

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 121**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/37** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 16/18** (2006.01)

**C12N 5/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2012 PCT/EP2012/058289**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2012 WO12152716**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2012 E 12720854 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2707495**

54 Título: **Marcadores bioquímicos para la evaluación del riesgo de CVD**

30 Prioridad:

**12.05.2011 GB 201107922**

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

**05.10.2018**

73 Titular/es:

**NORDIC BIOSCIENCE A/S (100.0%)  
Herlev Hovedgade 207  
2730 Herlev, DK**

72 Inventor/es:

**BARASCUK, NATASCHA;  
GENOVESE, FEDERICA;  
KARSDAL, MORTEN y  
LEEMING, DIANA JULIE**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 685 121 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

Marcadores bioquímicos para la evaluación del riesgo de CVD

- 5 La presente invención se refiere a ensayos para la detección de marcadores bioquímicos valiosos para fines de diagnóstico en la enfermedad cardiovascular y para el pronóstico del desarrollo de la enfermedad, lo que incluye marcadores bioquímicos indicativos del riesgo de eventos cardiovasculares que resultan del desarrollo aterosclerótico y la inestabilidad de la placa.
- 10 Mundialmente, la enfermedad cardiovascular (CVD, por sus siglas en inglés) es la causa principal de morbilidad y mortalidad. En la actualidad, no existen métodos de diagnóstico eficaces y no invasivos que permitan el diagnóstico y clasificación de pacientes en diferentes grupos de riesgo y el diagnóstico de pacientes de riesgo bajo. Las herramientas diagnósticas y de pronóstico se componen principalmente de análisis multivariados de marcadores simples, tales como la edad, el tabaquismo y diversas concentraciones de lípidos y lipoproteínas.
- 15 La CVD incluye varios síndromes clínicos, principalmente, angina de pecho, infarto de miocardio (trombosis coronaria) y accidente cerebrovascular. Todos estos síndromes suelen ser las secuelas de una aterosclerosis complicada.
- 20 La aterosclerosis comienza con el engrosamiento de la íntima en la infancia y progresa hacia estrías grasas en la íntima de las arterias - estas lesiones se caracterizan como tipo I y II, respectivamente. Las estrías grasas son las lesiones visibles macroscópicamente más tempranas en el desarrollo de la aterosclerosis y se producen en casi todos los seres humanos de todas las razas y sociedades. En el estado no patogénico, las células endoteliales (EC, por sus siglas en inglés) resisten las interacciones adhesivas con los leucocitos. Sin embargo, las acciones de citocinas proinflamatorias y lipoproteínas oxidadas acumuladas en la pared arterial durante la aterogénesis, inician la expresión de moléculas de adhesión, tales como moléculas de adhesión intercelular (ICAM, por sus siglas en inglés)-1 y moléculas de adhesión de
- 25 células vasculares (VCAM, por sus siglas en inglés)-1, en la superficie de las EC de la aorta. Esto permite la captura y transmigración de leucocitos a través de la superficie endotelial, a la parte íntima de la pared del vaso. El desarrollo de placas involucra un número creciente de células de músculo liso (SMC, por sus siglas en inglés) que experimentan desplazamiento y apoptosis, lo cual resulta en un aumento en el remodelado de la matriz. La síntesis alterada de colágeno puede resultar en un casquete fibroso debilitado y una placa aterosclerótica que es más propensa a la ruptura; sin embargo, la mayoría de los investigadores creen que las acciones de las enzimas proteolíticas, tales como las metaloproteasas de la matriz (MMP, por sus siglas en inglés) y otras proteasas, contribuyen de manera importante al riesgo de ruptura de la placa (Clarkson y Kaplan 509-28).
- 30 Las placas se dividen en dos tipos diferentes: placas "vulnerables" y "estabilizadas". Sin embargo, para los análisis histológicos detallados y la comprensión molecular, se usa a menudo una clasificación más detallada. Existen tres etapas principales en el desarrollo de la placa: iniciación, estrías grasas y la placa compleja/avanzada (Stary H.C.).
- 35 Las placas ateroscleróticas se desarrollan dentro de la íntima de las arterias, y pueden clasificarse en dependencia de su composición y estructura. Esta clasificación divide las lesiones en ocho tipos (Stary H.C.):
- 40 I. Aumentan en la íntima los macrófagos cargados con y agrandados por gotas de lípidos (células espumosas de macrófagos).
- 45 II. Las células espumosas de macrófagos se acumulan en la parte profunda de la capa de proteoglicano junto con las gotas de lípidos dentro de las SMC de la íntima. Las capas de células espumosas son visibles como estrías grasas. En las lesiones de tipo II, los monocitos penetran el revestimiento endotelial mediante proteínas quimioatrayentes de monocitos (principalmente MCP-1), las cuales se sobreexpresan en el ateroma humano. Los tipos iniciales de lesión (tipo I y II) pueden comenzar en la infancia y no conducen necesariamente a la ruptura de la placa. Además, el desarrollo de la aterosclerosis puede terminar después de la formación de la lesión tipo III, y la formación de la placa no es predecible (Stary H.C.).
- 50 III. La lesión tipo III se determina como la lesión intermedia entre las estrías grasas (tipo II) y el ateroma (tipo IV). Estas lesiones contienen agrupaciones de lípidos extracelulares y de esta manera expanden los espacios entre las SMC normalmente adyacentes en forma estrecha de la capa musculoelástica profunda de la íntima. Las agrupaciones de material pueden reemplazar los proteoglicanos y las fibras de colágeno que normalmente residen aquí, pero esto se produce con poco impacto en esta etapa de aterogénesis.
- 55 IV. El ateroma es el primer signo clínico de aterosclerosis. El desplazamiento de las SMC en la íntima de las arterias mediante la acumulación de agrupaciones extracelulares de lípidos y la alteración de la arquitectura de la íntima es una característica distintiva de una lesión de tipo IV. La formación de los núcleos lipídicos es el resultado final de este desplazamiento de las SMC. La formación de un núcleo lipídico explica el aumento del engrosamiento de la pared. El núcleo lipídico es una región grande y bien delineada de la íntima profunda donde los elementos estructurales normales de esta parte de la pared arterial se han reemplazado por remanentes de células espumosas densamente empaquetadas, gotas de lípidos libres, cristales de colesterol y partículas de calcio. Las SMC que residen normalmente en esta área se hallan disminuidas o ausentes completamente en esta etapa de la progresión de la aterosclerosis. Cualquier SMC remanente se vuelve dispersa ampliamente y ha desarrollado cuerpos celulares alargados y muy a menudo membranas basales inusualmente gruesas. En esta etapa, comienza el desarrollo de una capa que recubre el núcleo lipídico. Esta
- 60
- 65

capa consiste en colágeno y matriz intercelular rica en proteoglicanos, SMC con y sin gotas de lípidos, macrófagos y células espumosas.

5 V. La respuesta a la lesión tipo IV es la formación de una matriz de tejido fibroso reparativa, lo que forma un "casquete" fibroso. Típicamente, estas lesiones consistirán en capas de núcleos lipídicos y tejido reparador apilados irregularmente uno encima del otro. Eventos tales como el hematoma y la formación de trombos pueden complicar adicionalmente estos tipos de lesiones. Si no son fatales, estas complicaciones de la lesión se integran en la lesión y se cubren con una capa delgada de tejido de matriz reparadora, que consiste en colágenos y proteoglicanos. El contenido de proteínas de la matriz extracelular colágeno y proteoglicanos aumenta en la placa aterosclerótica durante la formación del casquete.

10 VI. Los defectos del endotelio tales como fisuras, erosiones, ulceraciones, hematomas, trombos y hemorragias pueden, si se combinan, conducir a un tipo de lesión más complicada designada como lesión tipo VI.

VII. La lesión a menudo se denomina lesión calcificada, donde más del 50 % de la lesión se compone de minerales. Además de las calcificaciones, estas lesiones contienen abundancia de tejido conjuntivo fibroso reparador. Cuando las SMC atrapadas en esto experimentan apoptosis y se desintegran, sus organelos mineralizados se vuelven parte de la calcificación.

15 VIII. La lesión fibrótica sigue a la lesión calcificada. La lesión fibrótica puede consistir totalmente de colágeno y sin lípidos. (Stary H.C.)

20 Los eventos cardiovasculares a menudo son el resultado de la ruptura de la placa, en la que la inflamación y la liberación de proteasas debilitan las regiones del hombro del casquete fibroso y permiten que los materiales grasos de la placa entren en contacto con la sangre lo que precipita un trombo mural (Clarkson y Kaplan). El adelgazamiento del casquete fibroso por el aumento de la actividad de la proteasa en combinación con una producción de matriz disminuida, se considera una característica distintiva de la inestabilidad de la placa que aumenta el riesgo de ruptura. La vulnerabilidad de las placas y su riesgo de ruptura es un área de interés clínico. La definición de placa vulnerable (VP, por sus siglas en inglés) no se halla estandarizada, pero existe un acuerdo general que establece la existencia de tres características histológicas distintivas en comparación con la placa estable:

- 1) Un núcleo lipídico más grande (> 40 por ciento de la lesión total).
- 2) Un casquete fibroso más delgado (65 - 150 micrómetros).
- 3) Gran cantidad de células inflamatorias agudas.

30 Los principales criterios para definir una VP incluyen: inflamación activa (presencia de monocitos, macrófagos y células T), casquete delgado con núcleo lipídico grande, denudación endotelial con agregación superficial de plaquetas, placa fisurada y > 90 % de estenosis de la arteria. Otros criterios menores incluyen: nódulo calcificado superficial, hemorragia intraplaca, disfunción endotelial y remodelación externa (Shin, Edelberg y Hong).

35 Las complicaciones de la placa, la inestabilidad y la ruptura pueden inhibirse mediante tratamiento médico y/o la modificación del estilo de vida. En algunos casos, sin embargo, pueden ser necesarios métodos más invasivos, es decir, angioplastia o cirugía de derivación.

40 En la actualidad, las herramientas de diagnóstico se basan ya sea en análisis de imágenes estáticas aún en desarrollo o en métodos de tecnología baja como los niveles de presión arterial sistólica y diastólica relacionados con el riesgo de CVD. El campo ha dedicado mucha atención al desarrollo de análisis multivariados que pueden identificar mejor a los pacientes en riesgo alto. Uno de estos modelos es el modelo SCORE (modelo de evaluación sistemática de riesgos coronarios). En 1994, con una revisión en 2003, la Sociedad Europea de Aterosclerosis, la Sociedad Europea de Cardiología y la Sociedad Europea de Hipertensión emitieron un conjunto de recomendaciones con respecto a la prevención de enfermedades coronarias. Esta directriz se basa en varias técnicas de evaluación, que se han desarrollado para evaluar el riesgo de CVD en sujetos asintomáticos, es decir, la identificación de pacientes asintomáticos de riesgo alto. El modelo SCORE integra el sexo, la edad, el tabaquismo, la presión arterial sistólica y el colesterol total o la relación colesterol/HDL como factores de riesgo (Graham y otros).

50 Para hacer un diagnóstico más detallado, el modelo SCORE no es suficiente y se usan técnicas de obtención de imágenes. Por lo tanto, los métodos de obtención de imágenes se usan en su mayoría en pacientes en el grupo de riesgo alto o durante la investigación.

55 Técnicas de obtención de imágenes

60 La angiografía coronaria (CAG, por sus siglas en inglés) es actualmente la técnica de obtención de imágenes de referencia para definir el grado de estenosis. La CAG proporciona imágenes del lumen del vaso en dos dimensiones, pero se limita únicamente al lumen y no a la pared del vaso, de esta manera, la CAG no puede distinguir entre una arteria con una placa estable y una arteria con una placa vulnerable. La CAG se usa a menudo para determinar si un paciente necesita cirugía; angioplastia o derivación. Para determinar si un punto de estrechamiento luminal es una placa avanzada, se necesitan otras técnicas, es decir, ultrasonido coronario intravascular (IVUS, por sus siglas en inglés) o angioscopia.

65 El IVUS proporciona imágenes de sección transversal bidimensionales de la placa y la pared del vaso, y se considera un método bueno para la caracterización de la pared y la morfología de los vasos y del grado de calcificación, pero deficiente para evaluar los lípidos en la lesión. Sin embargo, el IVUS es invasivo y requiere experiencia y gastos: por lo tanto, su

uso no está muy extendido. La angioscopia es otro método útil para comprender e identificar la aterosclerosis. La angioscopia es una visualización directa de la superficie de la placa y tiene la capacidad de detectar el color de la placa y la trombosis. La angioscopia es, sin embargo, invasiva y técnicamente difícil, y hasta el momento no ha sido capaz de detectar el grado de extensión de la placa. Otra técnica de obtención de imágenes que actualmente recibe mucha atención es la obtención de imágenes por Resonancia Magnética (MRI, por sus siglas en inglés). La MRI no es invasiva y es capaz de identificar la placa carotídea con riesgo alto de accidente cerebrovascular. Por otro lado, la resonancia magnética no es la mejor técnica para obtener imágenes de las arterias coronarias, debido a los tamaños de placa pequeños y la ubicación de las arterias coronarias. Están en desarrollo otras técnicas de obtención de imágenes, es decir, elastografía, termografía y tomografía de coherencia óptica (Schaar y otros).

