(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 547 582**

(21) Número de solicitud: 201500348

(51) Int. CI.:

G01N 33/49 (2006.01)

(12) PATENTE DE INVENCIÓN CON EXAMEN PREVIO B2

(22) Fecha de presentación:

30.04.2015

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

07.10.2015

Fecha de la concesión:

27.04.2016

(45) Fecha de publicación de la concesión:

05.05.2016

(73) Titular/es:

UNIVERSIDAD DE OVIEDO (100.0%)
C/ San Francisco 3
33003 Oviedo (Asturias) ES

(72) Inventor/es:

SUÁREZ DÍAZ, Ana;
LÓPEZ SUÁREZ, Patricia y
RODRÍGUEZ CARRIO, Javier

(54) Título: **Método para la valoración de riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-lipoproteínas de alta densidad, inmunosensor y kit para su aplicación**

(57) Resumen:

Método para la valoración de riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-lipoproteínas de alta densidad, inmunosensor y kit para su aplicación. El método comprende poner en contacto una muestra del sujeto con partículas de HDL humanas en condiciones tales que pueda producirse una unión específica antígeno-anticuerpo detectable, y estratificar el riesgo cardiovascular del sujeto comparando el resultado obtenido en el análisis de la muestra con los obtenidos en la población sana.

La invención resulta de aplicación en los sectores de la biotecnología y la farmacia y en el de la medicina y el diagnóstico clínico, y más concretamente en la valoración de riesgo cardiovascular para prevenir enfermedades mediante el uso de biomarcadores en diferentes grupos de pacientes.

ES 2 547 582 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 40.2.8 LP.

DESCRIPCIÓN

METODO PARA LA VALORACIÓN DE RIESGO CARDIOVASCULAR NO CLÁSICO MEDIANTE LA DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS ANTI-LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDAD, INMUNOSENSOR Y KIT PARA SU APLICACIÓN

La presente invención se refiere a un método para la valoración de riesgo cardiovascular y a un kit para realizar dicha valoración. En particular, se refiere a un método de determinación de riesgo cardiovascular no asociado a los factores clásicos mediante la cuantificación de los niveles de autoanticuerpos frente a las lipoproteínas de alta densidad (HDL). La invención incluye también un inmunosensor y un kit para la cuantificación de los anti-HDL en muestras de sangre, suero o plasma. La presencia de estos autoanticuerpos se asocia a una alteración de las HDL y a un aumento en diferentes mediadores implicados en respuestas inflamatorias proaterogénicas que no pueden ser detectados por los métodos disponibles actualmente para valorar el riesgo cardiovascular pero que son de relevancia para su correcta valoración.

La invención resulta de aplicación en los sectores de la biotecnología y la farmacia y en el de la medicina y el diagnóstico clínico, y más concretamente en la valoración de riesgo cardiovascular para prevenir enfermedades mediante el uso de biomarcadores en diferentes grupos de pacientes.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Enfermedad cardiovascular y aterosclerosis.

La enfermedad cardiovascular es la principal causa de muerte en países occidentales y se estima que pueda llegar a ser la principal causa de muerte a nivel global en las próximas décadas. Asimismo, en términos comunitarios, la enfermedad cardiovascular implica elevados costes para los sistemas nacionales de salud y es causa de importantes pérdidas económicas y baja productividad laboral. Las principales presentaciones clínicas de la enfermedad cardiovascular son la enfermedad isquémica (infarto de miocardio y angina de pecho), accidentes cerebrovasculares

(ictus isquémico, no isquémico y ataques isquémicos transitorios) y enfermedad arterial periférica.

En líneas generales, la enfermedad cardiovascular tiene su origen en el desarrollo de placas ateroscleróticas en la pared de los vasos sanguíneos, que conlleva un aumento de espesor de la capa más interna del vaso (o capa íntima), el cual condiciona la correcta circulación del flujo sanguíneo a su través. El crecimiento de la placa aterosclerótica puede llegar a obstruir completamente el vaso sanguíneo, o bien ésta puede transformarse en una placa inestable, susceptible de separarse de la pared del vaso en que se origina y provocar así la oclusión de un vaso de menor calibre (enfermedad tromboembólica). La formación de la placa aterosclerótica es un proceso dinámico, dependiendo su progresión de los factores de riesgo asociados y el período de exposición a los mismos y de la carga genética.

Estratificación del riesgo cardiovascular.

Habida cuenta de la importancia de la enfermedad cardiovascular en términos demográficos y económicos, resulta imprescindible contar con herramientas que permitan una valoración del riesgo cardiovascular, esto es, una valoración de la probabilidad que tiene un individuo de padecer un evento cardiovascular en un periodo de tiempo dado, normalmente fijado por consenso en 10 años. El objetivo último de los algoritmos de estratificación de riesgo cardiovascular es la toma de decisiones en el ámbito clínico, de forma que los pacientes puedan ser sometidos a intervenciones de prevención primaria y secundaria con el objetivo de reducir su riesgo cardiovascular.

En los últimos años, se han producido avances en el campo de la prevención de la enfermedad cardiovascular, si bien, paradójicamente, la incidencia de ésta continúa en aumento. El mejor conocimiento del papel de los factores de riesgo y su interrelación ha llevado a un cambio en el paradigma del estudio del riesgo cardiovascular, pasando los factores de riesgo de ser estudiados de forma individual a ser considerados de forma conjunta bajo el concepto de "riesgo global", el cual proporciona una fuerza predictiva de mayor valor que cualquier factor de forma independiente (Grundy, *et al.* (1998) "Primary prevention of coronary heart disease:

guidance from Framingham: a statement for healthcare professionals from the AHA Task Force on Risk Reduction". American Heart Association. *Circulation*, 97, 1876-1887; Jackson, (2000) "Guidelines on preventing cardiovascular disease in clinical practice." *BMJ*, 320, 659-661; Pearson, *et al.* (2003) "Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association." *Circulation*, 107, 499-511; Pyorala, *et al.* (1994) "Prevention of coronary heart disease in clinical practice. Recommendations of the Task Force of the European Society of Cardiology, European Atherosclerosis Society and European Society of Hypertension." *Eur.Heart J.*, 15, 1300-1331).

Los algoritmos actuales para la valoración del riesgo cardiovascular global se basan en la presencia y grado de diferentes factores clásicos de riesgo cardiovascular, como son la edad, el género, la hipertensión, las dislipemias, la diabetes, la obesidad y el hábito tabáquico. Sin embargo, la valoración cuantitativa y cualitativa de cada uno de estos factores de riesgo varía dependiendo de la escala utilizada. El más conocido de estos algoritmos es la escala de Framingham (*Framingham Risk Score*) y su sistema de puntuación se deriva de ecuaciones extraídas a partir de un estudio prospectivo a 10 y 30 años en población norteamericana (Wilson, et al. (1998) "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." *Circulation*, 97, 1837-1847; Dawber, et al. (1962) "The epidemiology of coronary heart disease--the Framingham enquiry." *Proc.R.Soc.Med.*, 55, 265-271). No obstante, esta escala parece no proporcionar resultados adecuados en población europea y otras poblaciones no norteamericanas, precisamente por estar inferida de una población distinta. Por este motivo, se desarrolló de forma paralela un sistema de valoración ajustado para población europea, denominado escala SCORE (*Systematic Coronary Risk Evaluation*) (Conroy, et al. (2003) "Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project." *Eur.Heart J.*, 24, 987-1003). Del mismo modo, si bien este sistema está calibrado para la población europea, parece sobreestimar el riesgo cardiovascular global en poblaciones mediterráneas, caracterizadas por una mayor prevalencia de factores de riesgo junto con una menor incidencia de enfermedad cardiovascular. Estas observaciones condujeron al desarrollo de otra escala de valoración, derivada de una modificación de la escala de

Framingham y calibrada para la población española, denominada REGICOR (*Registre Geroní del Cor*) (Ramos, et al. (2003) "Comparison of population coronary heart disease risk estimated by the Framingham original and REGICOR calibrated functions." *Med.Clin.(Barc.)*, 121, 521-526).

La correspondencia entre las diferentes escalas ha sido y es actualmente motivo de debate. Además de las diferencias debidas a las diferentes poblaciones estudiadas (D'Agostino, et al. (2001) "Validation of the Framingham coronary heart disease prediction scores: results of a multiple ethnic groups investigation." *JAMA*, 286, 180-187; Hense, et al. (2003) "Framingham risk function overestimates risk of coronary heart disease in men and women from Germany--results from the MONICA Augsburg and the PROCAM cohorts." *Eur.Heart J.*, 24, 937-945; Pyorala, (2000) "Assessment of coronary heart disease risk in populations with different levels of risk." *Eur.Heart J.*, 21, 348-350), existen importantes diferencias en cuanto a la variable estudiada (Conroy, et al. (2003) "Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project." *Eur.Heart J.*, 24, 987-1003), en tanto que la escala de Framingham evalúa riesgo de desarrollo de enfermedad cardiovascular no fatal, ciñéndose únicamente a la enfermedad coronaria; mientras que la escala SCORE se basa en mortalidad cardiovascular debida a enfermedad cardiovascular general (Conroy, et al. (2003) "Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project." *Eur.Heart J.*, 24, 987-1003; Wilson, et al. (1998) "Prediction of coronary heart disease using risk factor categories." *Circulation*, 97, 1837-1847). Por otro lado, el número total de factores de riesgo tenidos en cuenta, así como su valoración relativa para el cálculo del riesgo global, es diferente en cada una de las escalas. Otra limitación de estos algoritmos, presumiblemente derivada de lo anterior, es que los puntos de corte para la estratificación del riesgo de los individuos, especialmente aquellos con riesgo alto, difieren con la escala utilizada. Estas limitaciones conllevan que, si bien las tablas pueden estratificar bien el riesgo a escala poblacional, éste puede no corresponderse correctamente con el riesgo real de una persona concreta, lo cual dificulta sobremanera su uso directo en el ámbito clínico.

