%)

Ejemplo

Materiales y métodos

Tratamiento de muestra para análisis mediante espectrometría de masas

100 µl de suero de 10 individuos seleccionados entre la población general de la cohorte GENES se combinaron entre sí. El estudio GENES es una investigación de los determinantes genéticos y ambientales de la arteriopatía coronaria realizado en el marco de un control de casos seccional amplio en el Toulouse University Hospital.

Esta combinación de plasmas se prefraccionó a continuación con el kit ProteoMiner™ (Bio-Rad Laboratories) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La concentración de proteínas en la muestra fue de 2,5 g/l. La muestra de plasma ecualizado se almacenó a -80 °C hasta el análisis por espectrometría de masas.

El volumen total de elución ProteoMiner™ de la muestra de plasma se diluyó en tampón de muestra Laemmli. La reducción y alquilación de las cisteínas se llevó a cabo mediante 1 h de incubación a temperatura ambiente (DTT 20 mM estaba incluido en el tampón de muestra Laemmli) seguido por la adición de yodoacetamida 90 mM durante 30 min a temperatura ambiente en la oscuridad. A continuación, la muestra se cargó en cuatro hileras de un gel de acrilamida SDS-PAGE al 15% y otras cuatro hileras se cargaron en el mismo gel con 5 µg de IF1 humano recombinante, rIF1. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de Coomassie y se cortaron cuatro bandas visibles correspondientes a rIF1. En paralelo, se cortó un porta con el mismo tamaño molecular de rIF1 para cada una de las cuatro hileras de muestra de palma. Los portas de gel se lavaron con tres de lavado con bicarbonato de amonio 100 mM durante 15 min a 37 °C seguido por un segundo lavado en bicarbonato de amonio 100 mM, acetonitrilo (1:1) durante 15 min a 37 °C. Las proteínas se digirieron incubando cada porta de gel con 0,6 µg de tripsina de calidad secuenciación modificada (Promega) en bicarbonato de amonio 50 mM durante la noche a 37 °C. Los péptidos resultantes se extrajeron del gel mediante tres etapas que se combinaron entre sí: una primera incubación en bicarbonato de amonio 50 mM durante 15 min a 37 °C y dos incubaciones en ácido fórmico al 10%, acetonitrilo (1:1) durante 15 min a 37 °C, y se combinaron entre sí. Las cuatro extracciones de péptidos correspondientes a la misma muestra inicial (rIF1 o muestra de plasma) se combinaron y se secaron en un SpeedVac, y se resuspendieron en acetonitrilo al 5%, ácido trifluoroacético al 0,05%.

Análisis dirigido mediante seguimiento de reacciones múltiples

La mezcla de péptidos de rIF1 se usó para la optimización de la detección del IF1 humano mediante nanoCL/EM en modo seguimiento de reacciones múltiples (MRM) usando un sistema Ultimate3000 (Dionex, Ámsterdam, Países Bajos) acoplado con un espectrómetro de masas 5500 QTrap (AB Sciex, Foster City, CA, EE.UU.). 1 pmol de rIF1 se cargó en una precolumna C18 (300 µm de diámetro interno x 5 mm, Dionex, Ámsterdam, Países Bajos) a 20 µl/min en acetonitrilo al 2%, ácido trifluoroacético al 0,05%. Después de 3 min de desalado, la precolumna se cambió en línea por la columna analítica (75 µm diámetro interno x 15 cm de tubo capilar de sílice empaquetado con fase Reprosil-Pur C18-AQ 3 µm, Dr. Maisch, GmbH, Alemania) equilibrada en 100% de disolvente A (5% de acetonitrilo, 0,2% de ácido fórmico). Los péptidos se eluyeron usando un gradiente 0-50% de disolvente B (80% de acetonitrilo, 0,2% de ácido fórmico) durante 25 min a un caudal de 300 nl/min. El 5500 QTrap funcionó en modo MRM junto con el programa informático Analyst (versión 1.5.1, AB Sciex, Foster City, CA, EE.UU.). Los cuatro péptidos del IF1 humano que proporcionaron las señales más intensas se supervisaron en MRM con los cuadrupolos Q1 y Q3 configurados en resolución unidad, las energías de colisión óptima y los potenciales de rotura de clústeres se determinaron para tres transiciones progenitor/fragmento para cada péptido. Durante el análisis, las adquisiciones EMEM de barrido completo (EPI, Enhanced Product Ion) también se iniciaron cuando la señal MRM superó las 200 cuentas, con una tolerancia de masa de 250 mDa, la trampa de iones lineal (LIT) se configuró a un tiempo de llenado fijo de 150 ms. Un tercio del extracto de péptidos procedente de la muestra de plasma se cargó a continuación en el sistema análogamente al rIF1, y el análisis con el 5500QTrap se llevó a cabo de la misma forma (MRM+EPI) con la lista de transición optimizada. Se llevó a cabo un análisis en blanco en las mismas condiciones antes de analizar la muestra de plasma para garantizar la no contaminación del sistema nanoCL por el rIF1.

Búsqueda en la base de datos

El programa informático Mascot Daemon (versión 2.3.2, Matrix Science, Londres, RU) se usó para realizar las búsquedas en la base de datos. Para extraer automáticamente listas de picos de los archivos Analyst wiff, se usó la macro Mascot.dll (versión 1.6b27) proporcionada por Analyst y se configuró para no agrupamiento de los barridos EM/EM. Se buscaron datos de entrada de Homo sapiens en la base de datos de proteínas Uniprot (versión de septiembre de 2010 - 96635 secuencias). La carbamidometilación de las cisteínas se configuró como modificación fija, y la oxidación de las metioninas y la desamidación de las asparaginas y glutaminas se configuró como las modificaciones variables para búsquedas Mascot. La especificidad de la digestión con tripsina se estableció para la escisión tras Lys o Arg salvo antes de Pro, y se permitió la falta de dos sitios de escisión de tripsina. Las tolerancias másicas en EM y EM/EM se configuraron a 0,6 Da, y la configuración del instrumento se especificó como "ESI-QUAD".

