(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 415 375**

(51) Int. CI.:

C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.02.2008 E 08700920 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2069528**

(54) Título: **Un procedimiento para diagnosticar placas ateroescleróticas midiendo CD36**

(30) Prioridad:

05.02.2007 DK 200700192

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.07.2013

(73) Titular/es:

REGION NORDJYLLAND (100.0%)
Niels Bohrs Vej 30
9220 Aalborg st , DK

(72) Inventor/es:

HANDBERG, AASE;
HALVORSEN, BENTE;
AUKRUST, PÅL y
SKJELLAND, MONA

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

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

Un procedimiento para diagnosticar placas ateroescleróticas midiendo CD36

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere al diagnóstico, clasificación y seguimiento de placas ateroescleróticas usando la medida de la concentración de CD36 en un fluido corporal y/o la propia placa.

Antecedentes de la invención

La ateroesclerosis es una enfermedad inflamatoria progresiva en la que se acumulan en la pared arterial lípidos, matriz extracelular, macrófagos y células de la musculatura lisa vascular activadas, dando lugar a la aparición de una placa ateroesclerótica. La progresión de las lesiones ateroescleróticas puede desencadenar episodios isquémicos diversos, tales como síndromes coronarios agudos, accidentes isquémicos transitorios (AIT) y apoplejía, debidos a que partes de la placa se sueltan y se transportan por el torrente circulatorio hasta que la placa se detiene porque el tamaño de la placa supera el tamaño de la arteria. Sin embargo, aunque se ha extendido el conocimiento de la participación de mediadores inflamatorios en el proceso ateroesclerótico, no está clara la identificación de los diferentes componentes, ni su importancia relativa. En particular, no se comprende totalmente la manera en que la inflamación puede promover la transición desde una placa fibroateromatosa asintomática hasta una lesión vulnerable y sintomática.

La CD36 tiene numerosas funciones celulares. Es una translocasa de ácidos grasos (FAT) y pertenece a la familia de receptores secuestrantes de clase B, desempeñando un papel importante en la incorporación de ácidos grasos de cadena larga (AGCL) sobre la membrana celular en tejido metabólicamente activo, en la formación de células espumosas y en la incorporación de OxLDL por macrófagos. Después, los macrófagos ricos en lípidos se diferencian a o adquieren las características de células espumosas y contribuyen a la formación de lesiones ateroescleróticas. Además, la CD36 de los macrófagos, junto con la TSP y la integrina alphavbeta3, puede fagocitar neutrófilos apoptósicos. Por otro lado, la proteína es uno de los receptores de colágeno en la adhesión y agregación de plaquetas. Además, la CD36 citoplásmica desempeña un papel importante en la transducción de señales al interaccionar con tirosina cinasas de la familia Src. La deficiencia en CD36 en poblaciones asiáticas y africanas se ha asociado con la resistencia a la insulina. Los nombres alternativos para la CD36 (determinante agrupado 36) incluyen CD36 [nomenclatura de genes HUGO], GPIIIb, GPIV, antígeno OKM5 y PASIV.

El documento EP1431399 se refiere a un procedimiento para identificar agentes terapéuticos para reducir y realizar un seguimiento del crecimiento, la erosión, la ruptura o la estabilidad de una placa ateroesclerótica que comprende el análisis de la expresión diferencial de al menos dos genes que codifican proteínas escogidas de entre estearoil CoA desaturasa, ácido fosfatídico fosfatasa y fosfolipasa específica de fosfoinosítido B1.

El documento JP 2000 180447 describe la determinación de infarto de miocardio agudo detectando un antígeno CD36 en una muestra de un organismo tomada de un ser humano y comparando la cantidad de antígeno CD36 detectada con la de una persona con un organismo sano normal. Nakagawa-Toyama *et al.* (Atherosclerosis. jun. de 2001;156(2):297-305) estudiaron la localización de CD36 en lesiones coronarias ateroescleróticas humanas y descubrieron que la expresión de CD36 en estas lesiones se aceleraba en paralelo con la progresión de la ateroesclerosis.

Nakata *et al.* (Arterioscler Thromb Vase Biol. mayo de 1999; 19(5): 1333-9) estudiaron la localización inmunohistoquímica de CD36 en aorta humana y descubrieron que la CD36 se expresa altamente sobre macrófagos cargados de lípidos en aorta humana ateroesclerótica.

Sumario de la invención

Los presentes inventores han descubierto que la concentración aumentada de CD36 en una muestra de fluido corporal de un individuo que tiene una placa ateroesclerótica o en una placa ateroesclerótica como tal se correlaciona con un aumento del riesgo de que dicha placa ateroesclerótica se convierta en una placa ateroesclerótica sintomática.

Por tanto, la presente invención se refiere a procedimientos para diagnosticar, clasificar y realizar un seguimiento de placas ateroescleróticas, por ejemplo, con el fin de distinguir placas ateroescleróticas estables de placas ateroescleróticas inestables. Además, en el presente documento se sugiere que la proteína CD36 circulante, que no está unida a células (CD36 soluble, (sCD36)) o una fracción o fragmento de la misma, opcionalmente como parte de un complejo lipoproteico, puede ser un marcador diagnóstico o predictivo útil para placas ateroescleróticas en vasos sanguíneos, en particular en arterias carótidas y arterias coronarias.

Se ha descubierto que la concentración de CD36 tanto en plasma como en las placas ateroescleróticas aumenta con la progresión de las placas ateroescleróticas hacia placas ateroescleróticas sintomáticas. En consecuencia, se puede usar el aumento de la concentración de CD36 como indicación de la progresión de las placas ateroescleróticas. Se puede usar el procedimiento para diagnosticar el riesgo de un individuo de desarrollar un

episodio isquémico como se describe en el presente documento y, además, se puede usar el procedimiento para realizar un seguimiento de un individuo durante un periodo en el que se observa si una placa ateroesclerótica progresa o no.

Así, un aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar una(s) placa(s) ateroesclerótica(s) en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo, i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar dicha(s) placa(s) ateroesclerótica(s).

En otro aspecto más, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la estenosis provocada por placas ateroescleróticas en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo, i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar el grado de estenosis provocado por placas ateroescleróticas en un individuo.