Las técnicas de obtención de imágenes mencionadas están todas en desarrollo y, por sí solas, ninguna puede identificar una placa vulnerable, pero son herramientas útiles para comprender tanto los eventos moleculares como la remodelación de la placa antes de la ruptura. En la actualidad, la única oportunidad para diagnosticar una CVD en una etapa temprana es usar una gama de factores de riesgo para la enfermedad coronaria cardíaca establecida, la enfermedad arterial periférica y la enfermedad cerebrovascular aterosclerótica del paciente en cuestión, así como también de parientes cercanos del paciente.

**Marcadores bioquímicos actuales**

En la actualidad, se conocen varios marcadores bioquímicos como factores de riesgo para la aterosclerosis. Recientemente, se ha dirigido mucha atención a la medición de concentraciones de marcadores bioquímicos en el suero; tanto lípidos como colesterol total, colesterol de lipoproteínas de densidad baja (LDL-C, por sus siglas en inglés) y colesterol de lipoproteínas de densidad alta (HDL-C, por sus siglas en inglés) como marcadores inflamatorios como proteína C reactiva (CRP, por sus siglas en inglés), interleucina 6 (IL-6), interleucina-18 (IL-18), factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), CD40, ligando de CD40 (CD40L) y otros.

Entre los marcadores de lipoproteínas, ha habido al menos dos avances notables. El tamaño de las partículas de LDL parece predecir el grado de progresión de la aterosclerosis. El aumento de las concentraciones de partículas de LDL pequeñas se relaciona más con el riesgo de una CVD que el aumento de las concentraciones de partículas grandes (Gardner, Fortmann y Krauss).

El nivel de HDL-C se relaciona fuertemente con los triglicéridos, y el nivel alto de triglicéridos se correlaciona con un mayor riesgo de CHD. Un estudio de cohorte por Jeppesen y otros (2003) encontró TG alto/HDL-C bajo como los factores de riesgo más fuertes de IHD (cardiopatía isquémica) (Jeppesen y otros).

Los perfiles de lípidos son importantes para la evaluación de los factores de riesgo, pero no permiten la comprensión y medición de los eventos moleculares asociados con la remodelación de la placa. Se han sugerido varios marcadores bioquímicos como factores de riesgo para la CVD, aunque no son un producto específico de la enfermedad. Estos incluyen CRP y péptido natriurético cerebral (BNP, por sus siglas en inglés) (ver Tabla 1). La Tabla 1 resume algunos de los marcadores conocidos de la CVD.

Tabla 1: Una selección de marcadores bioquímicos actuales en la CVD.

Marcador	Tipo	Descripción
Proteína C reactiva (CRP)	Inflamatorio	Producido en el hígado, aumenta durante estados inflamatorios.
Proteína plasmática asociada al embarazo (PAPP-A)	Inflamatorio	Proteína de unión a zinc que actúa como una enzima, específicamente una metalopeptidasa.
Interleucina-6 (IL-6)	Citocina inflamatoria	Nivel elevado en insuficiencia cardíaca e infarto de miocardio.
Interleucina-8 (IL-8)	Citocina inflamatoria	Elevada en infartos de miocardio.
Interleucina-18	Citocina inflamatoria	Elevada en infarto de miocardio.
TNF- $\alpha$ (factor de necrosis tumoral)	Citocina	Conc. Elevada en los inicios de la insuficiencia cardíaca.
MCP-1	Quimiocina	Recluta monocitos de la sangre hacia una lesión aterosclerótica temprana.

5	Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1)	Molécula de adhesión	Elevada en infartos de miocardio y accidente cerebrovascular.
	Molécula de adhesión celular vascular-1 (VCAM-1)	Molécula de adhesión	Elevada en infartos de miocardio y accidente cerebrovascular.
10	Péptido natriurético cerebral (BNP)	Actividad neurohormonal	Producido en aurículas y ventrículos del corazón sano normal.
	Fosfolipasa A2 asociada a lipoproteínas (Lp-PLA <sub>2</sub> )	Fosfolipasa	La Lp-PLA <sub>2</sub> asociada a la LDL tiene efectos proaterogénicos.
	Creatina fosfoquinasa (CK-MB)	Enzima	Útil para la detección temprana de infarto de miocardio.
15	Mieloperoxidasa (MPO)	Enzima Hemo	Activa las metaloproteasas y promueve la desestabilización de la placa.
	Mioglobina	Proteína Hemo	Se libera tras la necrosis del tejido.
20	CD40L	Proteína	Se libera en las etapas tempranas de la aterogénesis hasta la ruptura de la placa. Elevada en el accidente cerebrovascular.
	Troponina T (TnT)	Proteína	Herramienta para la estratificación del riesgo.
25	Proteína de unión a ácidos grasos tipo corazón (H-FABP)	Proteína	La H-FABP se libera del corazón inmediatamente después del infarto.
	Microalbuminuria	Proteína	Marcador de disfunción endotelial vascular.
30	Colesterol de lipoproteínas de densidad baja (LDL-C)	Lipoproteína	Transporta colesterol en la sangre.
	Colesterol de lipoproteínas de densidad alta (HDL-C)	Lipoproteína	Tiene propiedades antioxidantes y antiinflamatorias.
35	Triglicérido	Lípido	
	PIIINP	Procolágeno	Marcador de remodelación del colágeno tipo III.

40 Por lo tanto, se ha sugerido una gama de marcadores bioquímicos diferentes como marcadores de eventos cardiovasculares. Wang y otros (2006) midieron 10 marcadores bioquímicos diferentes en 3.200 pacientes que participaron en el estudio de Framingham, descrito en la Tabla 1. La conclusión fue que la medición de 10 marcadores bioquímicos solo contribuye moderadamente al diagnóstico más allá de los factores de riesgo estándar. De los 10 marcadores bioquímicos, el nivel de péptido natriurético tipo B, el nivel de proteína C-reactiva y la relación albúmina urinaria/creatinina mostraron la mejor correlación entre marcador y muerte/eventos cardiovasculares (Wang y otros).

#### Mimecano

50 Recientemente, el proteoglicano mimecano, conocido también como osteoglicina (OGN) ha sido implicado en la regulación de la fibrologénesis del colágeno, la arteriogénesis y en la regulación de la masa del ventrículo izquierdo. Mimecano/OGN es parte de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina (SLRP, por sus siglas en inglés). Otros miembros de esta familia son biglicano, decorina, fibromodulina y lumicano. Los SLRP comprenden muchas funciones importantes tales como la regulación de la estructura de la matriz, el ciclo celular y las acciones de crecimiento que producen múltiples vías de señalización. Los SLRP modulan las interacciones célula-matriz y la función celular, sin participar en el andamiaje estructural de la ECM.

60 La placa aterosclerótica está en remodelación continuamente, lo que libera de esta manera una gama de productos de degradación de proteínas de la ECM, los llamados neoepítos. Estos neoepítos pueden ser específicos para el tejido de origen y, por lo tanto, son interesantes cuando se diseñan nuevos marcadores bioquímicos moleculares. Los marcadores bioquímicos basados en neoepítos medibles en orina y suero reciben actualmente una mayor atención por su potencial para el diagnóstico y pronóstico (documento WO2009/059972).

#### Metaloproteinasas de la matriz (MMP, por sus siglas en inglés)

65 Las MMP son un grupo grande de endopeptidasas, capaces de degradar la mayoría de los componentes de la ECM. Actualmente, se han identificado más de 25 MMP. Las metaloproteinasas se caracterizan por un sitio activo que contiene

un átomo de metal, típicamente cinc, y se secretan como zimógenos. Los inhibidores tisulares específicos, TIMP (por sus siglas en inglés), regulan la actividad de las MMP. Una gran variedad de MMP se encuentran en las placas ateroscleróticas. Con mayor frecuencia se localizan en macrófagos que bordean el casquete fibroso, dentro de los hombros de la placa en las SMC y macrófagos y se identifican raramente dentro del casquete fibroso (Kunz J.).

Las MMP se clasifican en diferentes grupos de acuerdo con su especificidad de sustrato: Colagenasas, que degradan el colágeno fibrilar, como el colágeno tipo I, II, III y V, pero también proteoglicanos; gelatinasas, que degradan los proteoglicanos, colágeno tipo IV, V, VII y elastina; estromelina que es activa contra proteoglicanos y elastina (Rouis M). Estos tres subgrupos son de particular interés con respecto a la remodelación de la matriz en las placas ateroscleróticas.

#### Gelatinasas

La elastina insoluble se digiere por las MMP-2 y -9, ambas pertenecientes a la familia de gelatinasas de las MMP. La MMP-9 tiene un papel importante ya que afecta el tamaño y la composición de la placa aterosclerótica. En placas ateroscleróticas humanas inestables y en regiones vulnerables de las placas, se ha observado una mayor expresión y concentración de MMP-9. Además, la MMP-9 se encuentra intracelularmente (lo que indica síntesis activa) en las placas coronarias, con mayor frecuencia en pacientes con angina inestable en comparación con aquellos con angina estable. El nivel de MMP-9 en sangre aumenta en asociación con la aterosclerosis coronaria y predice eventos cardiovasculares adversos (Sundstrom y Vasan). Un estudio reciente realizado por Kuzuya y otros (2006) indica que la MMP-2 es responsable de la acumulación de SMC en el casquete fibroso y, de esta manera, induce la inestabilidad de la placa.

#### Estromelina

La MMP-3 pertenece a las proteasas estromelinas y es capaz de degradar tanto la elastina como los proteoglicanos. Un estudio de Yamada y otros (2002) indica que la MMP-3 puede demostrar ser un medio confiable para predecir el riesgo genético de infarto de miocardio en las mujeres.

#### Colagenasas

Las MMP-1, -8 y -13 se han identificado en placas ateroscleróticas donde degradan proteoglicanos y colágeno tipos I y III.

Las MMP-1, -8 y -13 son colagenasas, las cuales escinden el colágeno en dos fragmentos que se degradan después por las MMP-2, -3 o -9.

La MMP-8 se expresa por neutrófilos, no se encuentra comúnmente en el ateroma humano, pero se ha identificado en placas ateroscleróticas. La MMP-8 puede ser responsable parcialmente de la degradación del casquete fibroso ya que la MMP-8 tiene preferencia por el colágeno tipo I (Herman y otros), al tener una actividad tres veces mayor en la degradación del colágeno I que la MMP-1 y 13. Esto es apoyado por Turu y otros (2006), en este estudio el contenido de MMP-8 en el plasma es mayor significativamente en los pacientes con placas vulnerables, que en los pacientes con placas estables.

Se ha informado que la MMP-13 escinde los SLRP, con especificidad alta para el biglicano. La degradación de biglicano por la MMP-13 en un sitio de escisión específico (...G<sub>177</sub>/V<sub>178</sub>) se ha demostrado previamente por Monfort y otros (2005) y se propone que juega un papel importante en la detección temprana de la degradación del cartílago en la osteoartritis.)

#### Catepsinas

Las catepsinas cisteínas humanas constan de 11 miembros, lo que incluye las catepsinas B, K, L y S, y se expresan predominantemente dentro de los compartimientos endosomales/lisosomales de las células. Las catepsinas son capaces de catalizar la degradación hidrolítica de proteoglicanos, colágeno y elastina.

En el aneurisma aórtico abdominal (AAA) se encontraron niveles altos de catepsinas S, K y L en comparación con la aorta normal. La SMC vascular humana normal no contiene catepsina K detectable mediante inmunotinción, pero las células dentro de las placas ateroscleróticas son positivas claramente. La catepsina K se localiza en áreas propensas a la ruptura, como el casquete fibroso, los hombros de la placa y en el sitio real de las roturas de la placa (Chapman y otros). Se encuentra que la catepsina S se localiza conjuntamente con las regiones de mayor degradación de elastina en las placas ateroscleróticas, y se observa una aterosclerosis reducida en ratones deficientes en catepsina S y K (Liu y otros).