Construcción el plásmido de expresión bacteriana.

La secuencia que codifica el péptido maduro de la IF1 humana, sin la secuencia de la señal dirigida a la mitocondria (MTS), se amplificó mediante la PCR a partir de ADNc de células HeLa. El fragmento amplificado se introdujo a continuación en sitios de restricción BamHI/HindIII en el vector de expresión VariFlex pBEn-SBP-SET1-Qa (Stratagene) que contiene la secuencia de codificación del péptido de unión a estreptavidina (SBP tag) y un sitio de escisión de trombina proteasa para permitir la fusión del SPB tag al extremo N de la secuencia codificante de la proteína clonada. El plásmido de expresión resultante, que contiene el IF1 humano maduro completo, se verificó mediante secuenciación de ADN y se nombró como pBEn-SBP-IF1.

Expresión en exceso del IF1 humano en Escherichia coli.

Una colonia de células de E. coli BL21 (DE3) recientemente transformadas se inoculó en 30 ml de medio caldo Terrific (Ozyme) que contenía 100 µg/ml de ampicilina. El cultivo se hizo crecer durante la noche con agitación en un matraz de 1 l a 37°C. La expresión de la proteína se indujo mediante adición de 150 ml de medio caldo Terrific que contenía IPTG 100 mM, y el crecimiento continuó durante 3-4 h más. Las bacterias se centrifugaron a (7000 g, 15 min, 4°C) y el aglomerado bacteriano se mantuvo a -20°C.

Purificación de IF1 humano expresado de forma bacteriana.

Todos los procedimientos se llevaron a cabo a 4 °C. El aglomerado celular que contenía la proteína IF1 recombinante se volvió a suspender en 20 ml de tampón de lisis (NaCl 0,5 M, sacarosa 0,7 M, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, β-mercaptoetanol 5 mM, 1x coctel inhibidor de la proteasa Roche) después se sonicó 3 veces durante 100 s. Las proteínas recombinantes fueron solubles en la fracción citoplásmica que se clarificó mediante centrifugación de alta velocidad (130 000 g, 1 h, 4°C). El sobrenadante de células rotas que contenía IF1 se diluyó en tampón de unión (carbonato de amonio 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 10,0) hasta una concentración final de 1 mg/ml y se filtró a través de un filtro de 0,22 µm y después se aplicó a 1 ml/min a una columna HiTrap™ Streptavidin HP 1 ml (GE Healthcare) equilibrada con tampón de unión. La columna se lavó hasta que la densidad óptica a 280 nm alcanzó 0,1, después, el IF1 se evaluó de la columna en tampones de elución de guanidina 6 M. Las fracciones combinadas que contenían la proteína IF1 fusionada con SBP tag se dializaron 3 veces contra tampón de escisión de trombina (Tris-HCl 20 mM pH 8,4, NaCl 150 mM, CaCl₂ 2,5 mM) y se añadió trombina (10 U/mg de proteína) durante la noche a TA para escindir el SPB tag. A continuación, la muestra se cargó en una columna HiTrap™ Streptavidin HP 1 ml y el IF1 puro se encontró en la fracción de flujo pistón. El IF1 recombinante humano fue > 95% puro tal como se determina mediante SDS-PAGE (no se muestran los datos).

Preparación del antisuero de IF1

Se sensibilizó un anticuerpo policlonal en conejos New Zealand White contra el IF1 recombinante humano. La IgG sérica total se purificó a partir de suero mediante cromatografía de afinidad con el uso de columnas de proteína A Sepharose CL-4B (GE healthcare), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La pureza de las fracciones de IgG se evaluaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE). La IgG específica contra IF1 se purificó a partir de la IgG sérica total mediante cromatografía de afinidad con el uso de la columna IF1.

Immunofluorescencia

Células HeLa cultivadas sobre cubreobjetos se incubaron con Mitotracker durante 30 min a 37°C cuando se indique. Posteriormente, las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4% y se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,1% durante 60 min. Tras saturación de los sitios no específicos con PBS que contenía FCS al 10%, las células se incubaron en primer lugar con el anticuerpo primario (anticuerpo monoclonal dirigido contra alfa ATP sintasa de Invitrogen; anticuerpo policlonal dirigido contra IF1) a continuación con anticuerpos secundarios marcados fluorescentemente de Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META confocal provisto de un objetivo Plan-Apochromat de 63 aumentos.

Análisis SPR (Biacore).

El anticuerpo dirigido contra IF1 purificado se inmovilizó mediante unión con amina en chips CM5 (Biacore AB) tras la activación del NHS-EDC. La unión se analizó en un aparato Biacore 3000. Concentraciones crecientes de IF1 recombinante humano se inyectaron a un caudal de 20 µl/min, expuesto a la superficie durante 175 s (fase de asociación), seguido por 200 s de caudal circulante durante el cual se produjo la disociación. Entre inyecciones, para recuperar el nivel inicial previo a la unión, la superficie del chip detector se regeneró mediante una inyección de 5 µl de SDS al 0,01% (15 s de tiempo de contacto). El valor de Kd aparente, se calculó con el programa informático CLAMP (Myszka DG, Morton TA, CLAMP: a biosensor kinetic data analysis program, Trends Biochem Sci. abril de 1998; 23(4):149-50).