En un último aspecto, la presente invención se refiere a un kit para su uso en los procedimientos divulgados en el presente documento, en el que el kit comprende al menos un elemento de detección. Se aprecia que el elemento de detección es al menos un anticuerpo, en el que dicho anticuerpo se dirige contra el polipéptido de CD36 o parte del mismo. Además, se debe entender que el elemento de detección se selecciona del grupo que consiste en al menos un cebador, al menos una sonda y al menos un par de cebadores que puede detectar una molécula de ácido nucleico que codifica CD36.

Dibujos

Figura 1:

CD36 soluble (sCD36) en plasma de pacientes con ateroesclerosis carotídea de acuerdo con la estabilidad de la placa. Los datos se dan como función del periodo de tiempo desde los últimos síntomas clínicos. La estenosis carotídea se diagnosticó y clasificó por ecografía dúplex a color precerebral (1) y angiotomografía (2) de acuerdo con criterios de consenso. La sCD36 es más alta en pacientes que habían experimentado síntomas clínicos en los últimos 2 meses (< 2 meses), en comparación con pacientes que habían experimentado síntomas 3-6 meses (3-6 meses) o más de 6 meses (> 6 meses), desde los últimos síntomas antes de la exploración y la toma de muestras de sangre. N = número de pacientes, p = nivel de significación (prueba de la U de Mann-Whitney). La sCD36 en plasma se mide como unidades relativas, es decir, con respecto a una reserva de plasma con EDTA de la toma de muestras de sangre hospitalaria rutinaria. Los síntomas clínicos de placas indican la presencia de síntomas cerebrovasculares. Las placas ateroescleróticas sintomáticas son placas en pacientes con apoplejía, AIT (accidente isquémico transitorio) o amaurosis fugaz homolateral por arteria carótida interna estenósica. Las barras de error representan el EEM.

(1) Grant EG, Benson CB, Moneta GL *et al.* Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis - Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference, Radiology. 2003; 229:340-346

(2) Anderson GB, Asforth R, Steinke DE *et al.* CT angiography for the detection and characterization of carotid artery bifurcation disease. Stroke. 2000; 31:2168-2174.

Figura 2:

Niveles plasmáticos de CD36 soluble (sCD36) en pacientes con estenosis carotídea ateroesclerótica. Se dividieron los pacientes en grupos de acuerdo con los meses (meses) transcurridos desde sus últimos síntomas clínicos. Síntomas clínicos en los últimos 2 meses (barra blanca, n=16), 3-6 meses (barra con trama, n=15) o más de 6 meses (barra negra, n=31). *, p< 0,02 frente a 2 meses; #, p< 0,02 frente a 2 meses.

Figura 3:

CD36 soluble (sCD36) en plasma de pacientes con ateroesclerosis carotídea. La estenosis carotídea se diagnosticó y clasificó por ecografía dúplex a color precerebral (1) y angiotomografía (2) de acuerdo con criterios de consenso. Se dividieron los pacientes en ecolucentes (EL) y ecógenos (EG) en función de la clasificación ecográfica. N = número de pacientes, p = nivel de significación (prueba de la U de Mann-Whitney). La sCD36 en plasma se mide como unidades relativas, es decir, en una reserva de plasma con EDTA de la toma de muestras de sangre hospitalaria rutinaria. Las barras de error representan el EEM.

(1) Grant EG, Benson CB, Moneta GL *et al.* Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis - Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference, Radiology. 2003; 229:340-346

(2) Anderson GB, Asforth R, Steinke DE *et al.* CT angiography for the detection and characterization of carotid artery bifurcation disease. Stroke. 2000; 31:2168-2174.

Figura 4:

Niveles plasmáticos de CD36 soluble (sCD36) en pacientes con estenosis carotídea ateroesclerótica. Se agruparon los pacientes basándose en la ecogenia después de la exploración ecográfica de la arteria carótida ateroesclerótica. EL, placas ecolucentes (n= 20); EG, plagas ecógenas/heterogéneas (n=39). (*), p=0,09.

Figura 5:

Se clasificaron placas ateroescleróticas de la arteria carótida interna de pacientes sometidos a endarterectomía en dos grupos en función de si los pacientes habían experimentado o no apoplejía homolateral, AIT o amaurosis fugaz en los seis meses anteriores a la intervención quirúrgica. Se caracterizaron las placas como sintomáticas (n=3) o asintomáticas (n=4) de acuerdo con la presencia o ausencia de síntomas cerebrovasculares, respectivamente. Se midió la CD36 soluble (sCD36) en plasma de muestras de sangre extraídas el día anterior a la intervención quirúrgica. Los pacientes fueron idénticos a los pacientes incluidos en el análisis de perfil de expresión génica (micromatrices) de la placa carotídea (tabla 1) con la excepción de que faltaba la muestra de sangre de uno de los pacientes y, por lo tanto, no se midió la sCD36. N = número de pacientes. La sCD36 en plasma se mide como unidades relativas, es decir, con respecto a una reserva de plasma con EDTA de la toma de muestras de sangre hospitalaria rutinaria. Las barras de error representan el EEM.

Figura 6:

Fotomicrografías representativas de secciones seriadas que demuestran la inmunotinción anti-CD36 (A), anti-calprotectina (B) y anti-actina de músculo liso (C) en una lesión carotídea ateroesclerótica retirada por endarterectomía de un paciente con enfermedad inestable. Se localizó inmunorreactividad de CD36 en partes del núcleo rico en lípidos (*) de la lesión con numerosos macrófagos positivos para CD68, como se ve en el panel B. No se observó inmunotinción fuera del núcleo. La inmunotinción anti-CD36 más fuerte se observó en regiones adyacentes al medio (m). El panel C demuestra inmunotinción anti-actina de músculo liso en el medio. Barra de escala 100 µm.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

Placas ateroescleróticas: el término se usa con su significado convencional, es decir, acumulación en la pared arterial de lípidos, material extracelular, mediadores inflamatorios, células inflamatorias (es decir, leucocitos), macrófagos y células de la musculatura lisa vascular.

Placa ateroesclerótica sintomática: Una placa ateroesclerótica en un individuo que ha padecido síntomas, por ejemplo, en forma de apoplejía homolateral, accidente isquémico transitorio o amaurosis fugaz.