Tanto la catepsina L como la K degradan varios proteoglicanos y el colágeno de tipo I y II, la catepsina K degrada dentro de las hélices triples reticuladas covalentemente, mientras que la catepsina L escinde solo en las regiones de telopéptidos no helicoidales. La catepsina K se localiza en el casquete fibroso y el hombro de la placa. La expresión de la catepsina K en arterias normales es muy baja. Las lesiones ateroscleróticas humanas tempranas mostraron expresión de catepsina K en las SMC de la íntima y la media. En las placas ateroscleróticas avanzadas, la catepsina K se localizó principalmente en los macrófagos y las SMC del casquete fibroso (Lutgens y otros). Los niveles de proteína de catepsina K aumentaron en las lesiones ateroscleróticas en comparación con las arterias normales, mientras que los niveles de ARNm de catepsina K fueron similares tanto en las arterias ateroscleróticas como en las normales. Además, se demostró que los niveles de

ARNm y proteína de catepsina K eran más altos en las placas ateroscleróticas humanas avanzadas pero estables en comparación con las lesiones ateroscleróticas tempranas y las lesiones que contenían trombos (Chapman y otros).

5 La catepsina S se expresa escasamente únicamente en SMC de la íntima y la media en la lesión aterosclerótica humana temprana y en las estrías grasas. En placas ateroscleróticas humanas avanzadas, la catepsina S se localizó en macrófagos y SMC del casquete fibroso. Las EC que recubren el lumen del vaso en sí y los microvasos de la placa expresan, además, catepsina S. Además, los niveles de ARNm y proteína de la catepsina S aumentaron en el ateroma humano en comparación con las arterias normales (Lutgens y otros). La catepsina S puede degradar proteoglicanos, elastina y colágeno (Liu y otros).

10 En la actualidad, la determinación del riesgo de CVD se produce en una etapa tardía en la progresión de la aterosclerosis; un punto en el que existe un riesgo significativo de ruptura de la placa fibrosa. Existe una necesidad de ensayos de diagnóstico o pronóstico que proporcionen información con respecto a la aterosclerosis o al riesgo de CVD tanto en etapas tempranas como en etapas tardías. Los hallazgos de Katsuda y otros (1992) sugieren que existen mecanismos enzimáticos para la eliminación de colágenos de lesiones avanzadas, lo que sugiere de hecho un importante papel de los neopéptidos en la arteriosclerosis.

20 La presente invención proporciona un método de bioensayo para la cuantificación de fragmentos de péptidos que comprende un neopéptido formado por escisión de una proteína de una placa aterosclerótica por una proteinasa, dicho método comprende poner en contacto una muestra que comprende dichos fragmentos de péptidos con un ligando inmunológico que tiene afinidad de unión específica por dicho neopéptido y determinar el nivel de unión de dicho ligando inmunológico a los fragmentos de péptidos en dicha muestra, en donde dicha proteína es mimecano.

25 El resultado de dicho ensayo puede producir un índice indicativo del grado de riesgo en un paciente en particular de ruptura de una placa aterosclerótica o del estado vulnerable de las placas ateroscleróticas de un paciente.

30 Los pacientes que tengan un valor para dicho índice por encima de un nivel umbral pueden recomendarse para una investigación más exhaustiva mediante métodos de obtención de imágenes de placa (lo que incluye los mencionados anteriormente) o para prescribir medicamentos para el tratamiento de la aterosclerosis o para el tratamiento quirúrgico de la aterosclerosis, y dichas investigaciones de seguimiento o tratamiento pueden formar parte del método de la invención.

Dicho ligando inmunológico tiene afinidad de unión específica por fragmentos de péptidos que comprenden un neopéptido en el extremo C-terminal o un neopéptido en el extremo N-terminal.

35 Se considera que un ligando inmunológico es reactivo específicamente con un neopéptido si es reactivo con péptidos que terminan en la secuencia del neopéptido pero no es reactivo sustancialmente con el mimecano intacto y no es reactivo específicamente con péptidos en los que la secuencia terminal del neopéptido se extiende por uno o más aminoácidos adicionales, en donde dicho ligando inmunológico es reactivo específicamente con cualquiera de las secuencias siguientes en el extremo N de un péptido:

40

DFADIP	Sec. con núm. de ident.: 13
TGNLIE	Sec. con núm. de ident.: 14
LDFTGN	Sec. con núm. de ident.: 15
RLDFTG	Sec. con núm. de ident.: 16
RLEGNP	Sec. con núm. de ident.: 17
DFTGNL	Sec. con núm. de ident.: 18
DHNALE	Sec. con núm. de ident.: 19
DIDAVP	Sec. con núm. de ident.: 20
FTGNLI	Sec. con núm. de ident.: 21
GNLIED	Sec. con núm. de ident.: 22

60 o con cualquiera de las siguientes secuencias en el extremo C-terminal de un péptido:

65

DIPNLR	Sec. con núm. de ident.: 23
DGTFK	Sec. con núm. de ident.: 24
PIVLGK	Sec. con núm. de ident.: 25
DIEDGT	Sec. con núm. de ident.: 26

5

10 Pueden ensayarse sitios de escisión adicionales que definen neoepítomos de manera similar mediante la exposición de mimecano a cualquiera de las enzimas descritas en la presente descripción y mediante el aislamiento y secuenciación de los péptidos producidos de esta manera.

15 Opcionalmente, dicho ligando inmunológico tiene afinidad de unión específica para la secuencia EDIEDGTFSK [sec. con núm. de ident.: 28] en el extremo C-terminal de un péptido o tiene afinidad de unión específica para la secuencia TGNLIEDIED [sec. con núm. de ident.: 30] en el extremo N-terminal de un péptido.

20 Los ensayos para más de uno de los péptidos que se describen anteriormente pueden llevarse a cabo por separado y sus resultados combinados o más de uno de los péptidos que se describen anteriormente pueden medirse juntos.

25 El resultado de un ensayo de acuerdo con la invención puede combinarse con uno o más de otros biomarcadores que se midieron para formar un índice compuesto de valor diagnóstico o pronóstico.

30 El término "ligando inmunológico", como se usa en la presente incluye anticuerpos policlonales y monoclonales y además fragmentos de unión específicos de anticuerpos tales como los Fab o F(ab')<sub>2</sub>. De este modo, dicho ligando inmunológico puede ser un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión específica.

35 El término "proteína" usado en la presente descripción incluye lipoproteínas y proteoglicanos y otros conjugados de origen natural proteicos-(no proteicos).

40 Generalmente, todos los formatos de inmunoensayos que se conocían previamente pueden usarse de acuerdo con esta invención lo que incluye los formatos heterogéneos y homogéneos, los ensayos tipo sándwich, los ensayos de competencia, los ensayos ligados a enzimas, los radioinmunoensayos y similares. De este modo, opcionalmente, dicho método se lleva a cabo como un inmunoensayo de competencia en el cual dicho ligando inmunológico y un agente competidor se incuban en presencia de dicha muestra y el agente competidor compite con los fragmentos de péptidos en la muestra para unirse al ligando inmunológico.

45 Dicho agente competidor puede ser un péptido sintético o un péptido nativo purificado formado por escisión de mimecano.

50 Alternativamente, dicho método se realiza como un inmunoensayo de tipo sándwich en el que dicho ligando inmunológico y un ligando inmunológico adicional que tiene afinidad de unión específica por una secuencia peptídica contenida en fragmentos de péptidos unidos por dicho ligando inmunológico se incuban en presencia de dicha muestra y ambos se unen a dichos fragmentos de péptidos en la muestra. Adecuadamente, en dicho formato, un primer anticuerpo se une a la secuencia EDIEDGTFSK y un segundo anticuerpo se une a la secuencia TGNLIEDIED [sec. con núm. de ident.: 30].

55 Un método adecuado podría ser un inmunoensayo de competición que use anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión de anticuerpos que se unen a neoepítomos de fragmentos de mimecano. Los péptidos sintéticos que se seleccionen adecuadamente recubiertos sobre la superficie sólida de una placa de microtitulación pueden competir con la muestra por la unión a los anticuerpos monoclonales o a los fragmentos de unión. Alternativamente, podrían usarse en la superficie sólida fragmentos nativos purificados a partir de una o más de estas proteínas que llevan el neoepítomo reconocido por el anticuerpo monoclonal o fragmento de unión. Aún otra alternativa es inmovilizar el anticuerpo monoclonal o el fragmento de unión en la superficie sólida y después incubar conjuntamente la muestra con un péptido sintético que se unió apropiadamente a una molécula de señal, por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante o la biotina. La muestra puede ser una muestra de orina, suero, sangre, plasma u otro, por ejemplo, biopsia de placa aterosclerótica. La muestra es una muestra derivada de un paciente, y el método comprende además comparar el nivel determinado de dicha unión de dichos fragmentos de péptidos con valores característicos de (a) individuos sanos comparables y/o (b) una afección aterosclerótica patológica y opcionalmente asociar un nivel superior del péptido medido (normalmente indicado por un nivel mayor de unión) con un grado más severo de dicha afección.

60 Un aspecto de la presente invención se refiere al desarrollo de anticuerpos monoclonales que reconocen neoepítomos como se describió anteriormente. Esto puede lograrse mediante la inmunización de ratones con péptidos sintéticos que terminan en las secuencias enumeradas anteriormente, la fusión de las células del bazo de ratones seleccionados con células de mieloma, y ensayar los anticuerpos monoclonales para su unión a neoepítomos en péptidos sintéticos relevantes. La especificidad para neoepítomos puede garantizarse al exigir reactividad con un péptido sintético y una falta de reactividad con una forma prolongada en el extremo C-terminal del péptido inmunizante (para un neoepítomo en el extremo C-terminal) o una forma prolongada en el extremo N-terminal del péptido inmunizante (para un neoepítomo en el

65

extremo N-terminal). Los anticuerpos para neoepítos se evalúan, además, para establecer una falta de capacidad de unión a la proteína intacta. Alternativamente, la especificidad por un neoepítos puede asegurarse al exigir que la reactividad del anticuerpo sea dependiente negativamente de la presencia de biotina o de otros grupos funcionales que se unen covalentemente a uno de los aminoácidos terminales.

5

La invención incluye un ligando inmunológico que es inmunorreactivo específicamente con un neoepítos formado por escisión de mimecano por una proteasa en un sitio terminal en una cualquiera de las secuencias parciales expuestas anteriormente, y puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión de este.

10

La invención incluye una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal contra un neoepítos en el extremo C-terminal o N-terminal formado por escisión de mimecano en los sitios terminales de secuencias en una cualquiera de las secuencias parciales expuestas anteriormente.

15

Aún otro aspecto de la invención se refiere a kits, los que pueden usarse convenientemente para llevar a cabo los métodos descritos anteriormente.

20

Dichos kits pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con péptido sintético que lleva la secuencia del neoepítos; (2) un anticuerpo monoclonal o fragmento de unión a anticuerpo de la invención reactivo con dicho péptido sintético; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Alternativamente, dichos kits pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con fragmentos de proteína nativa purificada; (2) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neoepítos en fragmentos de una cualquiera de dichas proteínas, y reactivo con dichos fragmentos purificados; y (3) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Alternativamente, dichos kits pueden incluir (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético unido a biotina, dicho péptido sintético porta la secuencia de un neoepítos; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neoepítos en dichos fragmentos de proteína y reactivo con dicho péptido sintético; y (4) una inmunoglobulina IgG anti-ratón marcada. Aún otra alternativa podría ser kits que incluyen (1) una placa de microtitulación recubierta con estreptavidina; (2) un péptido sintético unido a biotina, dicho péptido porta la secuencia de un neoepítos; (3) un anticuerpo monoclonal que reconoce un neoepítos en dichos fragmentos de proteína (y reactivo con dicho péptido sintético) y conjugado con peroxidasa de rábano picante. Aún otra alternativa podría ser un kit que incluye (1) una placa de microtitulación recubierta (directa o indirectamente) con un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este, dicho anticuerpo reconoce un neoepítos en dicho fragmento de proteína; (2) un péptido sintético marcado con HRP que porta la secuencia de un neoepítos. O alternativamente, un kit que incluye (1) una placa de microtitulación recubierta (directa o indirectamente) con un anticuerpo monoclonal o un fragmento de este, dicho anticuerpo reconoce un neoepítos en dicho fragmento de proteína; (2) un péptido sintético marcado con biotina que porta la secuencia de un neoepítos; (3) estreptavidina marcada con HRP.

35

Por lo tanto, la invención incluye un kit de inmunoensayo que comprende un ligando inmunológico como se describe en la presente descripción, y un agente competidor que se une a dicho ligando inmunológico y opcionalmente uno o más de un reactivo de lavado, un tampón, un reactivo de parada, un marcador de enzima, sustrato del marcador de enzima, patrones de calibración, un anticuerpo anti-ratón e instrucciones para llevar a cabo dicho inmunoensayo.

40

Los ensayos descritos en la presente descripción son útiles en el diagnóstico de la enfermedad aterosclerótica en pacientes. Adicionalmente, los ensayos son útiles para la evaluación de la progresión de la enfermedad, y la supervisión de la respuesta a la terapia. Los ligandos inmunológicos de la invención pueden usarse, además, en la inmunotinción para mostrar la presencia o localización de productos de escisión de cualquier proteína de la placa aterosclerótica descrita en la presente descripción.