De forma similar, durante la última década, y gracias al progreso de las técnicas de imagen, se han desarrollado nuevos métodos para la valoración de riesgo cardiovascular mediante el uso de la ecografía tipo Doppler que permite la medición del grosor de las capas íntima y media en las arterias de mayor calibre. Esta medida puede ser considerada como un marcador subrogado de desarrollo aterosclerótico en su fase subclínica y, por tanto, un marcador de riesgo cardiovascular (Simon et al. (2002) "Intima-media thickness: a new tool for diagnosis and treatment of cardiovascular risk." *J Hypertens* 20: 159-169). Si bien se trata de una técnica poco invasiva, requiere una alta especialización por parte del personal clínico, depende de una tecnología de alto coste y que sólo existe en determinados centros de referencia y resulta compleja de estandarizar. Por todo ello su uso en rutina como método de estratificación de riesgo cardiovascular no resulta, en la actualidad, una opción real.

Por último, son varios los estudios que señalan que una proporción relevante de pacientes con enfermedad cardiovascular no presenta factores clásicos de riesgo (Budoff, (2012) "Screening for Ischemic Heart Disease with Cardiac CT: Current Recommendations." *Scientifica.(Cairo.)*, 2012, 812046; Oh, et al. (2010) "Carotid plaque in absence of traditional and non-traditional cardiovascular risk factors." *Int.J.Cardiol.*, 143, e57-e59), así como que el control de los factores clásicos no se traduce consistentemente en un menor riesgo cardiovascular real en las poblaciones estudiadas (Ford, et al. (2009) "Trends in the prevalence of low risk factor burden for cardiovascular disease among United States adults." *Circulation*, 120, 1181-1188; Kotseva, et al. (2009) "Cardiovascular prevention guidelines in daily practice: a comparison of EUROASPIRE I, II, and III surveys in eight European countries." *Lancet*, 373, 929-940). Del mismo modo, son muchos los estudios que sugieren la relevancia de otros factores de riesgo cardiovascular que no están recogidos dentro de los llamados factores clásicos (Bianchi, et al. (2007) "Non-traditional cardiovascular risk factors contribute to peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes." *Diabetes Res.Clin.Pract.*, 78, 246-253; Melsom, et al. (2015) "Estimated GFR Is Biased by Non-Traditional Cardiovascular Risk Factors." *Am.J.Nephrol.*, 41, 7-15; Muntner, et al. (2004) "Prevalence of non-traditional cardiovascular disease risk factors among persons with impaired fasting glucose, impaired glucose tolerance, diabetes, and the metabolic syndrome: analysis of the Third National Health and

Nutrition Examination Survey (NHANES III)." *Ann.Epidemiol.*, 14, 686-695; Yao, et al. (2004) "Traditional and non-traditional risk factors as contributors to atherosclerotic cardiovascular disease in end-stage renal disease." *Scand.J.Urol.Nephrol.*, 38, 405-416). Estos factores, denominados conjuntamente "no clásicos", son muy variados y se encuentran ligados a respuestas de tipo inflamatorio en mayor o menor grado.

En este punto, cabe destacar que si bien ya en la década de los años 70 se había sugerido que el proceso aterogénico se originaba por una acumulación y modificación de lipoproteínas sobre la pared vascular en un proceso mediado por diferentes mediadores proinflamatorios (Ross, et al. (1973) "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis." *Science*, 180, 1332-1339; Ross, et al. (1976) "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." *N.Engl.J.Med.*, 295, 369-377), la contribución de estos últimos permaneció prácticamente ignorada durante casi dos décadas en detrimento de los factores clásicos. Sin embargo, el descubrimiento de que diferentes poblaciones leucocitarias (monocitos y linfocitos T) estaban presentes en la placa aterosclerótica de individuos sin patologías de base inmunitaria (Jonasson, et al. (1986) "Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque." *Arteriosclerosis*, 6, 131-138), así como la evidencia de que tanto la inmunidad humoral como la celular juegan un papel en su progresión (Hansson, (2005) "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." *N.Engl.J.Med.*, 352, 1685-1695; Plutzky, (2001) "Inflammatory pathways in atherosclerosis and acute coronary syndromes." *Am.J.Cardiol.*, 88, 10K-15K; Shimizu, et al. (2006) "Inflammation and cellular immune responses in abdominal aortic aneurysms." *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 26, 987-994), dan cuenta de un papel crucial de la inflamación y la inmunidad en el desarrollo de la aterosclerosis, si bien los mecanismos exactos implicados en este proceso siguen sin conocerse. Asimismo, nuevos estudios apuntan a que los factores clásicos de riesgo cardiovascular podrían estar a su vez influidos por diferentes mecanismos inflamatorios (Libby, et al. (2002) "Inflammation and atherosclerosis." *Circulation*, 105, 1135-1143).

Estas evidencias, junto con las dificultades para implementar los algoritmos de valoración del riesgo cardiovascular basados únicamente en factores clásicos, resaltan la cada vez más evidente necesidad de contar con nuevos factores no clásicos de riesgo cardiovascular.

Factores no clásicos de riesgo cardiovascular.

Una de las primeras evidencias de la relevancia de estos factores vino dada por varios estudios que proponían el uso de la Proteína C Reactiva (PCR) como marcador de riesgo cardiovascular, tanto en población general como en diferentes estados patológicos (Cook, et al. (2006) "The effect of including C-reactive protein in cardiovascular risk prediction models for women." *Ann.Intern.Med.*, 145, 21-29; Kaptoge, et al. (2012) "C-reactive protein, fibrinogen, and cardiovascular disease prediction." *N.Engl.J.Med.*, 367, 1310-1320). Sin embargo, su uso directo como factor no clásico de riesgo cardiovascular no parece ser factible debido a su baja especificidad, las diferencias técnicas y metodológicas en los ensayos de cuantificación y la gran variabilidad interindividual de sus niveles, entre otros (Clark, et al. (1993) "Biological variation of acute phase proteins." *Ann.Clin.Biochem.*, 30 (Pt 4), 373-376; Macy, et al. (1997) "Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications." *Clin.Chem.*, 43, 52-58; Garcia-Moll, et al. (1999) "Ischemic cardiopathy: inflammation markers and the cardiovascular risk." *Rev.Esp.Cardiol.*, 52, 990-1003).

Por otro lado, se conoce que el riesgo cardiovascular está incrementado en diversos estados patológicos, igualmente conectados con la inflamación, como pueden ser enfermedades del sistema inmunitario (patologías autoinmunes e inmunodeficiencias), infecciones crónicas o enfermedades neoplásicas. Resulta importante tener en cuenta que la prevalencia de muchas de estas patologías se ha incrementado en los últimos años, por lo que su relevancia dentro de la salud comunitaria actual va en aumento. En el caso de las patologías de base inflamatoria, es especialmente clara la escasa eficacia de los algoritmos de valoración del riesgo cardiovascular (del Rincon, et al. (2001) "High incidence of cardiovascular events in a rheumatoid arthritis cohort not explained by traditional cardiac risk factors." *Arthritis*

Rheum., 44, 2737-2745; Symmons, et al. (2011) "Epidemiology of CVD in rheumatic disease, with a focus on RA and SLE." *Nat.Rev.Rheumatol.*, 7, 399-408). En este sentido, cabe destacar el papel antiinflamatorio e inmunomodulador que recientemente se ha sugerido que pueden ejercer las lipoproteínas de alta densidad (HDL) presentes en la circulación.