Placa ateroesclerótica asintomática: una placa ateroesclerótica en un individuo que no ha experimentado los síntomas mencionados en el epígrafe placa ateroesclerótica sintomática en los últimos seis meses o más.

Placa ateroesclerótica estable: una placa ateroesclerótica en un individuo que no muestra signos de progresión durante un periodo de tiempo predefinido de seis meses o más.

Placa ateroesclerótica inestable: una placa ateroesclerótica en un individuo que muestra signos de progresión.

En el presente contexto, el término placa ateromatosa es la acumulación e inflamación en las paredes arteriales, donde la inflamación la provocan, por ejemplo, macrófagos, desechos celulares, lípidos tales como colesterol y ácidos grasos, calcio y tejido conjuntivo fibroso. Así, el proceso del desarrollo de ateromas en un individuo se denomina aterogenia y el resultado global del proceso de enfermedad se llama ateroesclerosis. Por lo tanto, en la presente invención, el término placa ateromatosa se usa de forma intercambiable con placa ateroesclerótica.

Con el término 'molécula de ácido nucleico que codifica CD36' se quiere decir un producto transcripcional del gen que codifica CD36.

Diagnóstico: como se usa en el presente documento, se refiere a procedimientos por los que el experto en la técnica puede estimar y/o determinar si un paciente padece o no una enfermedad o afección dadas. Con frecuencia, el experto en la técnica elabora un diagnóstico basándose en uno o más indicadores diagnósticos, es decir, en la cantidad o concentración de un marcador, o el cambio de la cantidad del marcador que es indicativo de la presencia, gravedad o ausencia de la afección.

Tal como se usa en el presente documento, el término *correlacionar* se refiere a comparar la presencia o la cantidad del/de los marcador(es) en un paciente con su presencia o cantidad en individuos que padecen o tienen riesgo de padecer una afección dada; o en personas que se sabe que no tienen una afección dada. Como se analiza anteriormente, se puede comparar el nivel de un marcador en una muestra de un paciente con un nivel que se sabe que está asociado con un diagnóstico específico. Se dice que se ha correlacionado el nivel de marcador de la muestra con un diagnóstico; es decir, el experto en la técnica puede usar el nivel de marcador para determinar si el

paciente padece o no un tipo de diagnóstico específico, y actuar en consecuencia. De forma alternativa, se puede comparar el nivel de marcador de la muestra con un nivel de marcador que se sabe que está asociado con un buen resultado (p. ej., la ausencia de enfermedad, etc.).

Se aprecia que, en la presente invención, el término 'marcador' se refiere a un polipéptido de CD36 y/o una molécula de ácido nucleico que codifica CD36.

Tal como se usa en el presente documento, *determinar el diagnóstico* se refiere a procedimientos por los que el experto en la técnica puede determinar la presencia o ausencia de una enfermedad en particular en un paciente. El término "diagnóstico" no se refiere a la capacidad de determinar la presencia o ausencia de una enfermedad en particular con una precisión del 100 %. En su lugar, el experto en la técnica entenderá que el término "diagnóstico" se refiere a una probabilidad aumentada de que una enfermedad determinada esté presente en el sujeto. En realizaciones preferentes, un diagnóstico indica una probabilidad aumentada aproximadamente un 5 % de que una enfermedad esté presente, aproximadamente un 10 % de probabilidad, aproximadamente un 15 % de probabilidad, aproximadamente un 20 % de probabilidad, aproximadamente un 25 % de probabilidad, aproximadamente un 30 % de probabilidad, aproximadamente un 40 % de probabilidad, aproximadamente un 50 % de probabilidad, aproximadamente un 60 % de probabilidad, aproximadamente un 75 % de probabilidad, aproximadamente un 90 % de probabilidad y aproximadamente un 95 % de probabilidad. En este contexto, el término "aproximadamente" se refiere a +/- el 2 %.

Diagnóstico, clasificación y seguimiento del estado de la placa ateroesclerótica

La presente invención se basa en el análisis de placas y muestras de sangre de pacientes que han padecido o padecen estenosis carotídea interna y que se trataron por endarterectomía carotídea o angioplastia carotídea con implante de endoprótesis. Basándose en los resultados de un estudio sobre la concentración de polipéptido de CD36 en muestras de pacientes, la presente invención permite realizar un seguimiento de la progresión hacia una placa sintomática.

Es importante diagnosticar, clasificar y realizar un seguimiento de la desestabilización de una placa ateroesclerótica que da lugar a la progresión de una placa ateroesclerótica desde asintomática a sintomática, ya que la desestabilización puede desencadenar episodios isquémicos agudos diversos, tales como apoplejía, accidente isquémico transitorio, y síndromes coronarios agudos.

La presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar placas ateroescleróticas en un individuo con el fin de predecir y evitar episodios isquémicos agudos debidos a la desestabilización de las placas.

El procedimiento se puede usar para diagnosticar, clasificar y realizar un seguimiento de placas ateroescleróticas en cualquier arteria, en particular en las arterias carótidas y las arterias coronarias, así como un procedimiento para determinar si un individuo está en riesgo de tener y/o desarrollar una placa ateroesclerótica sintomática.

Asimismo, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar el grado de estenosis provocado por una placa ateroesclerótica, midiendo la concentración de polipéptido de CD36 o molécula de ácido nucleico de CD36.

Por tanto, la presente invención se refiere en un aspecto a un procedimiento para diagnosticar placas ateroescleróticas en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo,

i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36 soluble, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar dichas placas ateroescleróticas.

La clasificación y/o el diagnóstico de placas ateroescleróticas implica resolver si una placa asintomática está desestabilizada o no y tiene un riesgo mayor de progresión a placa sintomática, lo que puede dar lugar al desarrollo de episodios isquémicos agudos. En la presente invención se ha descubierto una correlación entre la concentración de polipéptido de CD36 y la desestabilización de placas asintomáticas a placas sintomáticas. Así, un aumento de la concentración de polipéptido de CD36 en comparación con un nivel de referencia es indicativo de la desestabilización de placas asintomáticas que progresan a placas sintomáticas.