45

La invención se explicará e ilustrará adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

50

La Figura 1 muestra un ejemplo de una curva estándar ajustada de 4 parámetros con concentraciones de péptido de 0, 3, 125, 6, 25, 12, 5, 25, 50, 100 y 200 ng/ml obtenidas en el ejemplo 1.

La Figura 2 muestra los resultados de las pruebas de ELISA competitivas obtenidas en el ejemplo 1.

55

Los paneles A y B de la Figura 3 muestran los niveles plasmáticos de MMCN-151 en ratones control (ctrl) y ratones ApoE-KO, al inicio (BL), después de 10 semanas y después de 20 semanas de alimentación ya sea con una dieta estándar (A) o una dieta alta en grasas (B) obtenida en el ejemplo 1.

60

La figura 4 muestra los resultados obtenidos en el ejemplo 1 que muestran el efecto de la dieta sobre los niveles circulantes de neoepítos MMCN-151 después de 20 semanas de alimentación. Aquí, comparamos el efecto de la dieta normal (ND) con la dieta alta en grasas (HFD) en el plasma de ratones control (ctrl) y de los ratones con anulación de la apolipoproteína E (ApoE KO).

65

La figura 5, paneles A y B, muestran la correlación entre a) colesterol en plasma de ratones controles alimentados con HFD y sus niveles plasmáticos de fragmentos de mimecano y b) colesterol en plasma de ratones ApoE KO alimentados con HFD y los niveles de fragmentos de mimecano.

La Figura 6 muestra los niveles plasmáticos de fragmentos de mimecano en pacientes humanos caracterizados por niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  altos y controles.

La Figura 7 muestra los resultados de un ELISA tipo sándwich que se describe más abajo.

5

Ejemplo 1.

Escisión *in vitro*

10 Se escindió mimecano recombinante de ratón (núm. de cat. 2949-MC-050, R & D Systems, DIN) con MMP-12 activada (núm. de cat. ab54058, Abcam, RU). Para facilitar la escisión por la MMP-12 del mimecano, se filtró mimecano 1 mg/ml para eliminar las proteínas por debajo de 10.000 kDa (Microcon Ultracel YM-10, núm. de cat. 42407, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.). La escisión por proteasa se realizó mediante la mezcla de 100  $\mu\text{g}$  de mimecano y 1  $\mu\text{g}$  de enzima (MMP-12) en tampón MMP (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM, acetato de Zn 2 mM, pH 8,0). Como control, se mezclaron 100  $\mu\text{g}$  de mimecano únicamente con tampón MMP. Las escisiones de mimecano se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Todas las escisiones se terminaron mediante el uso de EDTA. Finalmente, la escisión se verificó por visualización mediante el uso del kit de tinción de plata SilverXpress® (núm. de cat. LC6100, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Identificación de péptidos

Los fragmentos de péptidos en las muestras *in vitro* escindidas se identificaron mediante el uso de espectrometría de masas desorción láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electronebulización (ESI) (LC-MS/MS). Las muestras MALDI-TOF se purificaron mediante el uso de puntas de pipeta zip-tips C18 (núm. de cat. ZTC18S024, Millipore, Billerica, MA, EE.UU.) de acuerdo con las especificaciones y 0,1  $\mu\text{g}$  de material se eluyeron en una placa de objetivo de acero molido MTP 384 (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania). Los espectros de masas en tándem MALDI se registraron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF ultraflex de Bruker (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) en modo reflector de ion positivo. Los espectros de masa se calibraron externamente en el intervalo  $m/z$  de 800-4.000 mediante el uso de péptidos generados por la digestión trípica de  $\beta$ -lactoglobulina bovina. Se usó el software  $m/z$  "Flexanalysis" (Bruker-Daltonics, Bremen, Alemania) para analizar los espectros. Las muestras de LCMS se ultrafiltraron para eliminar las proteínas por encima de 10 kDa, el pH se ajustó a 2,0 mediante el uso de ácido fórmico, y una muestra de 4  $\mu\text{l}$  se analizó mediante LC-MS/MS. La LC se realizó en una columna nanoACQUITY UPLC BEH C18 (Waters, Milford, MA, EE.UU.) mediante el uso de un gradiente de ácido fórmico/acetonitrilo. La MS y la MS/MS se realizaron en un espectrómetro de masas de alta definición Synapt de tiempo de vuelo cuádruple MS (QUAD-TOF; Waters, Milford, MA, EE.UU.), con un intervalo de adquisición de 350-1.600  $m/z$  en MS y 50-2.000  $m/z$ , en MS/MS. Se usó el software "ProteinLynx Global SERVER (PLGS)" (Waters, Milford, MA, EE.UU.) para analizar espectros y generar listas de picos. Para identificar los péptidos, los datos de MS y MS/MS se analizaron contra la base de datos de proteínas mimecano (FASTA) mediante el uso del software Mascot 2.2 (Matrix Science, Boston, MA, EE.UU.) tanto con las configuraciones MALDI-TOF/TOF como con ESI-QUAD-TOF.

40

Ejemplo 2.

Selección del péptido para inmunizaciones

45

Los primeros seis aminoácidos de cada extremo libre de las secuencias identificadas por MS se consideraron como neoepítopos generados por la proteasa en cuestión. Todas las secuencias generadas por proteasa obtenidas se analizaron en cuanto a la homología y la distancia a otros sitios de escisión y después se sometieron a análisis BLAST (Herramienta Básica de Búsqueda de Alineación Local) para su homología mediante el uso de la Red de Análisis de Secuencias de Proteínas NPS@.

50

Reactivos y péptidos

Todos los reactivos eran productos químicos estándar de calidad alta de compañías como Merck y Sigma Aldrich. Los péptidos sintéticos usados para la producción y validación de anticuerpos monoclonales fueron: (a) péptido inmunogénico: Ovalbúmina-GGC-EDIEDGTFSK (OVA)-sec. con núm. de ident.: 27, (b) péptido de tamizaje EDIEDGTFSK -sec. con núm. de ident.: 28, (c) péptido de deselección EDIEDGTFSK<sub>L</sub> -sec. con núm. de ident.: 29 que se ha alargado con un aminoácido en el extremo C-terminal, los cuales se compararon de Chinese Peptide Company, Beijing, China. Los reactivos de conjugación de péptidos se produjeron por Pierce (ThermoFisher, Dinamarca).

60

Tampones usados para los ELISA

El tampón usado para disolver el péptido de recubrimiento se componía de lo siguiente:  $\text{NaHPO}_4$  40 mM, 12 H<sub>2</sub>O,  $\text{KHPO}_4$  7 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, EDTA 25 mM, Tween 20 al 0,1 %, BSA al 1 %, sorbitol al 10 %, pH 7.

65

Se usó para la incubación del ensayo de suero/plasma un tampón que contenía los productos químicos siguientes: TRIZMA 100 mM, Tween 20 al 0,05 %, BSA al 0,1 %, Bronidox L5 al 0,36 %, pH 7,4. Para los pasos de lavado, usamos un tampón compuesto por: TRIZMA 25 mM, NaCl 50 mM, Bronidox L5 al 0,036 %, Tween 20 al 0,1 %, y tampón de parada de reacción compuesto de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 0,1 %.

5

Las placas ELISA usadas para el desarrollo del ensayo se recubrieron con estreptavidina de Roche núm. de cat.: 11940279. Todas las placas de ELISA se analizaron con el lector de ELISA de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA, EE.UU.).

10

Desarrollo de un ELISA

Los métodos para el desarrollo de anticuerpos monoclonales se describieron previamente (Barascuk y otros, C3). En resumen, se inmunizaron ratones Balb/C de 4-6 semanas por vía subcutánea con 200 µl de antígeno emulsionado y 50 µg de MMCN-151 (EDIEDGTFSK) como Ovalbúmina-GGC-EDIEDGTFSK. Se realizaron inmunizaciones consecutivas a intervalos de 2 semanas en adyuvante incompleto de Freund, hasta que se alcanzaron niveles de títulos de suero estables, y a los ratones se les extrajo sangre a partir de la 2da inmunización. En cada extracción de sangre, se detectó el título del suero y se seleccionó el ratón con el título de antisuero más alto para la fusión. El ratón seleccionado se dejó en reposo durante 1 mes seguido de refuerzo intravenoso con 50 µg de MMCN-151 en 100 µl de solución de cloruro de sodio al 0,9 % 3 días antes del aislamiento del bazo para la fusión celular.

15

20

Fusión

Se siguió el procedimiento de fusión descrito previamente<sup>26</sup> con SP2/0 como células de mieloma. Las células de fusión se clonaron en platos de cultivo celular de 35 mm mediante el método de medio semisólido y las placas se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub>. A continuación, los clones se colocaron en dieciséis placas de microtitulación de 96 pocillos y se dejaron durante tres días, seguido del tamizaje de los sobrenadantes de cultivo.

25

Tamizaje de anticuerpos

Los sobrenadantes se tamizaron en una configuración de ELISA competitivo. El péptido EDIEDGTFSK se usó como el péptido de selección y el EDIEDGTFSKL como el péptido alargado. Se seleccionaron líneas celulares específicas para el péptido de selección y sin reactividad cruzada con el péptido alargado y se purificaron los anticuerpos.

30

Metodología ELISA para MMCN-151

En los experimentos preliminares, optimizamos los reactivos, sus concentraciones y los períodos de incubación mediante la realización de varios análisis de tablero de damas. El ELISA de MMCN-151 se desarrolló de la manera siguiente: Una placa ELISA de 96 pocillos recubierta previamente con estreptavidina se recubrió adicionalmente con 1,25 ng/ml del péptido sintético Biotin-EDIEDGTFSK disuelto en tampón PBS-TBE a 20 °C durante 30 min mediante agitación constante a 300 rpm. La placa se lavó cinco veces en tampón de lavado y se añadieron 20 µl de muestra, seguido de 100 µl de una solución de AcM anti-humano-MMCN-151 (30 ng/ml) conjugada con peroxidasa. La placa se incubó durante 1 hora a 20 °C en tampón Tris-BT 100 mM, tiempo durante el cual se agitó a 300 rpm.

35

40

La placa se lavó de nuevo cinco veces seguido de la adición de 100 µl de tetrametilbenzidina (TMB) (núm. de cat. 438OH de Kem-En-Tec). La placa se incubó durante 15 min en la oscuridad y se agitó a 300 rpm. Para detener la reacción, se añadieron 100 µl de solución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 95-97 %, núm. de cat. Merck 1.00731) y la placa se analizó en el lector de ELISA a 450 nm con 650 nm como referencia.

45

Estándares

Se realizó una curva estándar por dilución en serie de MMCN-151 (EDIEDGTFSK). Las concentraciones estándar fueron 0, 0,3125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200 ng/ml.

50

Muestras para probar la reactividad nativa de los anticuerpos

Durante el desarrollo y la validación del ensayo, se usó suero de sujetos adultos sanos de diferentes edades y sexo. Las muestras de suero se obtienen de jóvenes voluntarios sanos de 23-50 años de edad. El control positivo usado en los ensayos fue el material obtenido de la escisión in vitro de mimecano con MMP-9 y MMP-12 humanas purificadas. Además, ensayamos muestras de suero de diferentes especies, lo que incluye ratón, rata, conejo, mono, y cerdo para determinar el nivel de reactividad cruzada entre especies.

55

60

Evaluación técnica del ELISA

Todos los ELISA se desarrollaron de acuerdo con los procedimientos operativos estándares internos. Abordamos los requisitos siguientes:

65

Precisión y exactitud dentro del ensayo: Se realizaron 10 corridas independientes en 10 placas diferentes en las muestras de prueba, las cuales consisten de suero humano.

5 Precisión y exactitud interensayos: Esto se determinó mediante 10 corridas de ensayo independientes de cada muestra de validación en 10 placas diferentes.

10 Límite inferior de detección (LLD, por sus siglas en inglés): En una corrida analítica, se realizaron 40 determinaciones del estándar más bajo (los estándares cero). Esto se repitió tres veces. En cada plato se estimó el LLD como el siguiente:  $LLD = media - 3 \times Desv. Est.$  La concentración del LLD se calculó mediante el uso de la ecuación de ajuste de 4 parámetros para generar la concentración promedio del LLD.

Recuperación: Cuatro muestras diferentes que cubrían más del 50 % de la curva estándar, de todas las diluciones, fueron retrocalculadas de muestras diluidas a no diluidas para estimar el porcentaje de recuperación.