El papel de las HDL como factor "ateroprotector" es conocido desde hace tiempo por su función en el transporte reverso del colesterol (transporte desde los tejidos periféricos al hígado). Del mismo modo, es bien conocido el papel de los niveles de las lipoproteínas HDL como marcadores en pacientes con diferentes tipos de dislipemias, por lo que tradicionalmente se han incluido dentro de los factores clásicos de riesgo cardiovascular. Sin embargo, diferentes estudios ponen en evidencia que las lipoproteínas HDL tienen un papel más allá del transporte del colesterol (Navab, et al. (2011) "HDL and cardiovascular disease: atherogenic and atheroprotective mechanisms." *Nat.Rev.Cardiol.*, 8, 222-232), puesto que son capaces de contrarrestar las respuestas pro-inflamatorias (Furlaneto, et al. (2002) "Apolipoproteins A-I and A-II downregulate neutrophil functions." *Lipids*, 37, 925-928; Hyka, et al. (2001) "Apolipoprotein A-I inhibits the production of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha by blocking contact-mediated activation of monocytes by T lymphocytes." *Blood*, 97, 2381-2389; Navab, et al. (1991) "Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolished by high density lipoprotein." *J.Clin.Invest*, 88, 2039-2046), así como llevar a cabo diferentes papeles homeostáticos sobre el endotelio (Calabresi, et al. (2003) "Endothelial protection by high-density lipoproteins: from bench to bedside." *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 23, 1724-1731). De hecho, se sabe que las HDL pueden mediar en procesos fundamentales para la inmunidad innata y adaptativa como las respuestas de linfocitos T y B, la activación de macrófagos o del sistema del complemento mediante la modulación de la expresión de receptores y otras moléculas implicadas (Catapano, et al. (2014) "HDL in innate and adaptive immunity." *Cardiovasc.Res.*, 103, 372-383; Norata, et al. (2012) "Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system." *Atherosclerosis*, 220, 11-21). Asimismo, tanto los niveles de HDL como sus funciones fisiológicas pueden estar

alterados en pacientes con diferentes patologías de base inmunitaria (Norata, et al. (2012) "Emerging role of high density lipoproteins as a player in the immune system." *Atherosclerosis*, 220, 11-21; Robertson, et al. (2013) "Changes in lipid levels with inflammation and therapy in RA: a maturing paradigm." *Nat.Rev.Rheumatol.*, 9, 513-523), si bien los mecanismos subyacentes no están claros. Por último, se ha visto que la inclusión de los niveles de HDL de forma independiente en la escala SCORE mejora la estratificación de riesgo cardiovascular (Cooney, et al. (2009) "How much does HDL cholesterol add to risk estimation? A report from the SCORE Investigators." *Eur.J.Cardiovasc.Prev.Rehabil.*, 16, 304-314), especialmente en individuos con valores extremos de estas lipoproteínas. Por todo ello, aunque a priori resulte paradójico, cualquier factor que sea capaz de modificar los niveles de las HDL podría ser incluido dentro de los factores no clásicos de riesgo cardiovascular.

Autoanticuerpos frente a las lipoproteínas de alta densidad.

Recientemente, algunos estudios han demostrado que el suero de determinados pacientes puede contener niveles de anticuerpos de isotipo IgG dirigidos frente a las HDL (anti-HDL IgG) , o frente a alguno de sus componentes como la apolipoproteína Apo A1, significativamente mayores que los presentes en controles sanos (O'Neill, et al. (2010) "Antibodies to apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, and C-reactive protein are associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum.*, 62, 845-854; Vuilleumier, et al. (2008) "Anti-(apolipoprotein A-1) IgGs are associated with high levels of oxidized low-density lipoprotein in acute coronary syndrome." *Clin.Sci.(Lond)*, 115, 25-33; Delgado, et al. (2002) "Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome." *Arthritis Rheum.*, 46, 2686-2694). La generación de este tipo de anticuerpos frente a componentes del propio organismo (autoanticuerpos) requiere una respuesta inmune adaptativa específica que puede darse en algunos individuos, normalmente en situaciones patológicas, como consecuencia del efecto de factores genéticos y/o ambientales.

La presencia de autoanticuerpos anti-HDL fue inicialmente demostrada en pacientes de lupus eritematoso sistémico (Batuca, et al. (2009) "Anti-atherogenic and

anti-inflammatory properties of high-density lipoprotein are affected by specific antibodies in systemic lupus erythematosus." *Rheumatology.(Oxford)*, 48, 26-31; O'Neill, et al. (2010) "Antibodies to apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, and C-reactive protein are associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum.*, 62, 845-854; Delgado, et al. (2002) "Antibodies to high-density lipoprotein and beta2-glycoprotein I are inversely correlated with paraoxonase activity in systemic lupus erythematosus and primary antiphospholipid syndrome." *Arthritis Rheum.*, 46, 2686-2694), una enfermedad autoinmune sistémica en la que es frecuente desarrollar anticuerpos frente a una amplia variedad de moléculas propias.

Sin embargo, ninguno de los trabajos publicados interfiere con lo propuesto como objeto de esta invención, ya que en ellos no se determina la relación de los autoanticuerpos anti-HDL con el riesgo cardiovascular. Por el contrario, estos trabajos ponen de manifiesto una asociación de los autoanticuerpos anti-HDL con la actividad clínica, si bien no aclaran cuál puede ser su papel o mecanismo en la patogénesis de la enfermedad o en el daño vascular, elevado en esta patología al igual que en otras condiciones autoinmunes. Por tanto, no existen evidencias que avalen la utilización de estos autoanticuerpos como factores de riesgo.

Otro aspecto a resaltar es que los trabajos realizados hasta la fecha utilizan como variable de estudio el valor resultante de cuantificar los niveles de autoanticuerpos anti-HDL IgG en los sueros como porcentaje con respecto a una muestra control positivo, obviando que algunos valores pueden estar fuera del rango de linealidad. Por otra parte, tampoco se tienen en cuenta los niveles totales de IgG. Habida cuenta del papel de la inflamación en la enfermedad cardiovascular en general, podría ocurrir que los pacientes con enfermedad cardiovascular exhiban, en mayor o menor grado, un estado de disregulación inmunitaria, que podría traducirse en niveles séricos alterados de las IgG totales, lo cual podría explicar fácilmente diferencias en los niveles de autoanticuerpos anti-HDL IgG, sin que esto fuese un efecto específico sobre el riesgo cardiovascular y, por tanto, clínicamente relevante en este contexto. Este estado de disregulación inmunitaria es especialmente relevante en individuos con una patología concomitante de base inmunológica, como pueden ser trastornos

autoinmunes o inmunodeficiencias, así como diferentes estados de inmunosupresión (patológica o inducida por fármacos). Como se ha mencionado anteriormente, el riesgo cardiovascular en estas patologías se encuentra incrementado, en términos generales, y suponen, por tanto, un grupo poblacional con especial necesidad de nuevas herramientas para la evaluación del riesgo cardiovascular asociado a factores no clásicos.

En cuanto a la utilización de autoanticuerpos frente a componentes específicos de las partículas HDL como marcador de riesgo cardiovascular, algunos autores han analizado los anticuerpos anti-Apo A1 (Vuilleumier, et al. (2008) "Anti-(apolipoprotein A-1) IgGs are associated with high levels of oxidized low-density lipoprotein in acute coronary syndrome." *Clin.Sci.(Lond)*, 115, 25-33;). Estos autoanticuerpos se han asociado exclusivamente con mayores niveles de oxidación lipídica en pacientes con enfermedad cardiovascular, pero no con factores clásicos o no clásicos de riesgo cardiovascular. Por otra parte, es necesario tener en cuenta que las HDL cambian su composición de forma significativa en respuesta a estímulos inflamatorios (Choy, et al. (2009) "Interpreting lipid levels in the context of high-grade inflammatory states with a focus on rheumatoid arthritis: a challenge to conventional cardiovascular risk actions." *Ann.Rheum.Dis.*, 68, 460-469; Jamnitski, et al. (2013) "High-density lipoprotein profiling changes in patients with rheumatoid arthritis treated with tumor necrosis factor inhibitors: a cohort study." *J.Rheumatol.*, 40, 825-830; Watanabe, et al. (2012) "Proteomic profiling following immunoaffinity capture of high-density lipoprotein: association of acute-phase proteins and complement factors with proinflammatory high-density lipoprotein in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum.*, 64, 1828-1837), por lo cual un enfoque dirigido hacia un componente en particular no resultaría adecuado en vista a los posibles cambios de su frecuencia en situaciones patológicas. De hecho, la correspondencia entre anticuerpos anti-HDL y anti-Apo A1 no es en absoluto alta, ya que se ha descrito que sólo un 55% de los pacientes con anticuerpos anti-HDL presentan también anti-Apo A1, mientras que un 67% de los pacientes con anti-Apo A1 mostraron también reactividad para anti-HDL (O'Neill, et al. (2010) "Antibodies to apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein, and C-reactive protein are associated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum.*, 62, 845-854), pese a ser Apo A1 el

componente principal de las HDL en individuos sanos. Particularmente, el contenido en Apo A1 es muy variable entre estados patológicos (Fisher, et al. (2012) "High-density lipoprotein function, dysfunction, and reverse cholesterol transport." *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 32, 2813-2820; Hedrick, et al. (2000) "Glycation impairs high-density lipoprotein function." *Diabetologia*, 43, 312-320; Heinecke, (2009) "The HDL proteome: a marker--and perhaps mediator--of coronary artery disease." *J.Lipid Res.*, 50 Suppl, S167-S171; Zheng, et al. (2004) "Apolipoprotein A-I is a selective target for myeloperoxidase-catalyzed oxidation and functional impairment in subjects with cardiovascular disease." *J.Clin.Invest*, 114, 529-541), por lo que el uso de esta molécula como "diana" proveería resultados presumiblemente incompletos, así como difíciles de interpretar y comparar, añadiendo un grado de dificultad más a la valoración individual del riesgo cardiovascular global entre diferentes grupos de pacientes.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a un método para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-HDL en sangre, suero o plasma, en donde los niveles elevados de estos autoanticuerpos son indicativos de mayor riesgo cardiovascular. La presencia de estos autoanticuerpos se relaciona con la presencia de una disfunción a nivel de las HDL, que conlleva la pérdida de sus funciones protectoras, dando lugar a un aumento en el riesgo cardiovascular global debido a los factores no clásicos, ligados a inflamación y/o alteraciones de la inmunidad. Este riesgo cardiovascular no puede ser cuantificado por ninguna de las escalas actualmente disponibles y no existen otros marcadores clínicos que aborden esta problemática. La invención también se refiere a un inmunosensor y a un kit para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos.