Dentro del alcance de la presente invención se encuentra realizar un seguimiento de la progresión de la desestabilización de placas ateroescleróticas, sean asintomáticas o sintomáticas, en un individuo. Se determina la concentración de polipéptido de CD36 como se describe en la etapa i) y se correlaciona con un nivel de referencia. Se puede comparar el resultado de la correlación con concentraciones de polipéptido de CD36 determinadas en otros puntos temporales en dicho individuo. Realizando un seguimiento de la concentración de polipéptido de CD36 en un individuo en diferentes puntos temporales se puede observar el progreso de desestabilización de las placas ateroescleróticas. Este seguimiento de un individuo puede ser útil para determinar la pauta de tratamiento de un individuo.

Además, la presente invención se refiere a un procedimiento para diagnosticar la estenosis provocada por placas

ateroescleróticas en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo, i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar el grado de estenosis provocado por placas ateroescleróticas en un individuo.

La presente invención se refiere a placas ateroescleróticas en todos los tipos de arterias del organismo, por ejemplo, carótidas, arterias coronarias, arteria renal o arterias que irrigan los brazos y las piernas. A continuación se enumeran algunos de los síntomas que se asocian con la ateroesclerosis y la desestabilización de placas ateroescleróticas y con un aumento del riesgo de progresión a placas ateroescleróticas sintomáticas.

Una estenosis es un estrechamiento anómalo de un vaso sanguíneo. Con frecuencia, las estenosis de tipo vascular están asociadas con un ruido (soplo) resultante del flujo turbulento por el vaso sanguíneo estrechado. Este soplo se puede hacer audible mediante un fonendoscopio. No obstante, otros procedimientos de diagnóstico más precisos incluyen ecografía, resonancia magnética nuclear/angiorresonancia magnética, tomografía computerizada/angiotomografía, que muestran imágenes anatómicas y/o fenómenos de flujo.

También están dentro del alcance de la presente invención procedimientos relativos a la determinación, clasificación, diagnóstico, seguimiento de cardiopatía coronaria (CPC), que también se conoce como arteriopatía coronaria (APC), cardiopatía isquémica, cardiopatía ateroesclerótica. La cardiopatía coronaria es el resultado final de la acumulación de placas ateromatosas dentro de las paredes de las arterias que suministran oxígeno y nutrientes al miocardio.

Típicamente, los síntomas de cardiopatía coronaria se observan únicamente en el estado avanzado de la enfermedad. La mayoría de los individuos que padecen cardiopatía coronaria no presentan pruebas de la enfermedad durante años e incluso décadas, mientras la enfermedad progresa hasta que se produce la primera aparición de síntomas, frecuentemente un ataque al corazón "repentino". Con frecuencia, el motivo de la progresión de esta enfermedad es la rotura de placas ateromatosas, que se pueden romper y comenzar a restringir el flujo sanguíneo al músculo cardíaco.

El infarto agudo de miocardio, que también se conoce comúnmente como ataque al corazón, es también una afección a la que se refiere la presente invención. El infarto agudo de miocardio es una afección que conlleva la interrupción del riego sanguíneo a parte del corazón. La interrupción del riego sanguíneo se produce frecuentemente por la rotura de una placa ateroesclerótica de la pared arterial interna. La placa ateroesclerótica puede bloquear el paso de sangre en la arteria, lo que da lugar a la isquemia o escasez de oxígeno que provoca daños y una posible muerte del tejido cardíaco.

Normalmente, los individuos con riesgo de tener o desarrollar un infarto agudo de miocardio se caracterizan por el uso de factores de riesgo, tales como antecedentes de vasculopatías, por ejemplo, cardiopatía coronaria ateroesclerótica y/o angina de pecho, un ataque al corazón anterior o apoplejía.

La angina de pecho, provocada principalmente por la arteriopatía coronaria, es un dolor en el pecho debido a la falta de sangre y, por tanto, de suministro de oxígeno del músculo cardíaco, que, en general, se debe a la obstrucción o el espasmo de las arterias coronarias. Por tanto, de acuerdo con una realización de la invención, los procedimientos y kits del presente documento también se refieren a la determinación de si un individuo presenta o no riesgo de tener/desarrollar angina de pecho provocada por una placa ateroesclerótica.

La estenosis carotídea es un estrechamiento de la luz de la arteria carótida, habitualmente provocada por la ateroesclerosis. En el uso médico común, el término general "estenosis carotídea" se refiere a la estenosis en la parte proximal de la arteria carótida interna (en el bulbo carotídeo), ya que este es, con mucho, el lugar más común de estenosis dentro de las arterias carótidas. Se produce estenosis en otras partes de las arterias carótidas. Por tanto, en el presente contexto, el término ‘estenosis carotídea’ cubre el estrechamiento en al menos una de las arterias carótidas y, en particular, la parte proximal de la arteria carótida interna. La estenosis carotídea ateroesclerótica puede ser asintomática o puede provocar síntomas por embolia en los vasos cerebrales del cerebro o en las arterias retinianas. Tal como se usa en el presente documento, el término embolias se usa con su significado convencional, a saber, el episodio en el que un émbolo (obstáculo) migra a través de la circulación desde una parte del organismo y provoca un bloqueo de un vaso sanguíneo en otra parte del organismo. Las embolias en las arterias cerebrales provocan accidente isquémico transitorio (AIT) o accidente cerebrovascular (ACV). Las embolias en la retina producen amaurosis fugaz o infarto retiniano.

El diagnóstico de estenosis carotídea se determina frecuentemente por ecografía dúplex de flujo a color de las arterias del cuello. Esta prueba tiene una sensibilidad y especificidad moderadas y proporciona muchos resultados falsos positivos.

Los procedimientos y kits de la presente invención también se refieren a un accidente isquémico transitorio, AIT, que frecuentemente se denomina "mini apoplejía". El AIT se produce por la perturbación temporal del riego sanguíneo a una zona restringida del cerebro. La perturbación del riego sanguíneo al cerebro resulta con frecuencia en una breve disfunción neurológica que suele mantenerse durante menos de 24 horas. Los síntomas asociados con el AIT varían ampliamente en función de la zona del cerebro afectada por el AIT. Frecuentemente, los síntomas observados incluyen pérdida de visión temporal (típicamente, amaurosis fugaz); dificultad en el habla (afasia); debilidad en un

lado del cuerpo (hemiparesia); y entumecimiento u hormigueo (parestesia), normalmente en un lado del cuerpo. La disminución de la consciencia es muy poco común. Si hay síntomas neurológicos que se mantienen durante más de 24 horas, se clasifica como accidente cerebrovascular o apoplejía.