Inmunoensayo de IF1

Se diseñó un ensayo competitivo para cuantificar IF1 en suero humano. Los pocillos de placas Polysorb ELISA de 96 pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca) se revistieron con 100 µl de IF1 humano recombinante (0,5 µg/ml) diluido en tampón bicarbonato (0,1 M, pH = 9,6). Las placas se incubaron durante la noche a temperatura ambiente (TA) para permitir la unión completa. Las muestras de suero se descongelaron a temperatura ambiente y se centrifugaron (2 000 x g, 10 min). 50 µl de suero de cada sujeto (diluido con 50 µl de PBS 1X), o 100 µl de cada IF1 recombinante humano patrón (0; 0,025; 0,050; 0,075; 0,1; 0,3; 1 y 2,5 µg/ml), se incubaron con 100 µl de anticuerpo policlonal dirigido contra IF1 biotinilado (dilución: 1/1000 en PBS-Tween tampón 0,05%-1% BSA) durante la noche a 4°C. A continuación las placas se lavaron 3 veces con tampón PBS pH 7,4/Tween 20 al 0,05% y se incubaron con 200 µl por pocillo de tampón de bloqueo (tampón PBS pH 7,4/BSA al 3%) durante 1 hora a TA. Después de lavar con PBS 3 veces, las mezclas de muestra/anticuerpo se añadieron a los pocillos y se incubaron durante 4 horas a TA. Las placas se volvieron a lavar y se incubaron con 100 µl por pocillo de estreptavidina-HRP (dilución: 1/5000 en tampón PBS pH 7,4%-Tween 0,05%-1% BSA) (Invitrogen, Cergy Pontoise, Francia) durante 1 hora a TA. Después de lavar 3 veces con tampón PBS-Tween 0,05%, las placas se incubaron con 200 µl por pocillo de sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 20 minutos a TA. La reacción se detuvo con 50 µl por pocillo de HCl 1 N, y las placas se leyeron a continuación a 450 nm en un lector de microplacas (Varioscan Flash, Thermo electron corporation). Se restó la densidad óptica a 570 nm (fondo). Las concentraciones de muestra se determinaron usando el ajuste de la curva patrón (tipo de ajuste: logístico de 4 parámetros). La Figura 1 muestra la curva patrón típica, en el intervalo de 0,025 a 2,5 µg de IF1/ml. Se obtuvo un desplazamiento del cincuenta por ciento para una concentración de 0,4 µg/ml. La repetibilidad (el mismo día) y la reproducibilidad (10 mediciones durante un periodo de 6 meses) proporcionó coeficientes de variación del 6-7%. En los experimentos de dilución se midió una recuperación promedio del 96,8%. La resistencia al a congelación y descongelación se evaluó en diferentes ocasiones, con una concordancia del 95% - 103% entre las mediciones. Con respecto a las posibles correlaciones de IF1 con los marcadores de HDL, los experimentos de competición con las apolipoproteínas A-I y A-II purificadas indicó ausencia de reactividad cruzada en este inmunoensayo.

Sujetos ECV y sujetos de control

El IF1 sérico se evaluó tanto en la población general como en sujetos con enfermedad cardiovascular (ECV). La evaluación se llevó a cabo en el contexto del GENES. Se había constituido una colección de muestras biológicas (declarada como DC-2008-403 n.º 1 en el Ministry of Research y en la Regional Health Agency).

Los casos eran sujetos ingresados por un primer episodio coronario, tanto angina de pecho inestables o infarto de miocardio definido. Todos los casos se evaluaron según un protocolo estricto, que incluía criterios clínicos, electrocardiográficos, biológicos y angiográficos. Se exploraron para la evaluación de los factores de riesgo después de ≥ 3 meses de espera tras el evento de ECV. Los controles se seleccionaron de forma aleatoria entre la población general, usando censos electorales. Los casos y los sujetos de control se emparejaron por edad. En conjunto, la cohorte incluyó 791 sujetos varones con ECV y 817 controles emparejados por edad, con edades de 45-75. Se recogieron datos sobre hábitos alimentarios, actividad física, consumo de tabaco y alcohol, nivel educativo. La presencia de dislipidemia, diabetes o hipertensión se evaluó tanto a partir de los tratamientos actuales de los sujetos o de la evaluación clínica y biológica del sujeto durante la investigación. La investigación clínica incluyó variables antropométricas, tensión sanguínea y frecuencia cardíaca, y para los casos de ECV, una evaluación cardiológica completa. Las mediciones biológicas se centraron en lípidos y lipoproteínas, glucosa e insulina, gamma GT y CRP sensible. El IF1 sérico se midió en los primeros 669 controles y 648 casos.

Resultados**Caracterización de IF1 en plasma humano**

La presencia de IF1 en suero humano se demostró sin ambigüedades mediante análisis por espectroscopia de masas.

Caracterización del anticuerpo dirigido contra IF1

La interacción del IF1 recombinante humano (rIF1) con el anticuerpo policlonal dirigido contra IF1 se controló mediante análisis por resonancia de plasmón superficial (SPR). En estas condiciones, rIF1 se unió específicamente al anticuerpo dirigido contra IF1 inmovilizado en chips SPR (KD = 6,1 nM). Para evaluar adicionalmente la especificidad del anticuerpo dirigido contra IF1, se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia sobre células HeLa. El inmunomarcado usando el anticuerpo dirigido contra IF1 mostró un patrón mitocondrial característico. Esto se confirmó adicionalmente mediante localización simultánea de la tinción de IF1 con marcadores mitocondriales como MitoTracker o la subunidad alfa de la ATP sintasa. Estos datos indican que el anticuerpo dirigido contra IF1 fue capaz de reconocer específicamente el IF1 mitocondrial endógeno.

Niveles séricos de IF1 en la población general

La representación gráfica de los niveles de IF1 en la población general de varones evidenció una distribución normal, con un valor de mediana a 0,53 µg/ml y un intervalo de confianza del 95% de 0,24-0,82 µg/ml. (Fig. 2)

Correlación con los parámetros de lípidos del plasma

Se investigó la correlación entre los niveles de IF1 y los niveles de lípidos en plasma. El IF1 plasmático se correlacionó positivamente con el colesterol HDL, apo A-I y niveles de lipopartícula AI, y negativamente con los triglicéridos, apolipoproteína B y lipoproteínas que contienen apolipoproteína B. IF1, HDL-C y apo A-I se correlacionaron negativamente con el índice de masa corporal y la circunferencia de la cintura. Varios factores ambientales, como el tabaquismo, consumo de alcohol y la actividad física o una dolencia inflamatoria documentada por una elevación en CRP, mostraron las correlaciones esperadas con HDL-C o apo A-I. Por el contrario, las correlaciones de esos factores con IF1 fueron malas o estaban ausentes (Tabla I). Esto indica que las correlaciones entre IF1 y los marcadores del HDL son independientes de las variables ambientales.