En una de las realizaciones del método de la invención, además comprende la cuantificación en el suero de los niveles de estos autoanticuerpos mediante una técnica de inmunoensayo, en la que se incluye una curva de calibración que permite una

cuantificación absoluta dentro del rango de linealidad del ensayo. El resultado de esta cuantificación permite clasificar a los pacientes en función de sus niveles siguiendo un criterio objetivo, proporcionando una indicación clínica inmediata de gran utilidad para la toma de decisiones en el ámbito clínico.

En tanto que estos autoanticuerpos pueden estar ligados a respuestas inflamatorias y, por tanto, a estados de disregulación inmunitaria, el método de esta invención puede incluir también un paso de relativización o corrección de los niveles absolutos de estos autoanticuerpos mediante los niveles séricos de IgG total, con el objeto de facilitar la comparación interindividual y estandarizar la variable a estudio a nivel poblacional.

El método de la presente invención puede ser llevado a cabo mediante la utilización de un inmunosensor que comprenda partículas de HDL humanas inmovilizadas capaces de unir los anticuerpos anti-HDL de una muestra de sangre, suero o plasma.

Asimismo, el método de la presente invención puede ser llevado a cabo mediante la utilización de un set de reactivos (kit) que comprenda partículas de HDL humanas inmovilizadas en una placa para inmunoensayo, por ejemplo del tipo ELISA, y todos los reactivos necesarios para realizar la cuantificación de los autoanticuerpos mediante este método.

A efectos de la presente invención y su descripción, se definen a continuación algunos conceptos utilizados que pueden ser desconocidos para un experto en la materia o utilizados de una forma poco conocida o diferente de la habitual:

- Enfermedad cardiovascular: se refiere conjuntamente a la condición clínica de un individuo que haya sufrido alguna de las siguientes presentaciones clínicas: enfermedad isquémica (infarto de miocardio y angina de pecho), accidentes cerebrovasculares (ictus isquémico, no isquémico y ataques isquémicos transitorios) o enfermedad arterial periférica.
- Riesgo cardiovascular: se refiere a la probabilidad de un individuo de padecer una enfermedad cardiovascular en un tiempo dado.

- Factor de riesgo cardiovascular: se refiere a toda aquella condición que incremente la probabilidad de que un sujeto experimente una enfermedad cardiovascular respecto a la probabilidad existente en la población no expuesta a dicha condición.
- Factor no clásico de riesgo cardiovascular: se refiere a aquellos factores de riesgo cardiovascular que no pueden ser considerados como clásicos (hipertensión, diabetes, obesidad, dislipemia y tabaquismo).
- Riesgo cardiovascular no clásico: se refiere a la parte de riesgo cardiovascular de un individuo que es explicada o es causada por la presencia de factores no clásicos de riesgo cardiovascular.
- Lipoproteínas: se refiere a las biomoléculas formadas por un núcleo lipídico (hidrofóbico) compuesto por ésteres de colesterol y por triglicéridos, y recubierto por una capa hidrofílica de proteínas (apoproteínas) y fosfolípidos.
- Lipoproteínas HDL: se refiere a las lipoproteínas de más alta densidad, cuya función biológica consiste en el transporte de moléculas de colesterol desde los tejidos periféricos hasta el hígado.
- Anticuerpo: se refiere a las moléculas de inmunoglobulina con capacidad para llevar a cabo un reconocimiento específico de regiones concretas (epítopos) de otras moléculas (antígenos).
- Autoanticuerpo: se refiere a todos aquellos anticuerpos que reconocen epítopos de moléculas propias del organismo en el que aquellos son producidos.
- Inmunocomplejo: se refiere al complejo molecular formado tras la unión específica de un anticuerpo a un antígeno.
- Inmunoensayo: se refiere a la técnica analítica que se basa en la formación y detección de inmunocomplejos.
- ELISA: se refiere a un tipo especial de inmunoensayo en fase sólida cuya característica diferencial reside en que el revelado de la técnica se basa en métodos enzimáticos.

Un objeto de esta invención es por tanto un método para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos que comprende las siguientes etapas:

a) Poner en contacto una muestra de sangre, suero o plasma del sujeto con partículas de HDL humanas en condiciones tales que pueda producirse una unión específica antígeno-anticuerpo detectable por cualquier método.

b) Estratificar el riesgo cardiovascular del sujeto comparando el resultado obtenido en el análisis de la muestra anterior con los obtenidos en la población sana.

En una realización preferida, las partículas de HDL de la etapa a) son purificadas de muestras humanas.

En otra realización preferida, las partículas de HDL de la etapa a) se obtienen por procedimientos sintéticos.

En otra realización preferida, las partículas de HDL de la etapa a) están unidas a un soporte sólido que permite la retención de los inmunocomplejos HDL/anti-HDL.

En una realización más preferida, el soporte sólido es una placa para inmunoensayo de tipo ELISA.

En una realización específica, la detección de la unión específica antígeno-anticuerpo de la etapa a) se realiza utilizando anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas unidos a un marcador cualquiera que permita su revelado a partir de un agente específico para dicho marcador. En una realización más específica, el marcador unido a los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas es un enzima y el agente específico es un sustrato. En otra realización más específica, los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas tienen reactividad específica frente a la inmunoglobulina G (IgG) humana.

En una realización específica del método general, o más específica del método en el que la detección de la etapa a) se realiza utilizando anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas, éste además comprende una etapa para la cuantificación absoluta de anticuerpos anti-HDL mediante la utilización de una curva de calibración. En una realización más específica, además de la etapa de cuantificación comprende la corrección de los niveles de autoanticuerpos anti-HDL con los niveles de IgG total en la misma muestra.

En una realización preferida del método en cualquiera de sus realizaciones, el método además comprende la clasificación del sujeto según su riesgo cardiovascular no clásico mediante la comparación del resultado obtenido con los valores de referencia de la misma población obtenidos siguiendo el mismo procedimiento.

Otro objeto de esta invención es un inmunosensor para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-HDL. El inmunosensor de la invención comprende:

- Moléculas de HDL humanas inmovilizadas en una fase sólida acoplada a un sensor que detecta un cambio físico y/o químico tras la unión específica de los anticuerpos anti-HDL de una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto.
- Unos medios de conversión que convierten la detección anterior en una señal eléctrica cuantificable y procesable por unos medios de procesamiento de señales.

En una realización preferida, la señal eléctrica es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HDL de la muestra.

Otro objeto de esta invención es un kit para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos que comprende, al menos, partículas de HDL inmovilizadas sobre un soporte sólido en condiciones tales que pueda producirse una unión específica antígeno-anticuerpo detectable. En una realización preferida, el soporte sólido es una placa para inmunoensayo de tipo ELISA.

En otra realización preferida del kit, los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas tienen reactividad específica frente a la inmunoglobulina G (IgG) humana.

En otra realización preferida, el kit además comprende un reactivo estándar para confeccionar una curva de calibración que permita la cuantificación absoluta de autoanticuerpos anti-HDL dentro del rango de linealidad del inmunoensayo.

La invención proporciona un método para la valoración del riesgo cardiovascular y un inmunosensor y un kit para llevar a cabo esa valoración.

En la actualidad, los anticuerpos anti-HDL no se consideran factores de riesgo cardiovascular ya que su papel en este sentido no se encuentra reportado en la literatura. Los datos aportados en esta memoria de invención, por tanto, pueden ser los primeros en mostrar el papel de estos autoanticuerpos en el riesgo cardiovascular. Por otro lado, la consideración de estos autoanticuerpos como un factor de riesgo cardiovascular no clásico constituye una novedad añadida, sin precedentes en el campo de estudio, ya que no resulta obvio pensar que la valoración del riesgo cardiovascular no clásico pueda ser determinada en relación a un componente implicado en los factores clásicos, como son las lipoproteínas HDL.

Tanto el método como el inmunosensor y el kit de la presente invención permiten obtener información adicional sobre factores (no clásicos) asociados al riesgo cardiovascular, aportando datos clínicos no disponibles con los métodos de determinación de riesgo cardiovascular desarrollados hasta la fecha. Los factores no clásicos de riesgo cardiovascular son muy variados y se encuentran ligados, en mayor o menor grado, a respuestas de tipo inflamatorio. En concreto, este método permite obtener información del estado inflamatorio, dada la asociación de los niveles de los anticuerpos anti-HDL con diferentes mediadores pro-inflamatorios, así como de las alteraciones de la inmunidad, responsables del desarrollo de autoanticuerpos.