La característica clínica de la apoplejía o el accidente cerebrovascular (ACV) es una pérdida de función cerebral de evolución rápida debida a la perturbación del riego sanguíneo al cerebro. Esta perturbación se puede deber a la falta de riego sanguíneo (isquemia) provocada por una trombosis o una embolia, o debida a una hemorragia. La definición tradicional de apoplejía es la de "un déficit neurológico de origen cerebrovascular que se mantiene más de 24 horas o se interrumpe por la muerte en un plazo de 24 horas". En la presente invención, los procedimientos y kits se refieren a la apoplejía provocada por placas ateroescleróticas que provocan perturbaciones en el riego sanguíneo al cerebro. Las apopolejías o accidentes isquémicos transitorios anteriores son factores de riesgo típicos para la apoplejía.

CD36

Para los propósitos de la presente invención, el término "CD36" usado en expresiones tales como "CD36 circulante" o "CD36 que no está unida a células" y en las reivindicaciones, incluye la proteína CD36, o un fragmento de la misma, que es reconocido por un anticuerpo específico frente a CD36, tal como sc5522, sc9154 y sc7309. Esto incluye la proteína CD36 de longitud completa, un fragmento polipeptídico o peptídico de la misma, así como dicha proteína o fragmento(s) de la misma presentes en un complejo de fracción plasmática de alto peso molecular que comprende lipoproteínas de los mismos, todas las cuales son, preferentemente, solubles (sCD36). Los términos CD36 circulante y CD36 soluble (sCD36) se pueden usar como sinónimos en el presente documento. La CD36 circulante se puede secretar desde las caveolas o formar parte de una micropartícula que comprende porciones de membrana derivadas de una membrana de caveola que se ha liberado de una membrana celular y está presente en la circulación sanguínea. Las caveolas de interés a este respecto pueden estar presentes en la membrana celular de células tales como adipocitos, macrófagos, monocitos y trombocitos.

La CD36 es una proteína transmembranaria de 471 aminoácidos (que tiene 1 o 2 dominios que atraviesan la membrana en las posiciones de los residuos de aminoácido 439-460 y quizás 7-28). La CD36 es una glucoproteína de 88 kDa altamente glucosilada con sitios de unión a palmitoílo. La CD36 está presente en caveolas donde puede desempeñar un papel en la mediación del movimiento del colesterol celular hacia dentro y fuera de las células.

Familias moleculares de las que CD36 es miembro:

CD36→clase SR-B→receptores secuestrantes de defensa del hospedador→superfamilia de receptores secuestrantes

Estructura molecular de CD36:

471 residuos de aminoácido;

región transmembranaria (residuos 439-465) y

la región aminoterminal de 438 aminoácidos puede ser totalmente extracelular o puede tener una segunda región transmembranaria potencialmente transmembranaria cerca del extremo aminoterminal;

cola citoplásmica de aa corta (residuos 466-471);

dentro de la región extracelular se encuentra una región hidrófoba que probablemente se asocia con la membrana celular externa (residuos 184-204).

Se ha informado de que la masa molecular de CD36 depende del tipo celular como se muestra a continuación:

Plaquetas 88 kDa /113 kDa

Eritrocitos fetales 78 kDa

Células epiteliales mamarias 85 kDa

Eritroleucémicas 88 kDa, 85 kDa, 57 kDa8

HeLa 85 (160) kDa 85 kDa

Células endoteliales microvasculares dérmicas 80-90 kDa

En la modificación postranscripcional de CD36 se han identificado dos formas alternativas de ARNm de CD36. El primer tipo de ARNm se expresa en células HEL y omite los residuos de aminoácido 41-143. El segundo tipo de ARNm todavía no se ha traducido pero en él se han omitido los últimos 89 residuos. Por tanto, CD36 también se encuentra en formas en la que el marco de lectura abierto es 90-1708 y 357-1775, respectivamente.

Modificación postraduccional de CD36:

Se cree que CD36 está altamente glucosilada, con 10 sitios de glucosilación enlazados en N en la porción extracelular. Se ha sugerido que la glucosilación confiere su resistencia a la escisión proteolítica;

se ha mostrado que la treonina 92 está fosforilada;

la CD36 también está palmitoilada en ambas colas citoplásmicas, N- y C-terminales.

Proteínas y elementos de ADN que regulan la transcripción de la molécula de CD36:

Oct-2: El primer gen que se demostró que estaba regulado por el factor de transcripción Oct-2 durante la diferenciación de linfocitos B;

PEBP2: Los factores de transcripción PEBP2/CBF pueden ser importantes para la expresión constitutiva de CD36 en monocitos;

CBF: Los factores de transcripción PEBP2/CBF pueden ser importantes para la expresión constitutiva de CD36 en monocitos.

Se desconocen los sustratos para CD36. Es posible que CD36 regule la autofosforilación del residuo Thr92. Se desconocen las enzimas que modifican la CD36. Es posible que Thr92 se fosforile por treonina cinasa(s) extracelular(es). Probablemente, la señalización intracelular está asociada con la fosforilación de Fyn, Lyn y Yes, pero se desconoce la manera en que la cola citoplásmica interacciona con estas PTK.

Expresión celular principal de CD36:

CD36 se expresa en plaquetas, monocitos maduros y macrófagos, células endoteliales microvasculares, células endoteliales mamarias, durante fases del desarrollo de células eritroides y en algunas células dendríticas derivadas de macrófagos, miocitos, hepatocitos y adipocitos.

Los acontecimientos fisiológicos regulados por la unión de CD36 son todavía muy desconocidos. Hasta el 50 % de las LDL oxidadas se ingieren a través de CD36, por lo que parece que CD36 es un receptor secuestrante importante. No obstante, dada la aparente ausencia de estados de enfermedad en sujetos con deficiencia en CD36, parece que otros mecanismos pueden compensar su ausencia.