Tabla 1: Correlación entre IF1, apoA-I y colesterol HDL y otros factores de riesgo en la población general (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

Parámetros	Correlación de intervalo de Spearman con IF1 (mg/l), p	Correlación de intervalo de Spearman con apoA-I (g/l), p	Correlación de intervalo de Spearman con colesterol HDL (g/l), p
colesterol HDL (g/l)	0,24, ***	0,82, ***	1
ApoA-I (g/l)	0,27, ***	1	0,82, ***
ApoB (g/l)	-0,17, ***	-0,07, NS	-0,15, ***
Triacilglicéridos (g/l)	-0,25, ***	-0,19, ***	-0,48, ***
LpB:CIII (mg/l)	-0,14, ***	-0,06, NS	-0,34, ***
Lp B:E (mg/l)	-0,26, ***	-0,21, ***	-0,25, ***
Índice de masa corporal (BMI)	-0,17, ***	-0,20, ***	-0,33, ***
Tensión arterial sistólica (mmHg)	-0,02, NS	0,01, NS	-0,08, *
Puntuación de actividad física	0,01, NS	0,09, *	0,20, ***
Alcohol (g/día)	0,09, *	0,28, ***	0,20, ***
Cigarrillos (/día)	-0,03, NS	-0,10, *	-0,10, *
CRP (mg/l)	-0,01, NS	-0,13, ***	-0,19, ***

Esta hipótesis se confirmó mediante análisis multivariable realizado entre los sujetos de control. Cuando apo A-I se consideró como la variable dependiente en modelos estadísticos que incluyen IF1, se descubrieron determinantes conocidos, como el tabaquismo, consumo de alcohol, actividad física, IMC, estado de inflamación o presencia de una dislipidemia patente. Sin embargo, IF1 se identificó como un fuerte determinante positivo para las concentraciones de apoA-I, contribuyendo al 26% del modelo total (Tabla 2A). La Tabla 2A muestra los coeficientes de regresión y su significancia estadística en un análisis de regresión múltiple. En la columna derecha se proporciona la contribución calculada de cada parámetro al modelo estadísticos total.

Tabla 2A: Determinantes apo A-I en controles (análisis multivarianza)

Parámetros	β	p
Dislipemia	-0,097	0,001
ApoB	-0,1011	0,02
Triglicéridos (log)	-0,0439	0,03
Cigarrillos/día	-0,0027	0,04
IMC	-0,0093	0,001
Alcohol	0,0021	0,001
CRP	0,1207	0,003

Parámetros	β	p
IF1	0,35	0,001

A la inversa, cuando el IF1 sérico se estudió como la variable dependiente, se identificaron tres variables explicativas importantes: apoA-I (relación positiva), triglicéridos y presencia de dislipidemia (asociaciones negativas) (Tabla 2B).

5

Tabla 2B: Determinantes IF1 en controles (análisis multivarianza)

Parámetros	β	p
ApoA-I	1,116	0,001
Triglicéridos (log)	-0,333	0,001
Dislipemia	-0,175	0,03

En conjunto, estos datos respaldan la idea de que 1°) IF1 está fuertemente asociado con marcadores del HDL, apareciendo como un determinante independiente, 2°) IF1 está negativamente relacionado con niveles de lipoproteínas ricas en triglicéridos.

10

Niveles séricos de IF1 y enfermedad cardiovascular.

Los casos de ECV difirieron de los sujetos de control por un aumento en la prevalencia de factores de riesgo clásicos: hipertensión, diabetes, dislipidemia, mayor BMI y consumo de tabaco, menor actividad física. También mostraron niveles más elevados de lipoproteínas que contienen triglicéridos y menores marcadores HDL (no se muestra). La concentración media de IF1 fue 0,43 (\pm 0,13) en casos frente a 0,53 (\pm 0,15) μ g/ml en controles ($p < 0,001$).

15

El índice de probabilidad para la ECV en función de IF1 se estudió en primer lugar mediante la ordenación en cuartiles. En comparación con el primer cuartil de distribución de IF1, los cuartiles 2, 3 y 4 mostraron un declive regular del riesgo de ECV (Figura 3). Como alternativa, IF1 se consideró como una variable continua, evidenciando una relación lineal inversa entre las concentraciones de IF1 y el riesgo de ECV (no se muestra). En un modelo multivariantes que incluye los factores de riesgo clásicos, actividad física, hábitos de tabaquismo y alcohol, CRP y niveles de lipoproteína, IF1 permaneció negativamente relacionado con el riesgo de ECV, estando asociado el cuartil de IF1 más alto con una reducción del 60% de eventos ECV (Figura 4). Esto respalda la hipótesis de que IF1 podría ser un predictor negativo independiente del riesgo cardiovascular.

20

25

Además, apareció una interacción estadística entre los niveles de IF1 y apo A-I o HDL-C ($p < 0,001$). Para explorar esta interacción, las concentraciones de IF1 y apo A-I se dividieron en terciles y se estudió la reducción del riesgo de ECV, tomando como referencia, sujetos que tenían simultáneamente niveles bajos de IF1 y apo A-I. Después de ajuste con un amplio panel de factores de riesgo, los niveles intermedios y elevados de apo A-I transmitieron una reducción en el riesgo de $> 90\%$, independientemente de los niveles de IF1. Para bajas concentraciones de apo A-I, un aumento en IF1 indujo una reducción gradual de riesgo de ECV. Esto indica que un elevado IF1 puede compensar un bajo apo A-I en la protección contra los eventos cardiovasculares. Por tanto, en sujetos con bajos niveles de HDL, niveles aumentados de IF1 podrían retrasar el catabolismo de las partículas de HDL, prolongando sus efectos ateroprotectores.