Los resultados obtenidos aplicando la invención son totalmente independientes de los factores clásicos de riesgo cardiovascular, permitiendo una aproximación novedosa de la valoración del riesgo. Los algoritmos actuales para la valoración del riesgo cardiovascular global se basan en la presencia y grado de los diferentes factores clásicos, lo que limita su alcance clínico ya que una proporción relevante de pacientes con enfermedad cardiovascular no presenta estos factores. Además, el control de los factores clásicos no se traduce consistentemente en un menor riesgo cardiovascular real en las poblaciones estudiadas, lo que implica la relevancia de otros factores de riesgo.

En el caso de las patologías de base inflamatoria o autoinmune, el método, el inmunosensor y el kit que se reivindican proporcionan no sólo una valoración del riesgo cardiovascular sino también del estado inflamatorio y la actividad de la enfermedad, directamente asociados a los niveles de estos autoanticuerpos. En estas

situaciones es especialmente preocupante la escasa eficacia de los algoritmos conocidos de valoración del riesgo cardiovascular, ya que éste está significativamente incrementado probablemente debido al papel crucial de la inflamación y la inmunidad en el desarrollo de la enfermedad, si bien los mecanismos exactos implicados en este proceso no son conocidos.

Otra contribución de cualquiera de los aspectos de la invención descritos es que se enfocan hacia la detección de autoanticuerpos dirigidos frente a cualquiera de los epítopos contenidos en las partículas de HDL humanas. Los anticuerpos frente a uno de sus componentes, Apo A1, se han asociado con mayores niveles de oxidación lipídica en pacientes con enfermedad cardiovascular, aunque no con factores clásicos o no clásicos de riesgo cardiovascular. Sin embargo, el estudio de anticuerpos frente a un componente en particular no resultaría adecuado debido a los cambios en la composición de las HDL en situaciones inflamatorias. El presente enfoque permite obtener mayor información que el dirigido hacia sólo un epítopo de las HDL y permite la comparación de los resultados entre diferentes condiciones patológicas, donde los niveles de alguno de los epítopos se encuentren alterados, y por tanto, resulta aplicable a diferentes grupos de pacientes.

Por otro lado, tanto el método como el kit reivindicados en el presente documento se caracterizan, entre otros aspectos, por su relativa sencillez tanto a nivel técnico como clínico en comparación con otras técnicas conocidas.

A nivel técnico, su desarrollo procedimental se puede realizar de forma similar a cualquier procedimiento de inmunoensayo de rutina, como los que se vienen realizando para multitud de determinaciones clínicas en el ámbito asistencial. Este hecho proporciona la ventaja de que puede ser fácilmente implementable y automatizable en laboratorios de rutina clínica, al contrario de lo que ocurre con la ecografía tipo Doppler que determina el grosor de las capas íntima y media en las arterias de mayor calibre. Esta medida puede ser considerada como un marcador subrogado de desarrollo aterosclerótico en su fase subclínica y, por tanto, un marcador de riesgo cardiovascular, pero requiere una tecnología de alto coste, presente actualmente sólo en determinados centros de referencia y que resulta compleja de estandarizar, además de necesitar de personal con entrenamiento experto en esta

tecnología específica. Asimismo, la realización del método de la presente invención a través de un inmunosensor proporciona considerables ventajas adicionales, como son su miniaturización, portabilidad y su independencia de grandes infraestructuras y procesos de implementación, lo que permite llevar a cabo todos los procedimientos de forma sencilla y fuera del laboratorio clínico.

Por otro lado, la inclusión de una curva de calibración en una de las realizaciones de la invención permite la cuantificación absoluta de los autoanticuerpos anti-HDL y solventar el problema de que algunos valores puedan estar fuera del rango de linealidad.

Además, la corrección con los niveles totales de IgG, según otra de las realizaciones preferidas de la invención, permite tener en cuenta el estado de disregulación inmunitaria, que podría traducirse en niveles séricos alterados de las IgG totales.

La estandarización clínica para los valores de referencia del método, que permiten la estratificación del nivel de riesgo, se realiza a partir de los valores hallados en individuos sanos de la misma población, lo cual es especialmente ventajoso debido a la simplicidad del procedimiento y la facilidad para la obtención del material de referencia. Asimismo, se evitarían sesgos interpoblacionales debidos a factores genéticos o ambientales.

Por último, las determinaciones según este método son realizadas a partir de sangre, suero o plasma, una muestra biológica de fácil obtención, por métodos no invasivos y que no requiere estandarización de la fase preclínica.

La invención resulta de aplicación en aquellos sectores en los que sea necesario cuantificar y valorar el riesgo cardiovascular, como por ejemplo en el ámbito clínico para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico en diferentes tipos de pacientes mediante la determinación de autoanticuerpos anti-HDL IgG en muestras de suero o plasma utilizando el método y kit propuestos, que pueden ser desarrollados por las compañías farmacéuticas que comercializan kits para la determinación de anticuerpos y otras moléculas de uso clínico y diagnóstico.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 representa el análisis de la capacidad de discriminación de la estratificación de pacientes según los niveles de autoanticuerpos anti-HDL para la identificación de enfermedad cardiovascular, mediante análisis de área bajo la curva COR. La curva se realizó empleando el criterio de punto de corte establecido en el Ejemplo 3 para la estratificación de pacientes en anti-HDL^{low} y anti-HDL^{high}.

El eje de ordenadas se corresponde con la sensibilidad (S), mientras que en el eje de abscisas de muestra el valor de 1-Especificidad (1-E) para los diferentes valores del sistema de estratificación.

Tal y como se puede observar, los datos del análisis indican que el método proporciona una aceptable capacidad de discriminación para la presencia de enfermedad cardiovascular.

EXPLICACIÓN DE UNA FORMA DE REALIZACIÓN PREFERENTE

Para una mejor comprensión de la presente invención, se expone la valoración del riesgo cardiovascular no clásico en los siguientes ejemplos de realización preferente descritos en detalle, que deben entenderse sin carácter limitativo del alcance de la invención.

Poblaciones a estudio.

Debido a la heterogeneidad del riesgo cardiovascular total en diferentes grupos de poblaciones, se seleccionaron tres grupos de sujetos con diferente implicación de factores clásicos y no clásicos.

- Grupo control (C): se seleccionaron 131 individuos sanos, no relacionados, procedentes de la población general. Este grupo poblacional no presentaba factores de riesgo cardiovascular ni había sufrido ningún evento cardiovascular hasta el momento del reclutamiento.
- Grupo con factores clásicos de riesgo cardiovascular (CCV): se reclutaron 52 individuos con diferentes factores clásicos de riesgo cardiovascular

(dislipemias, diabetes tipo II, hipertensión, tabaquismo y obesidad) procedentes de su centro de salud de atención primaria. Este grupo poblacional no presentaba patologías concomitantes de base inmunitaria.

- Grupo de pacientes de artritis reumatoide (AR): se reclutaron 212 pacientes con artritis reumatoide procedentes de las consultas externas del Servicio de Reumatología del Hospital Universitario Central de Asturias (Asturias, España). Estos pacientes estaban diagnosticados según los criterios diagnósticos de artritis reumatoide establecidos por el *American College of Rheumatology* en su versión de 2010. En este grupo de pacientes, se evaluó la actividad y severidad de la enfermedad según los índices clínicos validados (*Disease Activity Score 28-joints* y *Health Assessment Questionnaire*). La presencia de factores clásicos de riesgo cardiovascular y la historia de eventos cardiovasculares se estudió a partir de las historias clínicas de forma retrospectiva.

Se tomó una muestra de sangre periférica mediante venopunción, tras un ayuno de 12 horas, siguiendo el procedimiento habitual, que se recogió en tubos estériles sin anticoagulante y con gel separador para la obtención del suero. Tras la retracción del coágulo a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente, y se recogió el suero en tubos de 1,5 ml que fueron almacenados a -80ºC hasta el momento de su uso. Además, se determinaron en suero por procedimientos estándar los contenidos de glucosa, triglicéridos, colesterol total y lipoproteínas de tipo HDL y LDL.

Análisis estadístico.

Los datos analizados en los ejemplos se expresaron como media ± desviación típica o como mediana (rango intercuartílico), según resultase apropiado de acuerdo a la distribución seguida por las variables a estudio. El análisis de estas variables se realizó mediante test ANOVA de un factor (con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples), test de Kruskal-Wallis (con corrección de Dunn-Bonferroni para comparaciones múltiples) o test U de Mann-Withney. Las correlaciones entre variables se analizaron mediante el test de correlación de Spearman. Las variables

categóricas se expresaron como n (%) y se analizaron sus frecuencias mediante el test chi-cuadrado de independencia.

Para el análisis de regresión lineal, las variables que no siguieron distribución normal fueron transformadas con función logarítmica y se calculó el coeficiente B y el intervalo de confianza al 95% (IC 95%) para cada variable estudiada. El nivel de significación estadística fue fijado en un p-valor menor de 0,050. Los grados de significación estadística se representaron como * si $p<0,050$, ** si $p<0,010$ o *** si $p<0,001$.