Secuencias de CD36

Preferentemente, el polipéptido de CD36 y/o la molécula de ácido nucleico de CD36 evaluados por el procedimiento acorde tienen una de las secuencias mostradas a continuación. Además, una molécula de ácido nucleico puede ser una molécula de ARN que es complementaria a una o más de las secuencias mostradas a continuación.

Símbolo del gen CD36 HGNC
Localización cromosómica 7q11.2
ID de UniGene
Construcción 191 (07 de mayo de 2006)
Hs. 120949 NCBI (LONGITUD COMPLETA)
Hs. 248425
Hs.75613
Hs. 325823

Entrez Gene 948 Entrez gene
HGNC: 1663
HPRD: 01430

SwissProt
P16671 EMBL-EBI

OMIM
173510 NCBI
248310 NCBI
608404 NCBI

Secuencias de referencia
ID de la proteína
NP_000063.2 NCBI
NP_001001547.1 NCBI
NP_001001548.1 NCBI

ID del transcrito
NM 000072 NCBI
NM 001001547 NCBI
NM 001001548 NCBI

Secuencia de nucleótidos:
(SEQ ID NO.:1)
NM_001001548 2338 pb ARNm lineal PRI20-ENE-2008
Molécula de CD36 (receptor de trombospondina) de *Homo sapiens* (CD36), variante de transcrito 1, ARNm.

ACCESO NM_001001548 (VERSIÓN NM_001001548.1)

ORIGEN

```
   1 gaggactgca gtgtaggact ttcctgcaga ataccatttg atcctattaa gaattgtcca
  61 aatgttggag catttgattg aaaaatcctt cttagccatt ttaaagatag ctttccaatg
 121 attagacgaa ttgattcttt ctgtgactca tcagttcatt tcctgtaaaa ttcatgtctt
 181 gctgttgatt tgtgaataag aaccagagct tgtagaaacc actttaatca tatccaggag
 241 tttgcaagaa acaggtgctt aacactaatt cacctcctga acaagaaaaa tgggctgtga
 301 ccggaactgt gggctcatcg ctggggctgt cattggtgct gtcctggctg tgtttggagg
 361 tattctaatg ccagttggag acctgcttat ccagaagaca attaaaaagc aagttgtcct
 421 cgaagaaggt acaattgctt ttaaaaattg ggttaaaaca ggcacagaag tttacagaca
 481 gttttggatc tttgatgtgc aaaatccaca ggaagtgatg atgaacagca gcaacattca
 541 agttaagcaa agaggtcctt atacgtacag agttcgtttt ctagccaagg aaaatgtaac
 601 ccaggacgct gaggacaaca cagtctcttt cctgcagccc aatggtgcca tcttcgaacc
 661 ttcactatca gttggaacag aggctgacaa cttcacagtt ctcaatctgg ctgtggcagc
 721 tgcatcccat atctatcaaa atcaatttgt tcaaatgatc ctcaattcac ttattaacaa
 781 gtcaaaatct tctatgttcc aagtcagaac tttgagagaa ctgttatggg gctataggga
 841 tccatttttg agtttggttc cgtaccctgt tactaccaca gttggtctgt tttatcctta
 901 caacaatact gcagatggag tttataaagt tttcaatgga aaagataaca taagtaaagt
 961 tgccataatc gacacatata aaggtaaaag gaatctgtcc tattgggaaa gtcactgcga
1021 catgattaat ggtacagatg cagcctcatt tccacctttt gttgagaaaa gccaggtatt
1081 gcagttcttt tcttctgata tttgcaggtc aatctatgct gtatttgaat ccgacgttaa
1141 tctgaaagga atccctgtgt atagatttgt tcttccatcc aaggcctttg cctctccagt
1201 tgaaaaccca gacaactatt gtttctgcac agaaaaaatt atctcaaaaa attgtacatc
1261 atatggtgtg ctagacatca gcaaatgcaa agaagggaga cctgtgtaca tttcacttcc
1321 tcatttttctg tatgcaagtc ctgatgtttc agaacctatt gatggattaa acccaaatga
1381 agaagaacat aggacatact tggatattga acctataact ggattcactt tacaatttgc
1441 aaaacggctg caggtcaacc tattggtcaa gccatcagaa aaaattcaag tattaaagaa
1501 tctgaagagg aactatattg tgcctattct ttggcttaat gagactggga ccattggtga
1561 tgagaaggca aacatgttca gaagtcaagt aactggaaaa ataaacctcc ttggcctgat
1621 agaaatgatc ttactcagtg ttggtgtggt gatgtttgtt gcttttatga tttcatattg
1681 tgcatgcaga tcgaaaacaa taaaataaac ctggctcaag cacaaaccaa tttgtgttgt
1741 tctgattcaa taattggttt ctgggtggcc aattcagaag aagagtgtac atgctcaaca
1801 aatcctaggc cctgcattcc tgtcatcctc atccgggggg aacaccatca tcccagtagc
1861 tgccctattc aactgcaaca gtctccagga ccatcagtat actgcatttc atgtgcacca
1921 aatattttga aagacattta taaataattg gcttatgact catatttctc tatgaatacc
1981 ttcatacagc aggtataact cttttcttta tgggcttaaa tattttgtca ctgatcctgc
2041 aaatggacat cattttagca cactagcggt ttatatttta aggaccttca ttctctgttc
2101 tgcacctctt ctggaaattg agtaaatttt gcttttttt ttttactcag ttgcaactta
2161 cgcttggcat cttcagaatg cttttctagc attaagagat gtaaatgata aaggaattat
2221 tgtatgaaat attacaaagc gtagactatg cattgttatt cattataata ttttttgctg
2281 tcataatcgc ctcataaaga caggtttcaa ccattaaaat atgttcttcc ttaaaaaa
```

//

ACCESO NM 000072 (VERSIÓN NM 000072.2)
(SEQ ID NO.: 2)
NMJD00072 1983 pb ARNm lineal PRI20-ENE-2008
DEFINICIÓN molécula CD36 (receptor de trombospondina) de *Homo sapiens* (CD36), variante de transcrito 3, ARNm.