#### 15 Muestras de animales

20 ratones machos ApoE KO y 20 ratones machos C57BL/6 de tipo salvaje de 10 semanas de edad de Taconic, Europa A/S (Lille Skensved, Dinamarca) se alimentaron tanto con la dieta de mantenimiento estándar Altromin (ID del producto: 1320, Brogaarden, Dinamarca) como con la dieta con alto contenido de grasa D12492 que contiene 60 % de grasa (Brogaarden, Dinamarca), ad libitum. Se siguieron las directrices éticas para las investigaciones experimentales en animales y el protocolo fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación local - "Dyreforsogstilsynet". El estudio se ajustó, además, a la "Guide for care and use of laboratory animals" publicada por el National Institute of Health de los EE.UU. Cuando los ratones tenían 10 (inicio del estudio), 20 y 30 semanas, las muestras de plasma se colectaron mediante muestreo de sangre mediante el uso de la punción retroorbital o, en el caso del sacrificio, en las semanas 20 o 25 30, mediante aspiración con jeringa de la vena yugular (alrededor de 1 ml). La sangre heparinizada (heparina de litio) se centrifugó, y el plasma se congeló a -20 °C hasta que se analizó. El colesterol plasmático se midió por ensayos enzimáticos mediante el uso de un analizador de Molecular Devices, SpectraMax M, (CA, EE.UU.).

#### 30 Densitometría

Las mediciones de densitometría se realizaron mediante el uso de UN-SCAN-IT Versión 6.1 de Silk Scientific, de acuerdo con las directrices del fabricante.

#### 35 Análisis de imágenes de histología

Las secciones histológicas de aorta de ratón se tiñeron con azul Alcian y se analizaron mediante el uso del software Visiopharm versión 3.2.8.0 (Hørsholm, Dinamarca). La aplicación Visiopharm permitió la cuantificación de áreas de tejido específicas que contenían tinción positiva. Las imágenes se adquirieron mediante el uso de una cámara digital de microscopio Pixelink PL-A623C.

#### 40 Análisis estadístico

45 Para la validación del ensayo, se ajustó la densidad óptica contra la concentración del analito mediante la aplicación de una regresión logística de cuatro parámetros a la curva de calibración. Se calculó el promedio, desviaciones estándar, porcentaje de coeficiente de variación (% CV), y las diferencias a partir de los valores teóricos para todos los estándares y muestras. Los datos cuantitativos se analizaron mediante el uso de GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EE.UU.). Las diferencias significativas entre medias se determinaron mediante el uso de la prueba t de Student de dos colas no pareada, sin asumir una distribución gaussiana. Las correlaciones entre los valores séricos de MMCN-151 y el resto de las variables estudiadas se analizaron con la prueba de dos colas de Pearson. Los datos se expresaron como 50  $media \pm error estándar$  de la media y las diferencias se consideraron significativas a un nivel de p de 0,05 o inferior.

#### Resultados

##### 55 Especificaciones técnicas de ELISA

El anticuerpo con la mejor reactividad nativa, afinidad y estabilidad en el ensayo se eligió a partir de los clones productores de anticuerpos generados después de la fusión de células de bazo y mieloma. El clon elegido para la purificación del anticuerpo y el posterior desarrollo del ELISA fue el NB206-15B6-F8, levantado contra el antígeno MMCN-151.

##### 60 Curva estándar y recuperación

En la figura 1 se presenta una curva estándar típica, que muestra los estándares elegidos y la ecuación de ajuste de 4 parámetros para la determinación de la concentración de la muestra, basada en concentraciones de péptido de 0, 3, 125, 6,25, 12,5, 25, 50, 100 y 200 ng/ml.

65

La determinación de la linealidad o recuperación por dilución en muestras diferentes resultó en lo siguiente. El promedio de las recuperaciones determinadas retrocalculadas a partir de muestras diluidas 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 en la muestra no diluida fueron cercanas al 100 % y dentro del  $\pm 10$  % recomendado (datos no mostrados).

5 Para garantizar que el anticuerpo producido es específico para el neopéptido de mimecano y no reacciona de forma cruzada con el péptido alargado o el mimecano total, analizamos la reactividad de ensayo del mimecano escindido con MMP-12 en comparación con el mimecano sin escindir y el péptido alargado. La figura 2 muestra los resultados de la prueba de ELISA competitivo de la reacción del anticuerpo MMCN-151 frente a péptido libre, péptido alargado, mimecano escindido con MMP12 y mimecano intacto. El eje x es representativo de las concentraciones de péptido libre y alargado.  
10 Las concentraciones de muestras que contienen mimecano y mimecano escindido con MMP12 son de 43 ug/ml como la concentración más alta seguida por la dilución en factor de 2 de las muestras. Como se muestra en la figura 2, el anticuerpo MMCN-151 es específico frente al péptido sintético libre (EDIEDGTFSK), lo que resulta en la inhibición de la señal desde aproximadamente 2,0 DO (450-650) a 0,5. Se observan resultados similares para el mimecano escindido in vitro por MMP12, donde la inhibición de la señal sigue la curva del péptido sintético. Además, parece que no hay inhibición de la señal en la muestra que contiene el péptido sintético alargado con un aminoácido EDIEDGTFSK<sub>L</sub>). Se observa una competencia muy débil con el mimecano intacto a la concentración más alta.

El límite de detección más bajo (LLD) se define como la concentración de analito más baja que puede determinarse cuantitativamente con una precisión adecuada, fue de 0,5 ng/ml en el ensayo.

20 Variabilidad intraensayo y variabilidad interensayo de la precisión

Variabilidad intraensayo, calculada como el % de coeficiente de variación promedio (% CV) de las lecturas de 10 repeticiones de cuatro muestras de suero humano y una muestra de suero de rata. Para las cuatro muestras de suero humano con una concentración promedio de MMCN-151 de 5 ng/ml, la variabilidad intraensayo promedio fue del 1,3 %. La muestra de suero de rata tuvo una concentración media de MMCN-151 de 13 ng/ml con una variabilidad intraensayo promedio del 1,1 %.

30 Se calcularon los % CV medios interensayo a partir de los mismos conjuntos de muestras que los patrones y las pruebas intraensayo, pero en 10 placas diferentes en 10 días diferentes. La variabilidad interensayos promedio, entre los niveles más altos y más bajos detectados, fue del 10,2 %.

Los valores plasmáticos de MMCN-151 reflejan aterosclerosis temprana en ratones ApoE KO.

35 Los niveles plasmáticos de MMCN-151 se midieron en ratones ApoE KO y en los controles C57bl6 al inicio, y a las 10 y 20 semanas de alimentación con comida normal o dieta alta en grasas HFD, los resultados se muestran en la figura 3, paneles a y b, respectivamente. El efecto de la dieta en los ratones ApoE KO en comparación con los ratones control a las 20 semanas se comparó en la figura 3 panel c.

40 Los resultados del ANOVA de una vía fueron significativos ( $p < 0,0001$ ) tanto en el grupo de dieta control como en el grupo con HFD; en particular, los valores de MMCN-151 fueron mayores significativamente en ratones ApoE-KO en HFD tanto a las 10 y 20 semanas de alimentación 12,1 ng/ml,  $p < 0,001$  y 18,2 ng/ml,  $p < 0,001$  en comparación respectivamente con los ratones control en HFD con 5,7 ng/ml,  $p < 0,001$  y 10,4 ng/ml.

45 El efecto de HFD en los niveles circulantes de MMCN-151 aumenta significativamente ( $p = 0,002$ ) en ratones ApoE-KO en comparación con los controles después de 20 semanas de alimentación. No hubo ningún efecto en los niveles de MMCN-151 en animales que consumieron dieta control, ver figura 3C.

50 Niveles de colesterol plasmático en ratones control y ApoE KO.

La figura 4 muestra los niveles de colesterol medidos en plasma de ratones al inicio del estudio y después de 20 semanas de alimentación con dieta normal (ND) o dieta alta en grasas (HFD) en ratones control (ctrl) o en ratones ApoE-KO. Se identificó un nivel más alto significativamente de colesterol en los ratones control cuando se comparó el valor basal y el punto tiempo 20 semanas para los ratones alimentados con HFD ( $p < 0,001$ ), pero no para los ratones alimentados con ND. En el caso de los animales ApoE KO, existe como se espera un aumento significativo del colesterol después de las 20 semanas de alimentación en comparación con el valor basal tanto en la dieta normal ( $p = 0,001$ ) como en la HFD ( $p = 0,001$ ). Además, existe una diferencia significativa en los niveles de colesterol entre los ratones ApoE KO y los de control en el nivel basal y en ambos grupos de dieta ( $p < 0,001$ ).

60 Además, investigamos la relación lineal entre los valores plasmáticos de MMCN-151 y el colesterol total en ratones control después de 20 semanas de HFD ( $r = 0,48$ ;  $p = 0,276$ ) animales ApoE-KO ( $r = 0,04$ ;  $p = 0,931$ ), figura 5. La figura 5 muestra la correlación lineal entre a) colesterol en plasma de ratones controles alimentados con HFD y sus niveles en plasma de MMCN-151 y b) colesterol en plasma de ratones ApoE KO alimentados con HFD y los niveles de MMCN-151.

65 El MMCN-151 plasmático aumenta en pacientes con calcificaciones arteriales.

Se obtuvo una mayor comprensión sobre la idoneidad de MMCN-151 como un indicador sustituto de los cambios patológicos en el tejido cardiovascular mediante la medición de los niveles plasmáticos de MMCN-151 en pacientes diagnosticados con deposición alta de calcio coronario en el sistema cardiovascular. Comparamos estos niveles plasmáticos de MMCN-151 con los niveles plasmáticos de controles de la misma edad sin deposición diagnosticada de calcio coronario, figura 6.

El trabajo anterior muestra que hubo un aumento significativo en MMCN-151 en pacientes con deposiciones de calcio coronario en comparación con sus controles de la misma edad. Además de las deposiciones de calcio coronario, estos dos grupos de pacientes parecen similares, sin diferencias significativas en los niveles de colesterol en plasma, presión arterial o triglicéridos.

En conclusión, hemos desarrollado un ensayo competitivo robusto técnicamente que usa un anticuerpo monoclonal específico para la detección en suero y plasma de humanos, rata y ratón de MMCN-151, un fragmento de mimecano que se deriva de la degradación de MMP-9 y 12. Demostramos que MMCN-151 se eleva significativamente en ratones ApoE KO alimentados con una dieta alta en grasas durante 20 semanas en comparación con los ratones control. Adicionalmente, hemos demostrado que las muestras de plasma humano de pacientes diagnosticados con deposiciones de calcio coronario extensas estaban significativamente elevadas en comparación con los controles de la misma edad. Hemos establecido el principio de que los fragmentos que contienen neoepítipo de mimecano proporcionan biomarcadores valiosos para la CVD y para la calcificación de la placa aterosclerótica.

Ejemplo 3.

Ensayo ELISA tipo sándwich

Un ensayo ELISA tipo sándwich para mimecano se ha desarrollado de la manera siguiente: un anticuerpo receptor se dirige hacia la secuencia de neoepítipo EDIEDGTFSK<sup>165</sup> generada mediante la escisión *in vitro* de mimecano por MMP9 y MMP12 y un anticuerpo trazador marcado con HRP se dirige hacia la secuencia solapada parcialmente <sup>151</sup>TGNLIEDIED<sup>160</sup>. El procedimiento de ELISA fue el siguiente: se recubre una placa de 96 pocillos precubierta con 1 µg/ml del anticuerpo receptor biotinilado, se disuelve en tampón PBS-BTB 25 mM y se incuba durante 1 hora a 20 °C. Los calibradores se prepararon mediante una dilución en factor de 2 de una muestra de suero humano con una concentración elevada de los antígenos (MIM2, fragmentos de mimecano). Se añadieron 20 µl del calibrador o muestra a los pocillos apropiados, seguidos de 100 µl de tampón PBS-BTB 25 mM y la incubación durante 1 hora a 20 °C. Se añadieron 100 µl de anticuerpo trazador conjugado con HRP 1 µg/ml al pocillo y se incubaron durante 1 hora a 20 °C. Finalmente, se añadieron 100 µl del revelador tetrametilbencidina (TMB) (núm. de cat. 438OH Kem-E-Tec, Taastrup, Dinamarca), y la placa se incubó durante 15 minutos a 20 °C en la oscuridad. Todas las etapas de incubación anteriores incluyen agitación a 300 rpm. Después de cada etapa de incubación, la placa se lavó cinco veces en tampón de lavado (Tris 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,2). La reacción TMB se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución de parada (HCl al 1 %) y se midió a 450 nm con 650 nm como referencia. Se trazó una curva de calibración estándar mediante el uso de un modelo de ajuste matemático de 4 parámetros con una concentración inicial de 500 ng/ml para el calibrador mediante el uso de una dilución en factor de 2 y el último estándar fue un estándar cero.