EJEMPLO 1: Valoración de riesgo cardiovascular no clásico en diferentes grupos poblacionales mediante la detección de autoanticuerpos anti-lipoproteinas de alta densidad.

El estudio aquí mencionado se realizó en 395 individuos repartidos en 3 grupos independientes tal y como se resume en la Tabla 1: controles sanos (C), individuos con factores clásicos de riesgo cardiovascular (CCV) y pacientes de artritis reumatoide (AR), una enfermedad autoinmune asociada con un incremento del riesgo cardiovascular.

En este caso, se empleó el método de la invención para la valoración de riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de anticuerpos anti-lipoproteínas de alta densidad (anti-HDL) en una muestra de suero siguiendo las siguientes etapas.

La detección de autoanticuerpos anti-HDL se realizó mediante un inmunoensayo ligado a enzima realizado en fase sólida. Sobre una placa de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano, se añadieron 50 µl por pocillo de una suspensión de HDL a una concentración de 20 µg/ml en etanol al 70% a la mitad superior de la placa (mitad *test*), o 50 µl por pocillo de una disolución de etanol al 70% a la mitad inferior de la placa (mitad *control*). Las placas fueron selladas y mantenidas a 4°C durante una noche para favorecer la adsorción de las HDL al soporte sólido.

Transcurrido este tiempo, se retiraron ambas soluciones y se añadieron 300 µl por pocillo de una solución de tampón fosfato (PBS: 137 mM NaCl, 8,00 mM Na_2HPO_4, 1,45 mM KH_2PO_4, 2,7 mM KCl, pH 7,5) con 1% de seroalbúmina bovina

(BSA) con el objetivo de impedir las uniones inespecíficas por adsorción de proteínas séricas a las paredes del pocillo. Esta solución se mantuvo durante 1h a temperatura ambiente en la placa. Tras el paso anterior de bloqueo, se añadieron 50 µl de las muestras (en dilución 1:50 en PBS 0,1% BSA) o los estándares (diluciones seriadas 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256 y 1/512 en PBS 0,1% BSA) a partir de un pool de muestras de suero tomado como referencia, así como una muestra "blanco" compuesta únicamente por el diluyente (PBS 0,1% BSA) a la mitad *test* y a la mitad *control* de la placa, incubándose en agitación (300 r.p.m.) durante dos horas a temperatura ambiente.

Transcurrido este tiempo, se realizaron tres lavados consecutivos a la placa con 300 µl por pocillo de solución tampón Tris (TBS: 10,0 mM Tris, 40,6 mM Tris-HCl y 150,0 mM NaCl, pH 7,4) y se añadieron 50 µl de una solución que contenía un anticuerpo específico anti-inmunoglobulina humana de isotipo IgG conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:1000 en tampón TBS y se incubó nuevamente durante una hora, en agitación (300 r.p.m.) a temperatura ambiente. Por último, se realizaron dos lavados consecutivos con 300 µl con solución TBS y se añadieron 50 µl por pocillo de solución sustrato (p-nitrofenilfosfato 1 mg/ml en tampón dietanolamina: dietanolamina 1mM, $MgCl_2$ 2,1 mM) y se monitorizó el cambio de color del sustrato en un lector de placas tipo ELISA a una longitud de onda de 405 nm. La reacción se consideró finalizada cuando el punto estándar correspondiente a la dilución 1:16 tomó un valor de 1.00 o bien cuando el pocillo correspondiente al "blanco" tomó un valor de 0.20 de absorbancia. La absorbancia de cada pocillo en la mitad *control* de la placa fue sustraída de la absorbancia obtenida en la mitad *test* de la misma. La concentración de autoanticuerpos anti-HDL en las muestras, expresada en unidades arbitrarias (UA), se obtuvo por interpolación en la curva estándar de las absorbancias obtenidas en las muestras desconocidas.

Los resultados obtenidos de la detección de anticuerpos anti-HDL se muestran resumidos en la Tabla 1.

TABLA 1: Poblaciones estudiadas, niveles séricos de lipoproteínas y anticuerpos anti-HDL.

	C	AR	CCV	*p-valor*
n	131	212	52	
Género (f/m)	97/34	175/37	37/15	0.080
Edad, años (media (rango))	52 (26 – 80)	53 (18 – 87)	55 (33 – 68)	0.452
Colesterol total, mg/dl	205.91±33.56	207.42±35.71	216.60±42.97	0.476
HDL-colesterol, mg/dl	58.79±14.00	60.56±17.60	57.91±14.30	0.515
LDL-colesterol, mg/dl	126.46±29.35	122.60±32.38	136.00±50	0.175
Ratio colesterol total/HDL	3.67±1.00	3.72±1.35	3.93±1.13	0.211
Anti-HDL, UA (mediana (rango))	37.75 (0 – 1126.35)	187.02 * (0 – 8681.37)	61.15 (0 – 2972.26)	< 0.0001

Como se observa en la Tabla 1, las poblaciones estudiadas fueron totalmente comparables en edad y género, lo cual permite excluir el efecto de estos importantes factores de confusión en este estudio. Asimismo, no se encontraron diferencias en los niveles de lipoproteínas séricas. Sin embargo, los niveles de autoanticuerpos anti-HDL, medidos en UA, se encontraron claramente incrementados en el grupo de pacientes de AR comparado con los grupos de C y CCV.

Por tanto, se pudo concluir que los autoanticuerpos anti-HDL son detectables siguiendo la metodología expuesta y que se encontraron aumentados en algunos grupos de pacientes respecto a la población control. Asimismo, se concluyó que este aumento no fue debido a la presencia de factores clásicos de riesgo cardiovascular, es decir, que el método expuesto permitió identificar el riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-HDL.

EJEMPLO 2: Valoración de riesgo cardiovascular no clásico en diferentes grupos poblacionales mediante la detección de autoanticuerpos anti-lipoproteinas de alta densidad corregido por niveles de IgG total.

Debido a que es conocida la interacción entre las respuestas inflamatorias y el riesgo cardiovascular no clásico, se introduce una etapa adicional en la que se lleva a cabo la corrección de los niveles de anticuerpos anti-HDL medidos como unidades arbitrarias siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo anterior, para obtener un valor corregido por los niveles séricos de IgG total a partir de la misma muestra.

Para ello, se siguió la metodología anteriormente expuesta y además se procedió a la cuantificación de los niveles séricos de IgG total mediante un método convencional. Los valores de anti-HDL en UA fueron divididos por los niveles séricos de IgG totales cuantificados por métodos convencionales (anti-HDL/IgG). Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.

TABLA 2: Niveles de anti-HDL (UA) y anti-HDL/IgG en las poblaciones estudiadas.

	C	AR	CCV	*p-valor*
Anti-HDL, UA (mediana (rango))	37.75 (0 – 1126.35)	187.02 * (0 – 8681.37)	61.15 (0 – 2972.26)	< 0.0001
IgG total, UA (mediana (rango))	2.63 (0.38 – 27.14)	4.21 (0.09 – 5.80)	2.48 (0.16 – 12.63)	0.001
Anti-HDL/IgG, (mediana (rango))	18.92 (0 – 417.00)	35.78 ** (0 – 2500.10)	18.81 (0 – 1379.23)	0.005

A partir de los resultados expuestos en la Tabla 2, se concluyó que los niveles de anticuerpos anti-HDL se mantuvieron significativamente elevados respecto al grupo C incluso tras ajustar los niveles de anti-HDL por los niveles de IgG total (anti-HDL/IgG), avalando la robustez de este método para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico.

EJEMPLO 3: Estratificación de pacientes según niveles de autoanticuerpos anti-HDL en AR y características clínicas de la enfermedad.

Con el objetivo de estudiar qué información podrían proporcionar los niveles de autoanticuerpos anti-HDL para el ámbito clínico, los pacientes del grupo de AR se clasificaron en dos subgrupos según los niveles de estos autoanticuerpos, empleando como punto de corte el percentil 90 (= 169.80) de la distribución de esta variable en la muestra del grupo control. Esta clasificación permitió la identificación de un subgrupo de pacientes de AR con mayores niveles de autoanticuerpos anti-HDL (anti-HDL^{high}: 40 pacientes, 18,8%) y otro con niveles menores (anti-HDL^{low}: 172 pacientes, 81,1%). Se estudiaron las características clínicas y los niveles séricos de mediadores de la inflamación en ambos subgrupos de pacientes (véase Tabla 3).