30

35

Finalmente, se estudió la relación entre IF1 y la gravedad de CAD, usando varios índices. A partir de los datos angiográficos, se calculó la puntuación de Gensini, evaluando, para cada estenosis coronaria, el grado de estrechamiento luminal y su importancia geográfica. Como se muestra en las Tablas 5 y 6, la gravedad de las lesiones CAD disminuyó gradualmente en función de los niveles de IF1. La fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) se analizó mediante ecocardiografía. Se observó una correlación positiva con las concentraciones de IF1 en plasma. Esta última observación indica que, entre los sujetos CAD, la función del miocardio está menos alterada en los pacientes con niveles altos de IF1 en plasma.

45

En conclusión, IF1 es un nuevo determinante independiente de los niveles de apo A-I y HDL-colesterol. Además, se ha descubierto una asociación negativa independiente entre el IF1 en plasma y la aparición de ECV y con la gravedad de la enfermedad. La evaluación de IF1 en plasma ayudará a documentar el perfil de riesgo cardiovascular, especialmente en aquellos sujetos con bajos niveles de apolipoproteína A-I y/o HDL-colesterol.

50

Bibliografía

de Andrade FM, Silveira FR, Arsand M, et al. Association between -250G/A polymorphism of the hepatic lipase gene promoter and coronary artery disease and HDL-C levels in a Southern Brazilian population. Clin Genet. May 2004;65(5):390-395.

55

Baroni MG, Berni A, Romeo S, et al. Genetic study of common variants at the Apo E, Apo AI, Apo CIII, Apo B, lipoprotein lipase (LPL) and hepatic lipase (LIPC) genes and coronary artery disease (CAD): variation in LIPC gene associates with clinical outcomes in subjects with established CAD. BMC Med Genet. Sep 10 2003;4:8.

Barter P, Gotto AM, LaRosa JC, et al. HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular

- events. *N Engl J Med*. Sep 27 2007; 357(13):1301-1310).
- Blom D, Yamin TT, Champy MF, et al. Altered lipoprotein metabolism in P2Y(13) knockout mice. *Biochim Biophys Acta*. Dec 2010;1801(12):1349-1360.
- 5 Burwick NR, Wahl ML, Fang J, et al. An inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiotensin on the endothelial cell surface. *J Biol Chem*. Jan 21 2005;280(3):1740-1745.
- Cabezón E, Montgomery MG, Leslie AG, Walker JE. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol*. Sep 2003;10(9):744-750.
- Calabresi L, Gomaraschi M, Franceschini G. Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Oct 1 2003;23(10):1724-1731.
- 10 Castelli WP, Anderson K, Wilson PW, Levy D. Lipids and risk of coronary heart disease: The Framingham Study. *Ann Epidemiol*. 1992; 2: 23-28.
- Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS. Hepatic lipase promoter C-514T polymorphism influences serial changes in HDL cholesterol levels since childhood: the Bogalusa Heart Study. *Atherosclerosis*. Jul 2003; 169(1):175-182.
- 15 Colas et al. (1996). *Nature*, 380, 548-50.
- Cole et al., 1985, In *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy* (Alan Liss, Inc.) pp. 77-96.
- Contessi S, Comelli M, Cmet S, Lippe G, Mavelli I (2007) IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F(1)ATP synthase and calmodulin. *J Bioenerg Biomembr* 39: 291-300.
- 20 Cortes-Hernandez P, Dominguez-Ramirez L, Estrada-Bernal A, Montes-Sanchez DG, Cortes-Hernandez P, Dominguez-Ramirez L, Estrada-Bernal A, et al. The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. May 13 2005;330(3):844-849.
- Cote et al *Proc Natl Acad Sci USA*. 1983;80(7):2026-30.
- Fabre AC, Malaval C, Ben Addi A, et al. P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology*. Oct 2010;52(4):1477-1483.
- 25 Desrumaux C et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:266-75
- Garber DW, Datta G, Chaddha M, et al. A new synthetic class A amphipathic peptide analogue protects mice from diet-induced atherosclerosis. *J Lipid Res*. Apr 2001;42(4):545-552.
- Gensini GG. A more meaningful scoring system for determining the severity of coronary heart disease. *Am J Cardiol*. Feb 1983;51(3):606.
- 30 Giorgio V, Bisetto E, Franca R, Harris DA, Passamonti S, et al. (2010) The ectopic F(O)F(1) ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. *J Bioenerg Biomembr* 42: 117-123.
- Giorgio V, Bisetto E, Franca R, Harris DA, Passamonti S, Lippe G. The ectopic F(O)F(1) ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. *J Bioenerg Biomembr*. Apr 2010;42(2): 117-123.
- 35 Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein: the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med*. 1989; 321: 1311-1316.
- Grarup N, Andreassen CH, Andersen MK, et al. The -250G>A promoter variant in hepatic lipase associates with elevated fasting serum high-density lipoprotein cholesterol modulated by interaction with physical activity in a study of 16,156 Danish subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. Jun 2008;93(6):2294-2299.
- 40 Green DW, Grover GJ. The IF(1) inhibitor protein of the mitochondrial F(1)F(0)-ATPase. *Biochim Biophys Acta*. May 31 2000;1458(2-3):343-355.
- Ho Hong S, Rhyne J, Zeller K, Miller M. Novel ABCA1 compound variant associated with HDL cholesterol deficiency. *Biochim Biophys Acta*. May 21 2002;1587(1):60-64.
- Ichikawa N, Ushida S, Kawabata M, Masazumi Y. Nucleotide sequence of cDNA coding the mitochondrial precursor protein of the ATPase inhibitor from humans. *Biosci Biotechnol Biochem*. Dec 1999;63(12):2225-2227.
- 45 Ishii J, Nagano M, Kujiraoka T, et al. Clinical variant of Tangier disease in Japan: mutation of the ABCA1 gene in hypoalphalipoproteinemia with corneal lipidosis. *J Hum Genet*. 2002;47(7):366-369
- Jacquet S, Malaval C, Martinez LO, et al. The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cell Mol Life Sci*. Nov 2005;62(21):2508-2515.
- 50 Jackson et al., 1988 *FEBS Lett*. 229: 224
- Jayasena (1999) *Clin Chem*. 45(9):1628-50.
- Kohler et al. *Nature*. 1975;256(5517):495-7.
- Mangiullo R, Gnoni A, Leone A, Gnoni GV, Papa S, Zanotti F. Structural and functional characterization of F(o)F(1)-ATP synthase on the extracellular surface of rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. Oct 2008;1777(10):1326-1335.
- 55 Martinez LO, Jacquet S, Esteve JP, et al. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*. Jan 2 2003;421(6918):75-79.
- Mimura et al., 1993 *J. Biochem*. 113: 350
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Jul 2005;25(7): 1325-1331.
- 60 Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, et al. Oral D-4F causes formation of pre-beta high-density lipoprotein and improves high-density lipoprotein-mediated cholesterol efflux and reverse cholesterol transport from macrophages in apolipoprotein E-null mice. *Circulation*. Jun 29 2004;109(25):3215-3220.
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Fogelman AM. Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*. Oct 2006;3(10):540-547.
- 65 Nissen SE, Tsunoda T, Tuzcu EM, et al. Effect of recombinant ApoA-I Milano on coronary atherosclerosis in patients with acute coronary syndromes: a randomized controlled trial. *Jama*. Nov 5 2003;290(17):2292-2300.