Este ensayo se usó para medir muestras de plasma de CVD obtenidas a través de una colaboración académica. El grupo de pacientes incluyó pacientes con aneurisma aórtico abdominal (AAA) (n=6, 3 f, 3 m, edad promedio=69,16±18,36, BMI promedio=27±4,33), pacientes con aterosclerosis (n=40, 13 f, 27 m, edad promedio=69,25±10,18, BMI=27,63±7,17), pacientes con enfermedad vascular periférica (PVD, por sus siglas en inglés) (n=22, 8 f, 14 m, edad promedio=68,33±9,94, BMI=30,84±5,00) y pacientes control formados por pacientes quirúrgicos no afectados por la CVD (n=25, 14 f, 11 m, edad promedio=54,57±18,46, IMC=31,19±7,9).

Los resultados se muestran en la figura 7. Los datos muestran una presencia mayor significativamente del fragmento de mimecano investigado (MIM2) en el plasma de pacientes con aneurisma aórtico abdominal (AAA). Tres de las muestras de plasma de pacientes con AAA tenían valores de MIM2 muy por encima del intervalo de medición y, por lo tanto, no se incluyeron en la figura. Además, las muestras de plasma de pacientes ateroscleróticos fueron elevadas en comparación con los controles. No se observaron diferencias en pacientes con enfermedad vascular periférica (PVD) en comparación con los controles. Estos datos muestran el potencial de este fragmento de mimecano evaluado en un ensayo tipo sándwich como un marcador no invasivo de enfermedades cardiovasculares e indican que la remodelación de mimecano es un evento importante en la patogénesis de la CVD, lo que lleva a la liberación de fragmentos de mimecano a la circulación.

Lista de referencias

American Heart Association. Heart Disease and Stroke Statistics - 2007 Update. Dallas, Texas: American Heart Association; 2007. [http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1166712318459HS\\_StatsInsid\\_eText.pdf](http://www.americanheart.org/downloadable/heart/1166712318459HS_StatsInsid_eText.pdf) 2007.  
 Arroyo LH, Lee RT. Mechanisms of plaque rupture: mechanical and biologic interactions. *Cardiovasc Res* 1999 febrero;41(2):369-75.  
 Barascuk N, Veidal SS, Larsen L y otros. A novel assay for extracellular matrix remodeling associated with liver fibrosis: An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for a MMP-9 proteolytically revealed neo-epitope of type III collagen. *Clin Biochem* 2010 abril 7.

- Bellosta S, Baetta R, Canavesi M y otros. Raloxifene inhibits matrix metalloproteinases expression and activity in macrophages and smooth muscle cells. *Pharmacol Res* 2007 agosto;56(2):160-7.
- Bobryshev YV. Calcification of elastic fibers in human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 2005;180:293-303.
- 5 Brown, D. C. and K. G. Vogel. "Characteristics of the in vitro interaction of a small proteoglycan (PG II) of bovine tendon with type I collagen." *Matrix*. 9.6 (1989): 468-78.
- Cattin L, Fiscaro M, Tonizzo M, Valenti M, Danek GM, Fonda M, Da Col PG, Casagrande S, Pincetri E, Bovenzi M, and Baralle F. Polymorphism of the apolipoprotein E gene and early carotid atherosclerosis defined by ultrasonography in asymptomatic adults. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 enero;17(1):91-4.
- 10 Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu.Rev.Physiol* 1997;59:63-88.
- Clarkson TB, Kaplan JR. Stage of Reproductive Life, Atherosclerosis Progression and Estrogen Effects on Coronary Artery Atherosclerosis, In: Lobo RA, editor. *Treatment of the Postmenopausal Woman: Basic and Clinical Aspects*, 3 ed. San Diego: Elsevier; 2007. págs. 509-28.
- 15 Death AK, Fisher EJ, McGrath KC, Yue DK. High glucose alters matrix metalloproteinase expression in two key vascular cells: potential impact on atherosclerosis in diabetes. *Atherosclerosis* 2003 junio;168(2):263-9.
- Danielson, K. G., y otros. "Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility." *J.Cell Biol*. 136.3 (1997): 729-43. Dours-Zimmermann, M. T. and D. R. Zimmermann. "A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican." *J.Biol.Chem*. 269.52 (1994): 32992-98.
- 20 Eriksen HA, Satta J, Risteli J, Veijola M, Vare P, Soini Y. Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis. *Atherosclerosis* 2006;189:91-98.
- Evanko, S. P., y otros. "Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta." *Am.J.Pathol*. 152.2 (1998): 533-46.
- Funderburgh, J. L. "Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function." *Glycobiology* 10.10 (2000): 951-58.
- 25 Funderburgh, J. L., y otros. "Macrophage receptors for lumican. A corneal keratan sulfate proteoglycan." *Invest Ophthalmol.Vis.Sci*. 38.6 (1997): 1159-67.
- Funderburgh JL, Corpuz LM, Roth MR, Funderburgh ML, Tasheva ES, Conrad GW. Mimecan, the 25-kDa corneal keratan sulfate proteoglycan, is a product of the gene producing osteoglycin. *J Biol Chem* 1997 octubre 31;272(44):28089-95.
- 30 Gabay C and Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*. 1999 feb 11;340(6):448-54.
- Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G y otros. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 junio;25(6):1119-27.
- Gardner CD, Fortmann SP, Krauss RM. Association of small low-density lipoprotein particles with the incidence of coronary artery disease in men and women. *JAMA* 1996;276:875-81.
- 35 Garrone R, Lethias C, Le Guellec D. Distribution of minor collagens during skin development. *Microsc.Res Tech*. 1997;38:407-12.
- Geffer ML, Margulies DH, Scharff MD. A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells. *Somatic Cell Genet* 1977 marzo;3(2):231-6.
- 40 Graham I, Atar D, Borch-Johnsen K, Boysen G, Burell G, Cifkova R y otros. European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: executive summary. *Atherosclerosis* 2007;194:1-45.
- Halpert I, Sires UI, Roby JD y otros. Matrilysin is expressed by lipid-laden macrophages at sites of potential rupture in atherosclerotic lesions and localizes to areas of versican deposition, a proteoglycan substrate for the enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996 septiembre 3;93(18):9748-53.
- 45 Haraki T, Takegoshi T, Kitoh C, Wakasugi T, Saga T, Hirai JI, Aoyama T, Inazu A and Mabuchi H. Carotid artery intima-media thickness and brachial artery flow-mediated vasodilation in asymptomatic Japanese male subjects amongst apolipoprotein E phenotypes. *J Intern Med*. 2002 agosto;252(2):114-20.
- Hatanaka K, Li XA, Masuda K, Yutani C and Yamamoto A. Immunohistochemical localization of C-reactive protein-binding sites in human atherosclerotic aortic lesions by a modified streptavidin-biotin-staining method. *Pathol Int*. 1995 sep; 45(9):635-41.
- 50 Heegaard AM, Corsi A, Danielsen CC, Nielsen KL, Jorgensen HL, Riminucci M, Young MF and Bianco P. Biglycan deficiency causes spontaneous aortic dissection and rupture in mice. *Circulation*. 2007 May 29;115(21):2731-8. Epub 2007 mayo14.
- Herman MP, Sukhova GK, Libby P, Gerdes N, Tang N, Horton DB y otros. Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling. *Circulation* 2001;104:1899-904.
- 55 Høst NB, Jensen LT, Bendixen PM, Jensen SE, Koldkjaer OG, Simonsen EE. The aminoterminal propeptide of type III procollagen provides new information on prognosis after acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1995 noviembre 1; 76(12) : 869-73.
- Jeppesen J, Hein HO, Suadicani P, Gyntelberg F. High triglycerides/low high-density lipoprotein cholesterol, ischemic electrocardiogram changes, and risk of ischemic heart disease. *Am Heart J* 2003;145:103-08.
- 60 Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2007 marzo;5(2):265-82.
- Kampmann A, Fernandez B, Deindl E y otros. The proteoglycan osteoglycin/mimecan is correlated with arteriogenesis. *Mol Cell Biochem* 2009 febrero;322(1-2):15-23.

- Karsdal MA, Henriksen K, Leeming DJ y otros. Biochemical markers and the FDA Critical Path: how biomarkers may contribute to the understanding of pathophysiology and provide unique and necessary tools for drug development. *Biomarkers* 2009 mayo;14(3):181-202.
- 5 Karsdal MA, Byrjalsen I, Leeming DJ, Christiansen C. Tibolone inhibits bone resorption without secondary positive effects on cartilage degradation. *BMC Musculoskelet Disord* 2008;9:153.
- Katsuda S, Kaji T. Atherosclerosis and extracellular matrix. *J Atheroscler Thromb* 2003; 10(5) : 267-74.
- Knox, S. M. and J. M. Whitelock. "Perlecan: how does one molecule do so many things?" *Cell Mol.Life Sci.* 63.21 (2006): 2435-45.
- 10 Koenig W, Khuseynova N. Biomarkers of atherosclerotic plaque instability and rupture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 enero; 27 (1) :15-26.
- Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. Morphometric analysis of the composition of atherosclerotic plaques in the four major epicardial coronary arteries in acute myocardial infarction and in sudden coronary death. *Circulation* 1989 diciembre;80(6):1747-56.
- 15 Kuller LH, Tracy RP, Shaten J and Meilahn EN, Relation of C-reactive protein and coronary heart disease in the MRFIT nested case-control study. *Multiple Risk Factor Intervention Trial. Am J Epidemiol.* 1996 sep 15; 144(6) : 537-47.
- Kunz J. Matrix metalloproteinases and atherogenesis in dependence of age. *Gerontology.* 2007;53:63-73.
- Kuzuya M, Nakamura K, Sasaki T, Cheng XW, Itohara S, Iguchi A. Effect of MMP-2 deficiency on atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2006; 26 : 1120-25.
- 20 Lauer-Fields JL, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen catabolism. *Biopolymers* 2002; 66(1) :19-32.
- Lawrie TD, Mcalpine SG, Rifkind BM, Robinson JF. Serum fatty-acid patterns in coronary-artery disease. *Lancet* 1961;1:421-24.
- Leinonen M and Saikku P, Evidence for infectious agents in cardiovascular disease and atherosclerosis. *Lancet Infect Dis.* 2002 enero;2(1):11-7.
- 25 Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol* 2004;24:1359-66.
- Lutgens, S. P., y otros. "Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease." *FASEB J.* 21.12 (2007): 3029-41.
- Luttun A, Lutgens E, Manderveld A y otros. Loss of matrix metalloproteinase-9 or matrix metalloproteinase-12 protects apolipoprotein E-deficient mice against atherosclerotic media destruction but differentially affects plaque growth. *Circulation* 2004 marzo 23; 109(11) : 1408-14.
- 30 Mayne R. Collagenous proteins of blood vessels. *Arteriosclerosis.* 1986; 6: 585-93.
- McCullagh KG, Duance VC, Bishop KA. The distribution of collagen types I, III and V (AB) in normal and atherosclerotic human aorta. *J Pathol* 1980 enero; 130 (1) : 45-55.
- Mecham RP, Broekelmann TJ, Fliszar CJ, Shapiro SD, Welgus HG, Senior RM. Elastin degradation by matrix metalloproteinases. Cleavage site specificity and mechanisms of elastolysis. *J Biol Chem* 1997 julio 18; 272 (29) : 18071-6.
- 35 Mendall MA, Patel P, Ballam L, Strachan D and Northfield TC. C reactive protein and its relation to cardiovascular risk factors: a population based cross sectional study.,*BMJ.* 1996 abril 27; 312 (7038) : 1061-5.
- Monfort J, Nacher M, Montell E, Vila J, Verges J and Benito P, Chondroitin sulfate and hyaluronic acid (500-730 kda) inhibit stromelysin-1 synthesis in human osteoarthritic chondrocytes. *Drugs Exp Clin Res.* 2005; 31 (2) : 71-6.
- 40 Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT. Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture. *Circulation* 1994 agosto;90(2):775-8.
- Pasceri V, Willerson JT and Yeh ET, Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells.*Circulation.* 2000 oct 31; 102(18) : 2165-8.
- 45 Register TC, Cann JA, Kaplan JR, Williams JK, Adams MR, Morgan TM y otros. Effects of soy isoflavones and conjugated equine estrogens on inflammatory markers in atherosclerotic, ovariectomized monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:1734-40.
- Reynolds GD and Vance RP. C-reactive protein immunohistochemical localization in normal and atherosclerotic human aortas. *Arch Pathol Lab Med.* 1987 marzo; 111(3) : 265-9.
- 50 Ridker PM, Intrinsic fibrinolytic capacity and systemic inflammation: novel risk factors for arterial thrombotic disease. *Haemostasis.* 1997;27 Suppl 1:2-11.
- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE and Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000 marzo 23;342(12):836-43.
- Rodriguez-Lee M, Bondjers G and Camejo G, Fatty acid-induced atherogenic changes in extracellular matrix proteoglycans. *Curr Opin Lipidol.* 2007 oct;18(5):546-53
- 55 Rosenquist C, Fledelius C, Christgau S y otros. Serum CrossLaps One Step ELISA. First application of monoclonal antibodies for measurement in serum of bone-related degradation products from C-terminal telopeptides of type I collagen. *Clin Chem* 1998 noviembre;44(11):2281-9.
- Rouis M. Matrix metalloproteinases: a potential therapeutic target in atherosclerosis. *Curr Drug Targets.Cardiovasc Haematol Disord.* 2005;5:541-48.
- 60 Rudel LL, Haines J, Sawyer JK, Shah R, Wilson MS, Carr TP. Hepatic origin of cholesteryl oleate in coronary artery atherosclerosis in African green monkeys. Enrichment by dietary monounsaturated fat. *J Clin Invest* 1997;100:74-83.
- Salisbury BG and Wagner, W DJ *Biol Chem.* 1981 Aug 10;256(15):8050-7,'Isolation and preliminary characterization of proteoglycans dissociatively extracted from human aorta'.
- 65 Satta J, Juvonen T, Haukipuro K, Juvonen M, Kairaluoma MI. Increased turnover of collagen in abdominal aortic aneurysms, demonstrated by measuring the concentration of the aminoterminal propeptide of type III procollagen in peripheral and aortal blood samples. *J Vasc.Surg.* 1995;22:155-60.