TABLA 2: Análisis de las asociaciones de los autoanticuerpos anti-HDL con parámetros clínicos en pacientes de AR.

	anti-HDL^{low} (≤169,80) (n=172)	**anti-HDL^{high} (>169,80) (n=40)**	*p-valor*
Parámetros clínicos			
Duración de la enfermedad (años)	2,12 (4,81)	4,33 (8,00)	0,010
Recuento articulaciones dolorosas	3,00 (8,00)	2,00 (7,00)	0,993
Recuento articulaciones tumefactas	1,00 (5,00)	1,50 (4,00)	0,830
Actividad de la enfermedad (DAS28)	3,67 (2,45)	4,04 (1,84)	0,443
Factor Reumatoide (+)	88 (51,1)	28 (70,0)	0,095
Anti-CCP (+)	92 (53,4)	23 (65,0)	0,325
Edad al diagnóstico	50,00 (17,00)	49,67 (20,00)	0,880
Epítopo compartido (+) (n=141)	64 (57,1)	18 (62,0)	0,632
Tratamientos, n(%)			
Ninguno o antiinflamatorios no esteroideos	41 (23,8)	6 (15,0)	0,207
Glucocorticoides	80 (46,5)	23 (57,5)	0,248
Metotrexato	111 (64,5)	28 (70,0)	0,669
Bloqueantes del TNFα	36 (20,9)	12 (30,0)	0,248
Tocilizumab	7 (4,0)	5 (12,5)	0,173

A partir de los datos contenidos en la Tabla 3 se pudo concluir que los pacientes de AR pudieron ser clasificados en, al menos, dos subgrupos según un punto de corte objetivo extrapolado a partir de la población control correspondiente.

En cuanto a las características clínicas, se observó una asociación de los niveles elevados de autoanticuerpos anti-HDL con la duración de la enfermedad de mayor duración, pero no se observó un efecto de marcadores específicos de la enfermedad o de los tratamientos farmacológicos administrados.

Por tanto, se pudo concluir que los niveles elevados de autoanticuerpos anti-HDL eran independientes del cuadro clínico de la patología reumática estudiada.

EJEMPLO 4: Estratificación de pacientes según niveles de autoanticuerpos anti-HDL en AR y enfermedad cardiovascular.

A la vista de los resultados del ejemplo anterior, se realizó la misma estrategia de estratificación de los pacientes estudiados y además se estudiaron las asociaciones entre los niveles de autoanticuerpos anti-HDL y la presencia de factores clásicos de riesgo cardiovascular y el desarrollo de eventos cardiovasculares en ambos subgrupos (anti-HDL^{low} y anti-HDL^{high}) (Tabla 4).

TABLA 3: Análisis de las asociaciones entre autoanticuerpos anti-HDL, factores clásicos de riesgo cardiovascular y eventos cardiovasculares en el grupo de AR.

	anti-HDL^{low} (≤169,80) (n=172)	**anti-HDL^{high} (>169,80) (n=40)**	*p-valor*
Edad (años)	53,87 (16,22)	56,58 (22,69)	0,184
Género (f:m)	144:28	28:12	0,053
Factores clásicos de riesgo cardiovascular, n(%)			
Hipertensión	51 (29,6)	14 (35,0)	0,517
Dislipemia	36 (20,9)	16 (40,0)	0,013
Diabetes	16 (9,3)	6 (15,0)	0,285
Obesidad (n=129)	22 (23,9)	7 (22,5)	0,880
Tabaquismo	61 (37,6)	13 (32,5)	0,708
Historia de eventos cardiovasculares, n(%)	22 (12,7)	16 (40,0)	<0,0001

Se observó en que la presencia de niveles elevados en suero de autoanticuerpos anti-HDL se asociaba fuertemente con una historia de desarrollo de eventos cardiovasculares en el grupo de AR. Se estudió la capacidad de discriminación de la estratificación de riesgo cardiovascular según los niveles de autoanticuerpos anti-HDL frente a la presencia de enfermedad cardiovascular mediante análisis del área bajo la curva COR (AUC COR), la cual mostró una capacidad de discriminación aceptable como marcador de enfermedad cardiovascular (p=0,007) (Figura 1).

Por otro lado, se observó que el subgrupo caracterizado por los mayores niveles de estos autoanticuerpos no presentaba una prevalencia incrementada de los diferentes factores clásicos de riesgo cardiovascular (con la excepción de la dislipemia), lo cual corroboró que la asociación con el desarrollo de eventos cardiovasculares es independiente de los factores clásicos de riesgo.

EJEMPLO 5: Niveles de autoanticuerpos anti-HDL y riesgo cardiovascular no clásico.

De la misma manera que en los ejemplos 4 y 5, se clasificaron los pacientes de AR según los niveles de autoanticuerpos anti-HDL y en este caso se estudiaron los niveles séricos de diferentes mediadores de la inflamación, que tienen un papel central en el riesgo cardiovascular no clásico.

Para la cuantificación de los niveles séricos de los diferentes mediadores inflamatorios tenidos en cuenta, se emplearon diferentes kits comerciales según disponibilidad. Todos ellos están basados en técnicas de inmunoensayo.

Los niveles de IFNα, MIP1α, IL-8, IL-17A, VEGF, GM-CSF, IFNγ, TNFα, MCP-1, leptina y resistina se cuantificaron mediante diferentes inmunoensayos siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los límites de detección fueron 1.25 pg/ml, 0.6 pg/ml, 1.2 pg/ml, 1.25 pg/ml, 4.5 pg/ml 0.2 pg/ml, 0.58 pg/ml, 3.9 pg/ml, 8 pg/ml, 63 pg/ml y 24 pg/ml, respectivamente. Los niveles de PCR se cuantificaron mediante un ensayo enzimático validado para el ámbito clínico y su límite de detección fue 0,5 mg/l.

Los resultados de la cuantificación de estos mediadores se resumen en la Tabla 5.

TABLA 5: Análisis de las asociaciones entre autoanticuerpos anti-HDL y mediadores de la inflamación en pacientes de AR.

	anti-HDL^{low} (≤169,80) (n=95)	**anti-HDL^{high} (>169,80) (n=43)**	*p-valor*
PCR (mg/l)	1,00 (2,70)	2,85 (6,43)	<0,001
TNFα (pg/ml)	216,14 (291,32)	312,04 (266,50)	0,451
IFNα (pg/ml)	0,00 (15,83)	16,06 (95,92)	0,006
MIP1α (pg/ml)	7,12 (19,74)	21,75 (76,47)	<0,001
IFNγ (pg/ml)	4,20 (3,44)	7,15 (8,78)	0,004
IL-8 (pg/ml)	41,78 (10,79)	46,85 (18,68)	0,006
VEGF (pg/ml)	112,43 (42,04)	117,29 (50,55)	0,313
GM-CSF (pg/ml)	26,76 (6,88)	29,75 (19,55)	0,033
IL-17A (pg/ml)	3,71 (25,74)	26,33 (101,43)	0,002
MCP-1 (pg/ml)	282,04 (325,38)	382,54 (794,84)	0,024
Resistina (ng/ml)	9,3 (5,27)	10,33 (4,90)	0,158
Leptina (ng/ml)	10,34 (11,31)	14,24 (15,57)	0,402

A la vista de los resultados obtenidos, se observó que aquellos individuos con mayores niveles de estos autoanticuerpos mostraron mayores concentraciones séricas de un buen número de mediadores de la inflamación (IFNα, MIP1α, IFNγ, IL-8, GM-CSF, IL17A y MCP-1), lo cual está de acuerdo con los mayores niveles de PCR asimismo hallados en este grupo.

Se concluyó entonces que la presencia de niveles elevados de autoanticuerpos anti-HDL se asociaba con una mayor respuesta inflamatoria.

Teniendo en cuenta que los resultados obtenidos con esta estrategia de estratificación excluyeron un efecto de los parámetros clínicos de la enfermedad (ejemplo 3) así como de factores clásicos de riesgo cardiovascular (ejemplo 4), el hecho de que se observase una mayor tasa de enfermedad cardiovascular en el subgrupo de pacientes con altos niveles de estos autoanticuerpos, así como la asociación con los mediadores inflamatorios hallados en este ejemplo, permitió concluir que los autoanticuerpos anti-HDL se asocian a un mayor riesgo cardiovascular no clásico.

REIVINDICACIONES

1. Método para la valoración el riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos que comprende las siguientes etapas:

   a) poner en contacto una muestra de sangre, suero o plasma del sujeto con partículas de HDL humanas en condiciones tales que pueda producirse una unión específica antígeno-anticuerpo detectable por cualquier método;

   b) estratificar el riesgo cardiovascular del sujeto comparando el resultado obtenido en el análisis de la muestra anterior con los obtenidos en la población sana.

2. Método según la reivindicación 1 donde las partículas de HDL de la etapa a) son purificadas de muestras humanas.

3. Método según la reivindicación 1 donde las partículas de HDL de la etapa a) se obtienen por procedimientos sintéticos.

4. Método según la reivindicación 1 donde las partículas de HDL de la etapa a) están unidas a un soporte sólido que permite la retención de los inmunocomplejos HDL/anti-HDL.

5. Método según la reivindicación 4 donde el soporte sólido es una placa para inmunoensayo de tipo ELISA.

6. Método según la reivindicación 1 donde la detección de la unión específica antígeno-anticuerpo de la etapa a) se realiza utilizando anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas unidos a un marcador cualquiera que permita su revelado a partir de un agente específico para dicho marcador.

7. Método según la reivindicación 6 donde el marcador unido a los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas es un enzima y el agente específico es un sustrato.

8. Método según la reivindicación 6 donde los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas tienen reactividad específica frente a la inmunoglobulina G (IgG) humana.