- Lebowitz et al. 1993 Arch. Biochem. Biophys. 301: 64.
 Oka T et al. J Lipid Res 2000;41:1651
 Pullman ME, Monroy GC. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. J Biol Chem. Nov 1963;238:3762-3769. Solaini et al., 1997 Biochem J. 327: 443.
- 5 Schmidt C, Lepsverdize E, Chi SL, et al. Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. Mol Psychiatry. Oct 2008;13(10):953-969.
 Teran-Garcia M, Santoro N, Rankinen T, et al. Hepatic lipase gene variant -514C>T is associated with lipoprotein and insulin sensitivity response to regular exercise: the HERITAGE Family Study. Diabetes. Jul 2005;54(7):2251-2255.
- 10 Tuerk et al. (1990) Science, 249, 505-510
 van Raaij MJ, Orriss GL, Montgomery MG, et al. The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. Biochemistry. 1996;35(49):15618-15625.
 von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. Mar 2005;8(2):147-152
- 15 Waksman R, Torguson R, Kent KM, et al. A first-in-man, randomized, placebo-controlled study to evaluate the safety and feasibility of autologous delipidated high-density lipoprotein plasma infusions in patients with acute coronary syndrome. J Am Coll Cardiol. Jun 15 2010;55(24):2727-2735.
 Wang J, Burnett JR, Near S, et al. Common and rare ABCA1 variants affecting plasma HDL cholesterol. Arterioscler Thromb Vasc Biol. Aug 2000;20(8):1983-1989.
- 20 Yamakawa-Kobayashi K, Yanagi H, Yu Y, Endo K, Arinami T, Hamaguchi H. Associations between serum high-density lipoprotein cholesterol or apolipoprotein AI levels and common genetic variants of the ABCA1 gene in Japanese school-aged children. Metabolism. Feb 2004;53(2):182-186.
 Zentella-Dehesa A, et al. (2005) The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 330: 844-849.
- 25 Su Z, Zhang S, Nebert DW, et al. A novel allele in the promoter of the hepatic lipase is associated with increased concentration of HDL-C and decreased promoter activity. J Lipid Res. Oct 2002; 43(10):1595-1601.

REIVINDICACIONES

1. Un método para evaluar el riesgo de un sujeto de tener una enfermedad cardiovascular que comprende la etapa de medir el nivel del factor de inhibición 1 (IF1) en una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en la que el nivel de IF1 está correlacionado negativamente con el riesgo de dicho sujeto de tener una enfermedad cardiovascular.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende la etapa de comparar dicho nivel de IF1 con un valor de control superior y/o inferior en el que:
- un nivel de IF1 por encima de dicho valor de control superior es predictivo de un bajo riesgo de tener una enfermedad cardiovascular y/o
 - un nivel de IF1 por debajo de dicho valor de control es predictivo de un riesgo elevado de tener una enfermedad cardiovascular.
3. Un método para evaluar la gravedad de una enfermedad cardiovascular en un sujeto que tiene dicha enfermedad cardiovascular que comprende la etapa de medir el nivel de IF1 en una muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en la que el nivel de IF1 está correlacionado negativamente con la gravedad de la enfermedad cardiovascular en dicho sujeto.
4. Un método para vigilar la eficacia de una terapia para tratar una enfermedad cardiovascular en un sujeto que comprende la etapa de:
- medir el nivel de IF1 en una primera muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en t1 y
 - medir el nivel de IF1 en una segunda muestra de fluido corporal obtenida de dicho sujeto en t2
- en la que:
- cuando t1 es anterior a la terapia, t2 es durante o después de la terapia, y
 - cuando t1 es durante la terapia, t2 es posterior durante la terapia o después de la terapia,
- en el que un aumento en el nivel de IF1 en la segunda muestra en comparación con el nivel de IF1 en la primera muestra es indicativo de un efecto positivo de la terapia sobre la enfermedad cardiovascular del sujeto tratado.
5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el que dicha muestra de fluido corporal es una muestra de sangre.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en el que dicha enfermedad cardiovascular es una enfermedad de las arterias coronarias.
7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en el que dicha enfermedad cardiovascular es aterosclerosis.
8. Un método para medir el nivel de IF1 en un sujeto que comprende la etapa de medir el nivel de IF1 en una muestra de sangre o en una muestra de líquido cefalorraquídeo obtenido de dicho sujeto.
9. El método de acuerdo con la reivindicación 8 que comprende la etapa de poner en contacto la muestra de líquido cefalorraquídeo con un ligando capaz de interactuar selectivamente con IF1 para permitir la formación de un complejo ligando-IF1.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9 que comprende las etapas de:
- separar cualquier material no ligado de la muestra de sangre o de la muestra de líquido cefalorraquídeo del complejo ligando-IF1,
 - poner en contacto el complejo ligando-IF1 con una molécula de unión secundaria marcada,
 - separar cualquier molécula de unión secundaria no ligada de los complejos de molécula de unión secundaria-IF1 y
 - detectar la molécula de unión secundaria de los complejos de molécula de unión secundaria-IF1.
11. Un agente que aumenta el nivel de HDL seleccionado del grupo que consiste en apoA-I baja en lípidos, apoA-I asociada con una mezcla de fosfolípidos, miméticos de apoA-I e inhibidores de CETP para su uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular en un sujeto, en el que dicho sujeto se ha identificado por tener un bajo nivel de IF1 en sangre.
12. Uso de un kit para llevar a cabo el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, comprendiendo dicho kit:

- un soporte sólido,
- un ligando capaz de interactuar selectivamente con IF1 que está unido a dicho soporte sólido, y
- un ensayo para medir el nivel del complejo ligando-IF1,

5 en el que el ligando es un anticuerpo que se une al IF1 en circulación.

13. Uso de IF1 como marcador del riesgo cardiovascular.

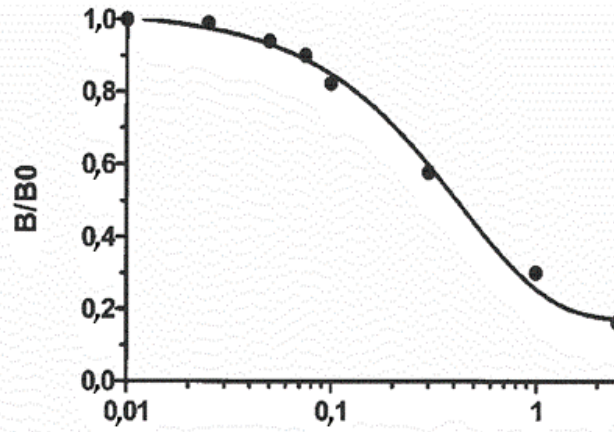


FIG. 1

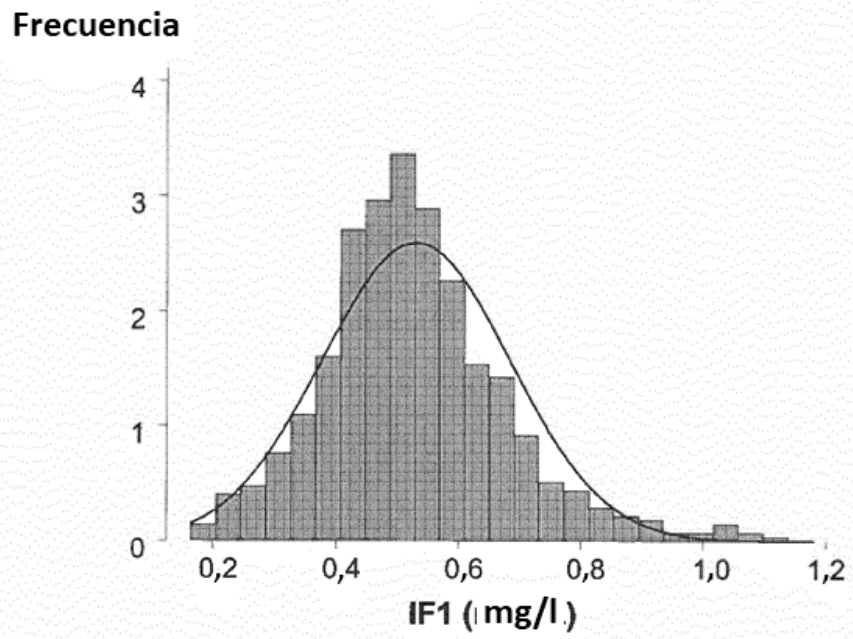


FIG. 2

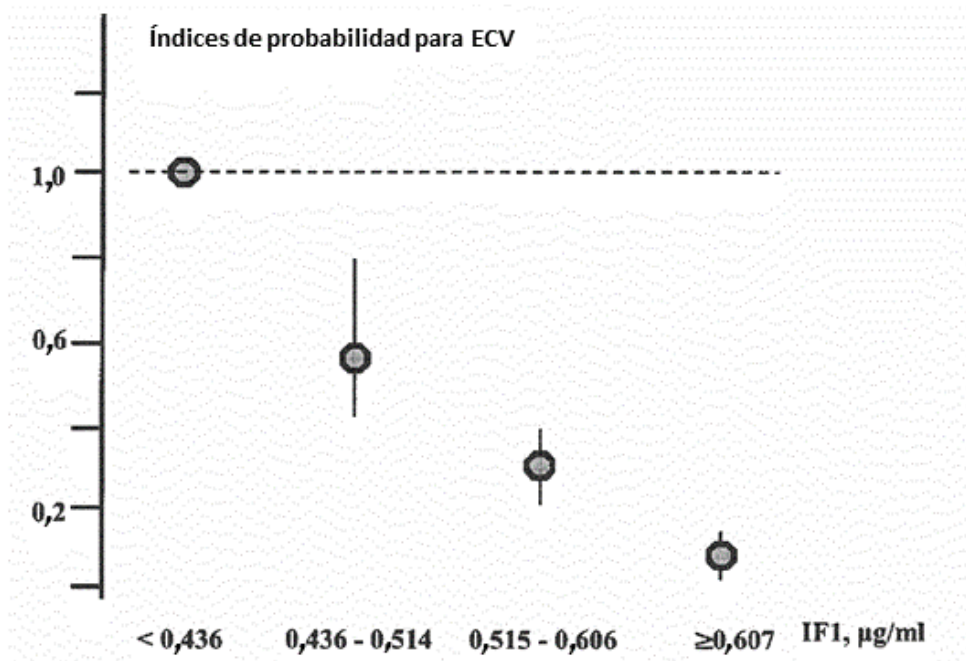


FIG. 3

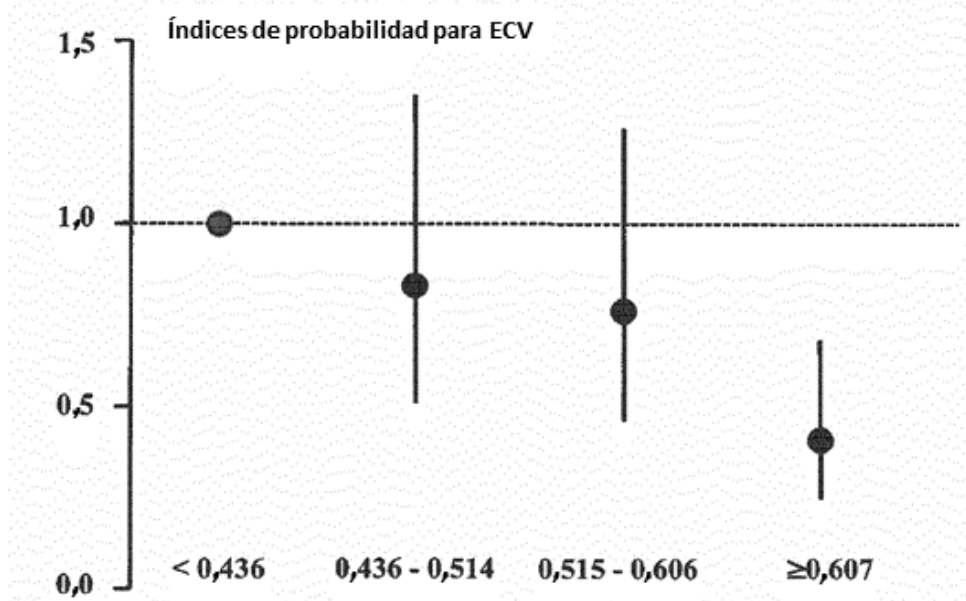


FIG. 4

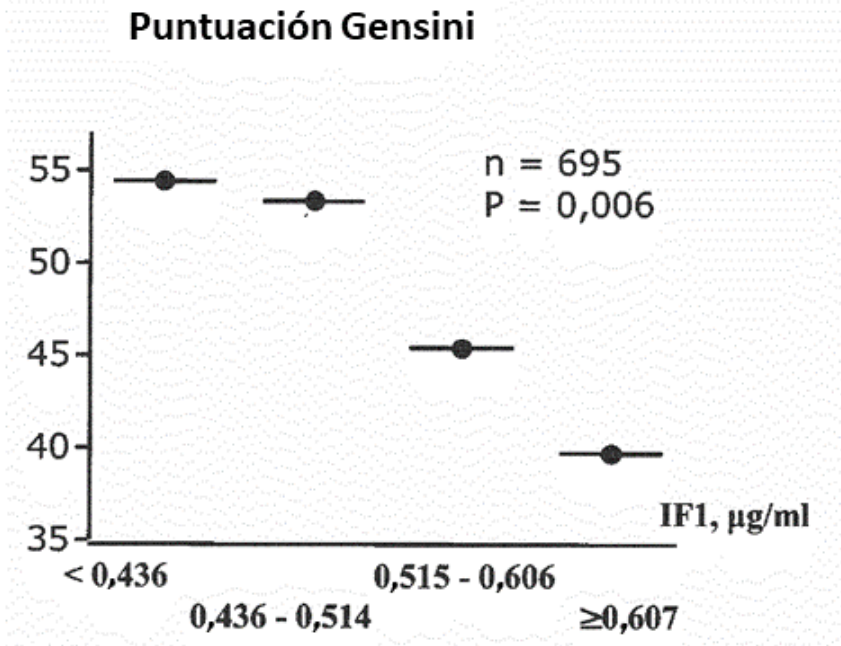


FIG. 5

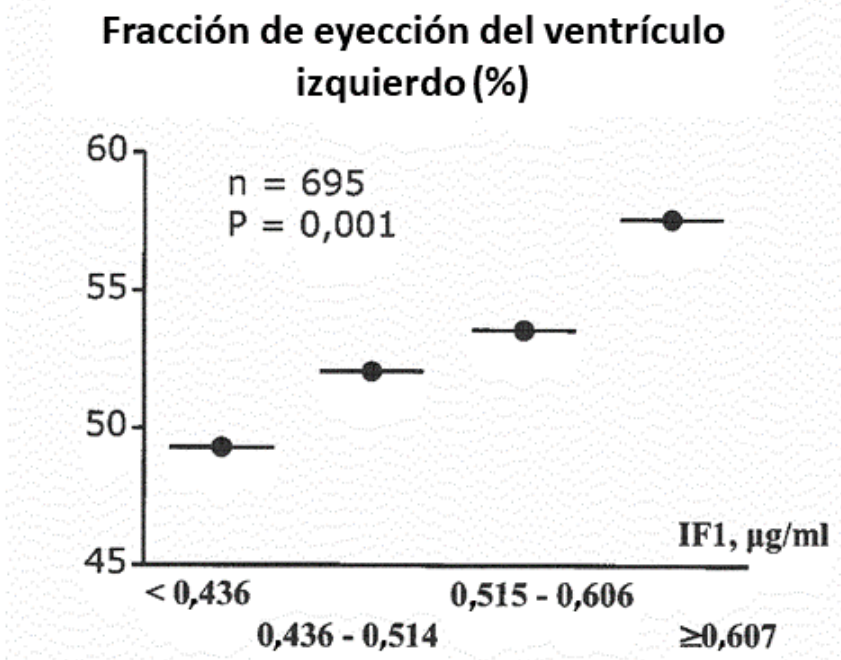


FIG. 6