- Schaar JA, Mastik F, Regar E, den Uil CA, Gijzen FJ, Wentzel JJ y otros. Current diagnostic modalities for vulnerable plaque detection. *Curr Pharm Des.* 2007;13:995-1001. Shanahan CM, Cary NR, Osbourn JK, Weissberg PL. Identification of osteoglycin as a component of the vascular matrix. Differential expression by vascular smooth muscle cells during neointima formation and in atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997 noviembre;17(11):2437-47.
- 5 Shekhonin BV, Domogatsky SP, Muzykantov VR, Idelson GL, Rukosuev VS. Distribution of type I, III, IV and V collagen in normal and atherosclerotic human arterial wall: immunomorphological characteristics. *Coll Relat Res* 1985 septiembre;5(4):355-68.
- Siest G, Pillot T, Regis-Bailly A, Leininger-Muller B, Steinmetz J, Galteau MM and Visvikis S, Apolipoprotein E: an important gene and protein to follow in laboratory medicine. *Clin Chem.* 1995 ago;41(8 Pt 1):1068-86.
- 10 Shin, J., J. E. Edelberg, and M. K. Hong. "Vulnerable atherosclerotic plaque: clinical implications." *Curr.Vasc.Pharmacol.* 1.2 (2003): 183-204.
- Sondergaard BC, Wulf H, Henriksen K y otros. Calcitonin directly attenuates collagen type II degradation by inhibition of matrix metalloproteinase expression and activity in articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006 agosto; 14(8) : 759-68.
- 15 Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Arch A.Pathol Anat.Histopathol.* 1992;421:277-90.
- Sundstrom J, Vasan RS. Circulating biomarkers of extracellular matrix remodeling and risk of atherosclerotic events. *Curr Opin Lipidol.* 2006;17:45-53.
- 20 Talusan, P., y otros. "Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry." *Mol.Cell Proteomics.* 4.9 (2005): 1350-57.
- Tasheva ES, Corpuz LM, Funderburgh JL, Conrad GW. Differential splicing and alternative polyadenylation generate multiple mimecan mRNA transcripts. *J Biol Chem* 1997 diciembre 19;272(51):32551-6.
- Thompson D, Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Raynes J, Illingworth JM, Perren TJ, Selby PJ and Whicher JT, The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol.* 1995 oct;102(1):217-23.
- 25 Terry JG, Howard G, Mercuri M, Bond MG and Crouse JR 3rd. Apolipoprotein E polymorphism is associated with segment-specific extracranial carotid artery intima-media thickening., *Stroke.* 1996 oct;27(10):1755-9.
- Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN and Kuller LH, Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly. Results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997 jun;17(6):1121-7.
- 30 Turu MM, Krupinski J, Catena E, Rosell A, Montaner J, Rubio F y otros. Intraplaque MMP-8 levels are increased in asymptomatic patients with carotid plaque progression on ultrasound. *Atherosclerosis* 2006;187:161-69.
- Uemura S, Matsushita H, Li W y otros. Diabetes mellitus enhances vascular matrix metalloproteinase activity: role of oxidative stress. *Circ Res* 2001 junio 22;88(12):1291-8.
- 35 Veidal SS, Bay-Jensen AC, Tougas G, Karsdal MA, Vainer B. Serum markers of liver fibrosis: combining the BIPED classification and the neo-epitope approach in the development of new biomarkers. *Dis Markers* 2010;28(1):15-28.
- Venugopal SK, Devaraj S, Yuhanna I, Shaul P and Jialal I. Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells., *Circulation.* 2002 sep 17;106(12):1439-41.
- Wagner WD. Proteoglycan structure and function as related to atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1985;454:52-68.:52-68.
- 40 Wang TJ, Gona P, Larson MG, Tofler GH, Levy D, Newton-Cheh C y otros. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med* 2006;355:2631-39.
- Whitelock, J. M. and R. V. Iozzo. "Heparan sulfate: a complex polymer charged with biological activity." *Chem.Rev.* 105.7 (2005): 2745-64.
- 45 Wight, T. N. "The extracellular matrix and atherosclerosis." *Curr.Opin.Lipidol.* 6.5 (1995): 326-34.
- Wight, T. N., y otros. "Vascular cell proteoglycans: evidence for metabolic modulation." *Ciba Found.Symp.* 124 (1986): 241-59.
- Wight TN, Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 oct;14(5):617-23.
- Wight TN and Merrilees MJ, Proteoglycans in atherosclerosis and restenosis: key roles for versican. *Circ Res.* 2004 mayo 14;94(9):1158-67.
- 50 Wilson PW, Schaefer EJ, Larson MG and Ordovas JM. Apolipoprotein E alleles and risk of coronary disease. A meta-analysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996 oct;16(10):1250-5.
- Yamada Y, Izawa H, Ichihara S, Takatsu F, Ishihara H, Hirayama H y otros. Prediction of the risk of myocardial infarction from polymorphisms in candidate genes. *N Engl J Med* 2002;347:1916-23.
- 55 Yamada S, Wang KY, Tanimoto A y otros. Matrix metalloproteinase 12 accelerates the initiation of atherosclerosis and stimulates the progression of fatty streaks to fibrous plaques in transgenic rabbits. *Am J Pathol* 2008 mayo;172(5):1419-29.
- Zwaka TP, Hombach V and Torzewski J. C-reactive protein-mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis., *Circulation.* 2001 marzo 6;103(9):1194-7.

60 Listado de secuencias

<110> Nordic Bioscience A/S

<120> Marcadores bioquímicos para la evaluación del riesgo de CVD

65

<130> PJS/P17605WO

<150>GB1107922.5  
<151>2011-05-12

5 <160>30

<170>BISSAP1.0

10 <210>1  
<211>9  
<212>PRT  
<213>Homo sapiens

15 <220>  
<221>FUENTE  
<222>1..9  
<223> /tipo de molécula="proteína"  
/organismo="Homo sapiens"

20 <400> 1  
Asp Phe Ala Asp Ile Pro Asn Leu Arg  
1 5

25 <210>2  
<211>15  
<212>PRT  
<213>Homo sapiens

30 <220>  
<221>FUENTE  
<222>1..15  
<223> /tipo de molécula="proteína"  
/organismo="Homo sapiens"

35 <400> 2  
Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe Ser Lys  
1 5 10 15

40 <210>3  
<211>18  
<212>PRT  
<213>Homo sapiens

45 <220>  
<221>FUENTE  
<222>1..18  
<223> /tipo de molécula="proteína"  
/organismo="Homo sapiens"

50 <400> 3  
Leu Asp Phe Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe  
1 5 10 15  
Ser Lys

55 <210>4  
<211>10  
<212>PRT  
<213>Homo sapiens

60 <220>  
<221>FUENTE  
<222>1..10  
<223> /tipo de molécula="proteína"  
/organismo="Homo sapiens"

<400> 4  
 Leu Glu Gly Asn Pro Ile Val Leu Gly Lys  
 1 5 10

5 <210>5  
 <211>16  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

10 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..16  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

15 <400> 5  
 Arg Leu Asp Phe Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr  
 1 5 10 15

20 <210>6  
 <211>19  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

25 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..19  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

30 <400> 6  
 Arg Leu Asp Phe Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Phe Ser Lys

35 <210>7  
 <211>11  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

40 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..11  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

45 <400> 7  
 Arg Leu Glu Gly Asn Pro Ile Val Leu Gly Lys  
 1 5 10

50 <210>8  
 <211>17  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

55 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..17  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

<400> 8  
 Asp Phe Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe Ser  
 1 5 10 15  
 Lys

<210>9  
 <211>17  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 5  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..17  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 10  
 <400> 9  
 Asp His Asn Ala Leu Glu Ser Val Pro Leu Asn Leu Pro Glu Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Arg  
 15  
 <210>10  
 <211>10  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 20  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..10  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 25  
 <400> 10  
 Asp Ile Asp Ala Val Pro Pro Leu Pro Lys  
 1 5 10  
 30  
 <210>11  
 <211>10  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 35  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..10  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 40  
 <400> 11  
 Asp Ile Asp Ala Val Pro Pro Leu Pro Lys  
 1 5 10  
 45  
 <210>12  
 <211>14  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 50  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..14  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 55  
 <400> 12  
 Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe Ser Lys  
 1 5 10  
 60  
 <210>13  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 <220>



**Arg Leu Glu Gly Asn Pro**  
 1                      5

5 <210>18  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

10 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

15 <400> 18  
**Asp Phe Thr Gly Asn Leu**  
 1                      5

20 <210>19  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

25 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

30 <400> 19  
**Asp His Asn Ala Leu Glu**  
 1                      5

35 <210>20  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

40 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

45 <400> 20  
**Asp Ile Asp Ala Val Pro**  
 1                      5

50 <210>21  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

55 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

60 <400> 21  
**Phe Thr Gly Asn Leu Ile**  
 1                      5

<210>22  
 <211>6  
 <212>PRT

<213>Homo sapiens  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 5 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 <400> 22  
 Gly Asn Leu Ile Glu Asp  
 10 1 5  
 <210>23  
 <211>6  
 <212>PRT  
 15 <213>Homo sapiens  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 20 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 <400> 23  
 Asp Ile Pro Asn Leu Arg  
 25 1 5  
 <210>24  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 30 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 35 /organismo="Homo sapiens"  
 <400> 24  
 Asp Gly Thr Phe Ser Lys  
 1 5  
 40 <210>25  
 <211>6  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 45 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"  
 50 <400> 25  
 Pro Ile Val Leu Gly Lys  
 1 5  
 <210>26  
 <211>6  
 55 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens  
 <220>  
 <221>FUENTE  
 60 <222>1..6  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

<400> 26  
 Asp Ile Glu Asp Gly Thr  
 1 5

5 <210>27  
 <211>13  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

10 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..13  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> 1..3  
 <223> Residuos del enlazador

20 <400> 27  
 Gly Gly Cys Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe Ser Lys  
 1 5 10

25 <210>28  
 <211>10  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

30 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..10  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

35 <400> 28  
 Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe Ser Lys  
 1 5 10

40 <210>29  
 <211>11  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

45 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..11  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

50 <400> 29  
 Glu Asp Ile Glu Asp Gly Thr Phe Ser Lys Leu  
 1 5 10

55 <210>30  
 <211>10  
 <212>PRT  
 <213>Homo sapiens

60 <220>  
 <221>FUENTE  
 <222>1..10  
 <223> /tipo de molécula="proteína"  
 /organismo="Homo sapiens"

ES 2 685 121 T3

<400> 30

Thr Gly Asn Leu Ile Glu Asp Ile Glu Asp  
1                    5                    10