ORIGEN

1 gaggactgca gtgtaggact ttcctgcaga ataccatttg atcctattaa gaattgtcca
61 aatgttggag catttgattg aaaaatcctt cttagccatt ttaaagatag ctttccaatg
121 attagacgaa ttgatttctt ctgtgactca tcagttcatt tcctgtaaaa ttcatgtctt
181 gctgttgatt tgtgaataag aaccagagct tgtagaaacc actttaatca tatccaggag
241 tttgcaagaa acaggtgctt aacactaatt cacctcctga acaagaaaaa tgggctgtga
301 ccggaactgt gggctcatcg ctggggctgt cattggtgct gtcctggctg tgtttggagg
361 tattctaatg ccagttggag acctgcttat ccagaagaca attaaaaagc aagttgtcct
421 cgaagaaggt acaattgctt ttaaaaattg ggttaaaaca ggcacagaag tttacagaca
481 gttttggatc tttgatgtgc aaaatccaca ggaagtgatg atgaacagca gcaacattca
541 agttaagcaa agaggtcctt atacgtacag agttcgtttt ctagccaagg aaaatgtaac
601 ccaggacgct gaggacaaca cagtctcttt cctgcagccc aatggtgcca tcttcgaacc
661 ttcactatca gttggaacag aggctgacaa cttcacagtt ctcaatctgg ctgtggcagc
721 tgcatcccat atctatcaaa atcaatttgt tcaaatgatc ctcaattcac ttattaacaa

781 gtcaaaatct tctatgttcc aagtcagaac tttgagagaa ctgttatggg gctataggga
841 tccatttttg agtttggttc cgtaccctgt tactaccaca gttggtctgt tttatcctta
901 caacaatact gcagatggag tttataaagt tttcaatgga aaagataaca taagtaaagt
961 tgccataatc gacacatata aaggtaaaag gaatctgtcc tattgggaaa gtcactgcga
1021 catgattaat ggtacagatg cagcctcatt tccacctttt gttgagaaaa gccaggtatt
1081 gcagttcttt tcttctgata tttgcaggtc aatctatgct gtatttgaat ccgacgttaa
1141 tctgaaagga atccctgtgt atagatttgt tcttccatcc aaggcctttg cctctccagt
1201 tgaaaaccca gacaactatt gtttctgcac agaaaaaatt atctcaaaaa attgtacatc
1261 atatggtgtg ctagacatca gcaaatgcaa agaagggaga cctgtgtaca tttcacttcc
1321 tcattttctg tatgcaagtc ctgatgtttc agaacctatt gatggattaa acccaaatga
1381 agaagaacat aggacatact tggatattga acctataact ggattcactt tacaatttgc
1441 aaaacggctg caggtcaacc tattggtcaa gccatcagaa aaaattcaag tattaaagaa
1501 tctgaagagg aactatattg tgcctattct ttggcttaat gagactggga ccattggtga
1561 tgagaaggca aacatgttca gaagtcaagt aactggaaaa ataaacctcc ttggcctgat
1621 agaaatgatc ttactcagtg ttggtgtggt gatgtttgtt gcttttatga ttcatattg
1681 tgcatgcaga tcgaaaacaa taaaataagt aagtatgtac caaaaaatat tgcttcaata
1741 atattagctt atatattact tgttttcact ttatcaaaga gaagttacat attaggccat
1801 atatatttct agacatgtct agccactgat catttttaaa tataggtaaa taaacctata
1861 aatattatca cgcagatcac taaagtatat cttaattct gggagaaatg agataaaaga
1921 tgtacttgtg accattgtaa caatagcaca aataaagcac ttgtgccaaa gttgtccaaa
1981 aaa

ACCESO NM 001001547 (VERSIÓN NM_001001547.1) (SEQ ID NO.: 3)

NM_001001547 2050 pb ARNm lineal PRI20-ENE-2008

Molécula de CD36 (receptor de trombospondina) de *Homo sapiens* (CD36), variante de transcrito 2, ARNm.

ORIGEN

1 agatgtcagg ataaccttaa ggatagatga agggttgaga gcctgtgcct catttctgag
61 ttctcagctg ctatgccgtg gaaatcctgt ttactttctg catctgctcc tgcaagactc
121 tggagccagt cttgaggtcc tacatctccg aaagcaagct cttctagaag ttgatagctt
181 tccaatgatt agacgaattg attctttctg tgactcatca gttcatttcc tgtaaaattc
241 atgtcttgct gttgatttgt gaataagaac cagagcttgt agaaaccact ttaatcatat
301 ccaggagttt gcaagaaaca ggtgcttaac actaattcac ctcctgaaca agaaaaatgg
361 gctgtgaccg gaactgtggg ctcatcgctg gggctgtcat tggtgctgtc ctggctgtgt
421 ttggaggtat tctaatgcca gttggagacc tgcttatcca gaagacaatt aaaaagcaag
481 ttgtcctcga agaaggtaca attgctttta aaaattgggt taaaacaggc acagaagttt
541 acagacagtt ttggatcttt gatgtgcaaa atccacagga agtgatgatg aacagcagca
601 acattcaagt taagcaaaga ggtccttata cgtacagagt tcgttttcta gccaaggaaa
661 atgtaaccca ggacgctgag gacaacacag tctctttcct gcagcccaat ggtgccatct
721 tcgaaccttc actatcagtt ggaacagagg ctgacaactt cacagttctc aatctggctg
781 tggcagctgc atcccatatc tatcaaaatc aatttgttca aatgatcctc aattcactta
841 ttaacaagtc aaaatcttct atgttccaag tcagaacttt gagagaactg ttatggggct
901 atagggatcc atttttgagt ttggttccgt acccctgttac taccacagtt ggtctgtttt
961 atccttacaa caatactgca gatggagttt ataaagtttt caatggaaaa gataacataa
1021 gtaaagttgc cataatcgac acatataaag gtaaaaggaa tctgtcctat tgggaaagtc
1081 actgcgacat gattaatggt acagatgcag cctcatttcc acctttttgtt gagaaaagcc
1141 aggtattgca gttctttct tctgatattt gcaggtcaat ctatgctgta tttgaatccg
1201 acgttaatct gaaaggaatc cctgtgtata gatttgttct tccatccaag gcctttgcct
1261 ctccagttga aaacccagac aactattgtt tctgcacaga aaaaattatc tcaaaaaatt
1321 gtacatcata tggtgtgcta gacatcagca aatgcaaaga agggagacct gtgtacattt
1381 cacttcctca ttttctgtat gcaagtcctg atgtttcaga acctattgat ggattaaacc
1441 caaatgaaga agaacatagg acatacttgg atattgaacc tataactgga ttcactttac
1501 aatttgcaaa acggctgcag gtcaacctat tggtcaagcc atcagaaaaa attcaagtat
1561 taaagaatct gaagaggaac tatattgtgc ctattctttg gcttaatgag actgggacca
1621 ttggtgatga gaaggcaaac atgttcagaa gtcaagtaac tggaaaaata aacctccttg