9. Método según la reivindicación 1 ó 6 que además comprende la cuantificación absoluta de anticuerpos anti-HDL mediante la utilización de una curva de calibración.

10. Método según la reivindicación 8 ó 9 que además comprende la corrección de los niveles de autoanticuerpos anti-HDL con los niveles de IgG total en la misma muestra.

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores que además comprende la clasificación del sujeto según su riesgo cardiovascular no clásico mediante la comparación del resultado obtenido con los valores de referencia de la misma población obtenidos siguiendo el mismo procedimiento.

12. Inmunosensor para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-HDL que comprende:

    a) moléculas de HDL humanas inmovilizadas en una fase sólida acoplada a un sensor que detecta un cambio físico y/o químico tras la unión específica de los anticuerpos anti-HDL de una muestra de sangre, suero o plasma de un sujeto;

    b) unos medios de conversión que convierten la detección anterior en una señal eléctrica cuantificable y procesable por unos medios de procesamiento de señales.

13. Inmunosensor según la reivindicación 12 caracterizado por que la señal eléctrica es proporcional a la cantidad de anticuerpos anti-HDL de la muestra.

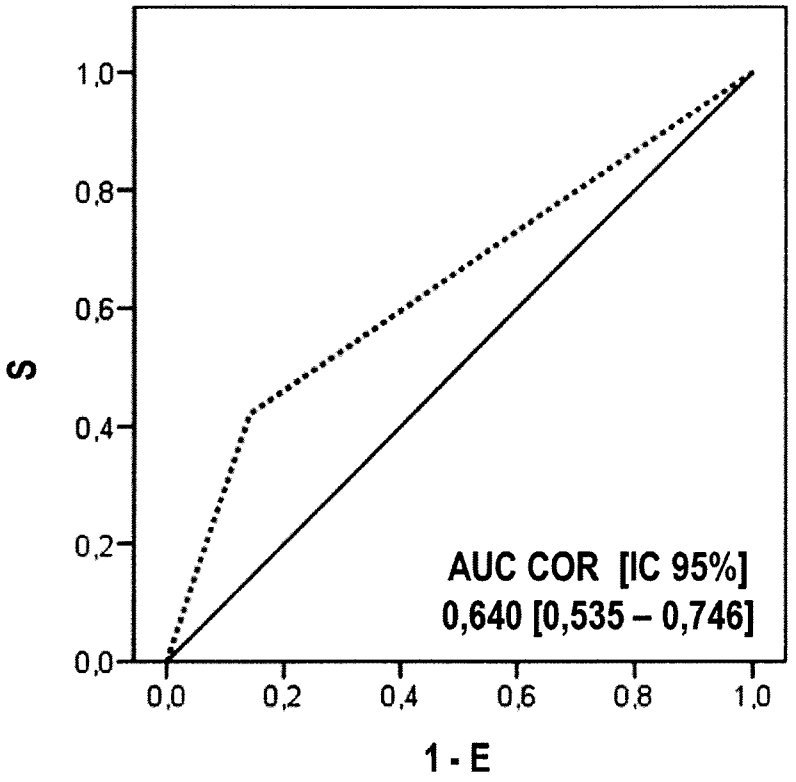
14. Un kit para llevar a cabo los métodos definidos en cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende partículas de HDL humanas inmovilizadas en un soporte sólido en condiciones tales que pueda producirse una unión específica antígeno-anticuerpo detectable.

15. Kit según la reivindicación 14 donde el soporte sólido es una placa para inmunoensayo de tipo ELISA.

16. El kit según la reivindicación 14 donde los anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas tienen reactividad específica frente a la inmunoglobulina G (IgG) humana.

17. El kit según la reivindicación 14 caracterizado por que además comprende un reactivo estándar para confeccionar una curva de calibración que permita la cuantificación absoluta de los autoanticuerpos anti-HDL dentro del rango de linealidad del inmunoensayo.

FIG.1



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201500348

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.04.2015

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***G01N33/49*** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	VUILLEUMIER N., BAS S., PAGANO S., MONTECUCCO F., GUERNE P-A., FINCKH A., LOVIS C., MACH F., HOCHSTRASSER D., ROUX-LOMBARD P. y GABAY C. "Anti-apolipoprotein A-1 IgG predicts major cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis & Rheumatism (2010) Vol. 62, páginas 2640-2650. Páginas 2640-2643.	1-17
X	FINCKH A., COURVOISIER D. S., PAGANO S., BAS S., CHEVALLIER-RUGGERI P., HOCHSTRASSER D., ROUX-LOMBARD P., GABAY C., y VUILLEUMIER N. "Evaluation of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: Do cardiovascular biomarkers offer added predictive ability over established clinical risk scores?" Arthritis Care & Research (Junio 2012) Vol. 64, páginas 817-825. Páginas 818,819.	1,5
A	PÉREZ-MÉNDEZ O. "Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis?" Archivos de Cardiología de México (2004) Vol. 74, páginas 53-67. Todo el documento.	1-17

Categoría de los documentos citados
X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
29.09.2015	M. J. García Bueno	1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

G01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, NPL, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, JPO PATENT DATABASE, PUBMED, GOOGLE PATENTS, GOOGLE SCHOLAR.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.09.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-17	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones		**SI**
	Reivindicaciones	1-17	**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	VUILLEUMIER N., BAS S., PAGANO S., MONTECUCCO F., GUERNE P-A., FINCKH A., LOVIS C., MACH F., HOCHSTRASSER D., ROUX-LOMBARD P. y GABAY C. "Anti-apolipoprotein A-1 IgG predicts major cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis." Arthritis & Rheumatism (2010) Vol. 62, páginas 2640-2650. Páginas 2640-2643.	2010
D02	FINCKH A., COURVOISIER D. S., PAGANO S., BAS S., CHEVALLIER-RUGGERI P., HOCHSTRASSER D., ROUX-LOMBARD P., GABAY C., y VUILLEUMIER N. "Evaluation of cardiovascular risk in patients with rheumatoid arthritis: Do cardiovascular biomarkers offer added predictive ability over established clinical risk scores" Arthritis Care & Research (Junio 2012) Vol. 64, páginas 817-825. Páginas 818,819.	06.2012
D03	PÉREZ-MÉNDEZ O. "Lipoproteínas de alta densidad (HDL). ¿Un objetivo terapéutico en la prevención de la aterosclerosis? Archivos de Cardiología de México (2004) Vol. 74, páginas 53-67. Todo el documento.	2004

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un método para la valoración de riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos anti-lipoproteínas de alta densidad en una muestra del sujeto con partículas de HDL humanas, y su posterior estratificación del riesgo cardiovascular del sujeto comparando el resultado obtenido del análisis con los obtenidos en la población sana (reivindicaciones 1-11).

La presente solicitud de invención también consiste en un inmunosensor y un kit para la aplicación del método anteriormente mencionado (reivindicaciones 12-17).

El documento D01 consiste en un estudio para determinar la asociación de anti-apolipoproteína A-1 IgG con las principales complicaciones cardiovasculares en pacientes con artritis reumatoide.

El documento D02 consiste en un estudio para determinar si la anti- apolipoproteína AI IgG, entre otros factores, podría mejorar la precisión en el pronóstico de riesgo cardiovascular en la artritis reumatoide.

El documento D03 consiste en el estudio de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y su uso en la prevención de la aterosclerosis (ver todo el documento).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 Ley 11/1986).

Las reivindicaciones 1-17 son nuevas a la vista del artículo 6.1 Ley 11/1986.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 Ley 11/1986).

2.1.- Reivindicaciones 1-8 y 11.

El documento D01 divulga un análisis bioquímico para detectar anticuerpos humanos para la apolipoproteína A-1 (Apo A-1) mediante la técnica ELISA, donde se pone en contacto la muestra con partículas de Apo A-1 humanas, las cuales está unidas a un soporte sólido, como una placa para inmunoensayo tipo ELISA. La detección de la unión específica antígeno-anticuerpo se realiza usando anticuerpos anti-inmunoglobulinas humanas unidos a un marcador cualquiera, que permita su revelado a partir de un agente específico para dicho marcador.

El documento D01 no divulga la detección de anticuerpos humanos para HDL, sino para la apolipoproteína A-1 que se encuentra presente en la superficie de las partículas HDL. A la vista de lo que se conoce del documento D01 no se considera que requiera ningún esfuerzo inventivo para un experto en la materia desarrollar un procedimiento como el descrito en las reivindicaciones 1-11 y tener una expectativa razonable de éxito (ver páginas 2640-2643).

Por consiguiente, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-8 y 11 no implica actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.

El documento D02 divulga un método para la valoración del riesgo cardiovascular no clásico mediante la detección de autoanticuerpos mediante el contacto de una muestra de sangre con apolipoproteína AI por medio de la técnica ELISA (ver páginas 818 y 819).

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1 y 5 no tienen actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.

2.2.- Reivindicaciones 9, 10 y 12-17.

A la vista del documento D01 citado, el resto de reivindicaciones 9, 10 y 12-17 se consideran cuestiones prácticas, las cuales son obvias para un experto en la materia. Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 9, 10 y 12-17 no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 Ley 11/1986.