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## Reivindicaciones

- 5 1. Un método de bioensayo para la cuantificación de fragmentos peptídicos que comprende un neopéptido en el extremo C-terminal o N-terminal formado por escisión *in vivo* de mimecano por una proteinasa, dicho método comprende poner en contacto una muestra derivada de un paciente que comprende dichos fragmentos peptídicos con un ligando inmunológico que tiene afinidad de unión específica por dicho neopéptido y determinar el nivel de unión de dicho ligando inmunológico a fragmentos de péptidos en dicha muestra, en donde dicho ligando inmunológico es reactivo con péptidos que terminan en la secuencia de neopéptido pero no es reactiva sustancialmente con mimecano intacto y no es reactiva específicamente con péptidos en los que la secuencia terminal de neopéptido se extiende por uno o más aminoácidos adicionales, dicho método comprende, además, la comparación del nivel determinado de dicha unión de dichos fragmentos de péptidos con valores característicos de (a) individuos sanos comparables y/o (b) una afección aterosclerótica patológica y asociar un nivel más alto del péptido medido con un grado más severo de dicha afección, en donde dicho ligando inmunológico tiene afinidad de unión específica por cualquiera de las secuencias siguientes en el extremo N de un péptido:
- 10 DFADIP....  
TGNLIE....  
LDFTGN....  
RLDFTG....  
20 RLEGNP....  
DFTGNL....  
DHNALIE....  
DIDAVP....  
FTGNLI....  
25 GNLIED....
- o con cualquiera de las siguientes secuencias en el extremo C-terminal de un péptido:
- 30 ....DIPNLR  
.... DGTFSK  
....PIVLGK  
....DIEDGT
- 35 2. Un método como se reivindicó en la reivindicación 1, en donde dicho ligando inmunológico tiene afinidad de unión específica para la secuencia EDIEDGTFSK en el extremo C-terminal de un péptido o tiene afinidad de unión específica por la secuencia TGNLIEDIED en el extremo C-terminal de un péptido.
- 40 3. Un método como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, en donde dicho ligando inmunológico es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de un anticuerpo monoclonal que tiene afinidad de unión específica.
- 45 4. Un método como se reivindicó en cualquier reivindicación anterior, en donde dicho método se realiza como un inmunoensayo de competición en el que dicho ligando inmunológico y un agente competidor se incuban en presencia de dicha muestra y el agente competidor compete con los fragmentos de péptidos en la muestra para unirse al ligando inmunológico, o en donde dicho método se realiza como un inmunoensayo de tipo sándwich en el que dicho ligando inmunológico y un ligando inmunológico adicional que tiene afinidad de unión específica por una secuencia de péptidos contenida en fragmentos de péptidos unidos por dicho ligando inmunológico se incuban en la presencia de dicha muestra y ambos se unen juntos a dichos fragmentos de péptidos en la muestra.
- 50 5. Un método como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra de orina, suero, sangre, plasma o saliva.
- 55 6. Un método como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la muestra es una muestra derivada de un paciente, dicho método que comprende además comparar el nivel determinado de dicho ligando de dichos fragmentos de péptidos con valores característicos de individuos sanos comparables.
- 60 7. Un ligando de unión inmunológica contra un neopéptido en el extremo C-terminal o N-terminal formado *in vivo* por escisión de proteasas de mimecano, en donde dicho ligando inmunológico es reactivo con péptidos que terminan en la secuencia de neopéptidos pero no reactivos sustancialmente con mimecano intacto y no es específicamente reactivo con péptidos en los que la secuencia terminal de neopéptido se extiende por uno o más aminoácidos adicionales, en donde el ligando inmunológico es inmunorreactivo específicamente con el extremo N-terminal de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos:
- 65 DFADIP....  
TGNLIE....  
LDFTGN....  
RLDFTG....

RLEGNP....  
DFTGNL....  
DH NALE....  
DIDAVP....  
FTGNLI....  
GNLIED....

5

o con el extremo C-terminal de una cualquiera de las secuencias de aminoácidos:

10

....DIPNLR  
....DGTFSK  
....PIVLGK  
....DIEDGT

15

8. Un ligando inmunológico como se reivindicó en la reivindicación 7, que es un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión del mismo.

9. Una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal como se reivindicó en la reivindicación 8.

20

10. Un kit de inmunoensayo que comprende un ligando inmunológico como se reivindicó en la reivindicación 7 u 8, y un agente competidor que se une a dicho ligando inmunológico, y opcionalmente uno o más de un reactivo de lavado, un tampón, un reactivo de parada, un marcador de enzima, un sustrato del marcador de enzima, patrones de calibración, un anticuerpo anti-ratón e instrucciones para realizar un ensayo mediante el uso de dicho kit.

25

30

35

40

45

50

55

60

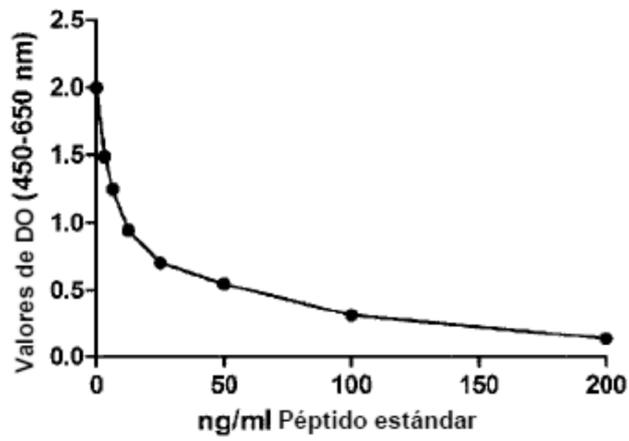


FIG. 1

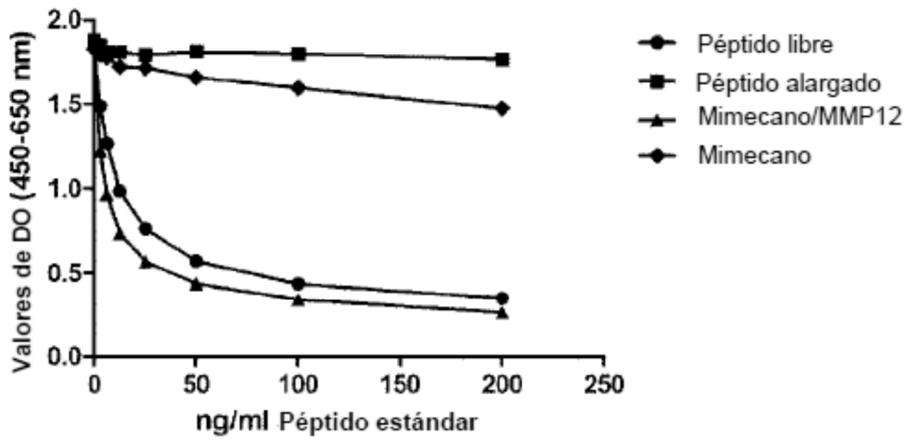


FIG. 2

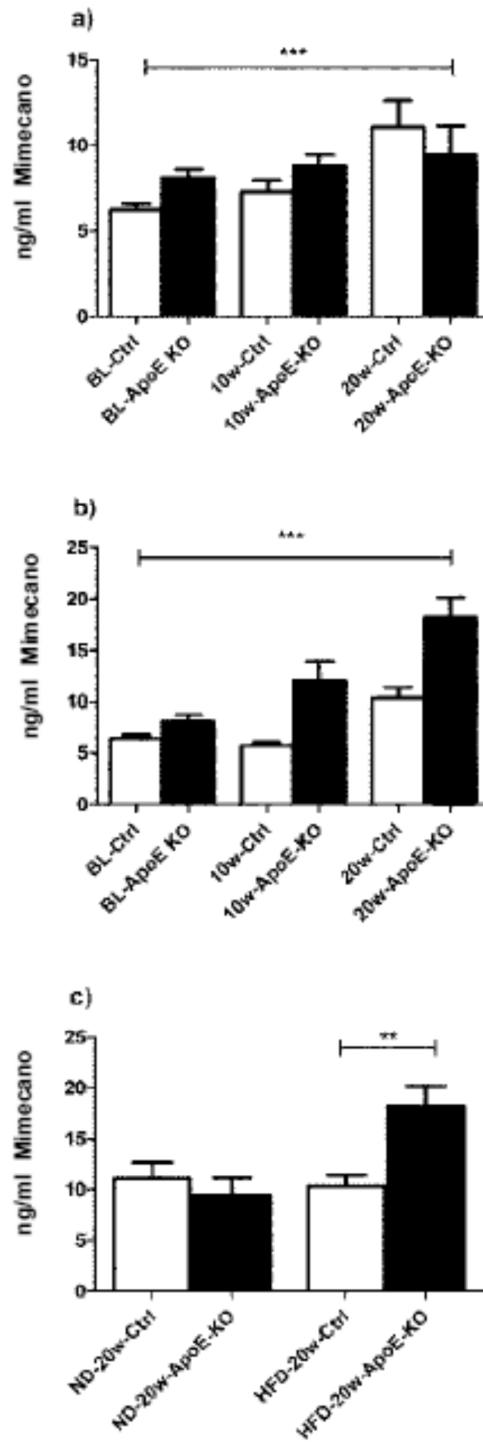


FIG. 3

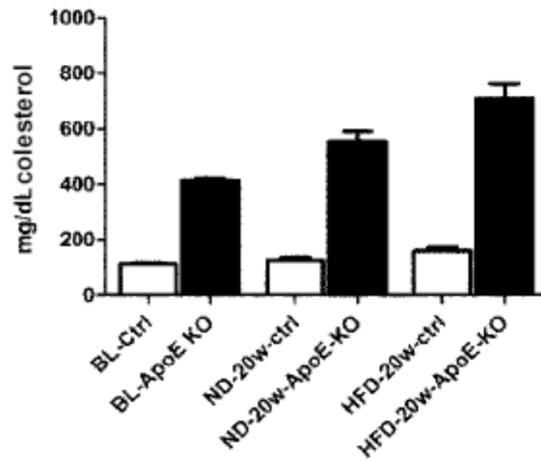


FIG. 4

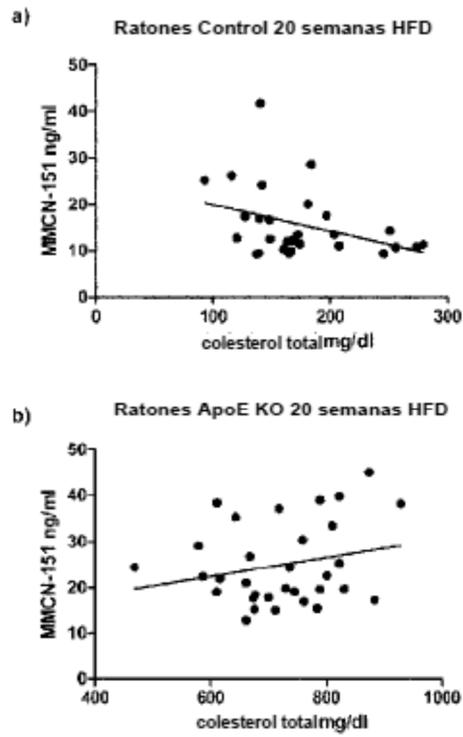


FIG. 5

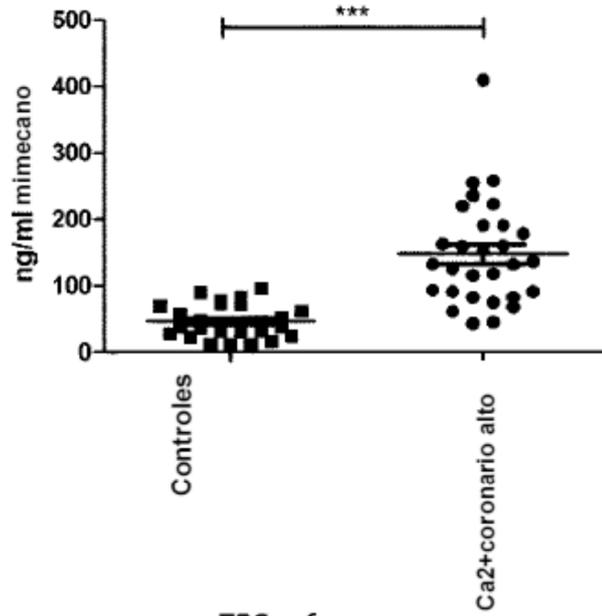


FIG. 6

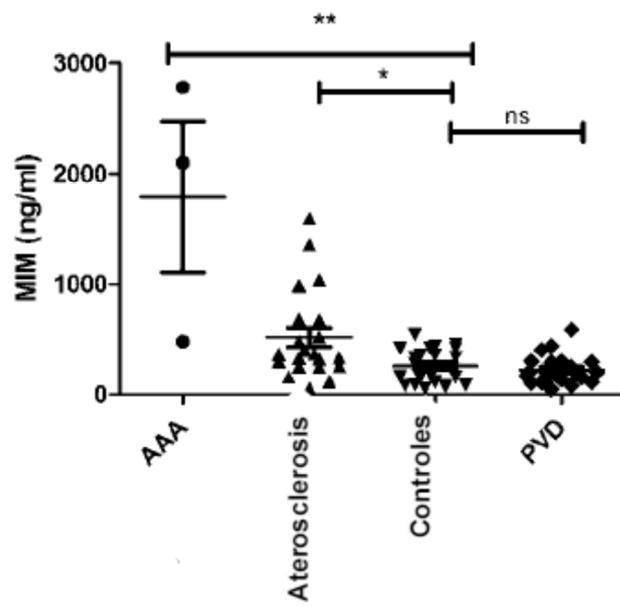


Fig. 7