1681 gcctgataga aatgatctta ctcagtgttg gtgtggtgat gtttgttgct tttatgattt
1741 catattgtgc atgcagatcg aaaacaataa aataagtaag tatgtaccaa aaaatattgc
1801 ttcaataata ttagcttata tattacttgt tttcacttta tcaaagagaa gttacatatt
1861 aggccatata tatttctaga catgtctagc cactgatcat ttttaaatat aggtaaataa
1921 acctataaat attatcacgc agatcactaa agtatatctt taattctggg agaaatgaga
1981 taaaagatgt acttgtgacc attgtaacaa tagcacaaat aaagcacttg tgccaaagtt
2041 gtccaaaaaa

//

Secuencia proteica:
(SEQ ID NO.: 4)

ACCESO NP_001001548(VERSIÓN NP_001001548.1)

ORIGEN
1 mgcdrncgli agavigavla vfggilmpvg dlliqktikk qvvleegtia fknwvktgte
61 vyrqfwifdv qnpqevmmns sniqvkqrgp ytyrvrflak envtqdaedn tvsflqpnga
121 ifepslsvgt eadnftvlnl avaaashiyq nqfvqmilns linkskssmf qvrtlrellw
181 gyrdpflslv pypvtttvgl fypynntadg vykvfngkdn iskvaiidty kgkrnlsywe
241 shcdmingtd aasfppfvek sqvlqffssd icrsiyavfe sdvnlkgipv yrfvlpskaf
301 aspvenpdny cfctekiisk nctsygvldi skckegrpvy islphflyas pdvsepidgl
361 npneeehrty ldiepitgft lqfakrlqvn llvkpsekiq vlknlkrnyi vpilwlnetg
421 tigdekanmf rsqvtgkinl lgliemills vgvvmfvafm isycacrskt ik

(SEQ ID NO.: 5)

MGCDRNCGLI AGAVIGAVLA VFGGILMPVG DLLIQKTIKK QVVLEEGTIA FKNWVKTGTE
VYRQFWIFDV QNPQEVMMNS SNIQVKQRGP YTYRVRFLAK ENVTQDAEDN TVSFLQPNGA
IFEPSLSVGT EADNFTVLNL AVAAASHIYQ NQFVQMILNS LINKSKSSMF QVRTLRELLW
GYRDPFLSLV PYPVTTTVGL FYPYNNTADG VYKVFNGKDN ISKVAIIDTY KGKRNLSYWE
SHCDMINGTD AASFPPFVEK SQVLQFFSSD ICRSIYAVFE SDVNLKGIPV YRFVLPSKAF
ASPVENPDNY CFCTEKIISK NCTSYGVLDI SKCKEGRPVY ISLPHFLYAS PDVSEPIDGL
NPNEEEHRTY LDIEPITGFT LQFAKRLQVN LLVKPSEKIQ VLKNLKRNYI VPILWLNETG
TIGDEKANMF RSQVTGKINL LGLIEMILLS VGVVMFVAFM ISYCACRSKT IK

ACCESO NP 000063 (VERSIÓN NP 000063.2)
(SEQ ID NO.: 6)

ORIGEN
1 mgcdrncgli agavigavla vfggilmpvg dlliqktikk qvvleegtia fknwvktgte
61 vyrqfwifdv qnpqevmmns sniqvkqrgp ytyrvrflak envtqdaedn tvsflqpnga
121 ifepslsvgt eadnftvlnl avaaashiyq nqfvqmilns linkskssmf qvrtlrellw
181 gyrdpflslv pypvtttvgl fypynntadg vykvfngkdn iskvaiidty kgkrnlsywe
241 shcdmingtd aasfppfvek sqvlqffssd icrsiyavfe sdvnlkgipv yrfvlpskaf
301 aspvenpdny cfctekiisk nctsygvldi skckegrpvy islphflyas pdvsepidgl
361 npneeehrty ldiepitgft lqfakrlqvn llvkpsekiq vlknlkrnyi vpilwlnetg
421 tigdekanmf rsqvtgkinl lgliemills vgvvmfvafm isycacrskt ik

(SEQ ID NO.: 7)

MGCDRNCGLI AGAVIGAVLA VFGGILMPVG DLLIQKTIKK QVVLEEGTIA FKNWVKTGTE
VYRQFWIFDV QNPQEVMMNS SNIQVKQRGP YTYRVRFLAK ENVTQDAEDN TVSFLQPNGA
IFEPSLSVGT EADNFTVLNL AVAAASHIYQ NQFVQMILNS LINKSKSSMF QVRTLRELLW
GYRDPFLSLV PYPVTTTVGL FYPYNNTADG VYKVFNGKDN ISKVAIIDTY KGKRNLSYWE
SHCDMINGTD AASFPPFVEK SQVLQFFSSD ICRSIYAVFE SDVNLKGIPV YRFVLPSKAF
ASPVENPDNY CFCTEKIISK NCTSYGVLDI SKCKEGRPVY ISLPHFLYAS PDVSEPIDGL
NPNEEEHRTY LDIEPITGFT LQFAKRLQVN LLVKPSEKIQ VLKNLKRNYI VPILWLNETG
TIGDEKANMF RSQVTGKINL LGLIEMILLS VGVVMFVAFM ISYCACRSKT IK

ACCESO NP 001001547 (VERSIÓN NP_001001547.1)
(SEQ ID NO.: 8)

ORIGEN
1 mgcdmcgli agavigavla vfggilmpvg dlliqktikk qvvleegtia fknwvktgte
61 vyrqfwifdv qnpqevmmns sniqvkqrgp ytyrvrflak envtqdaedn tvsflqpnga
121 ifepslsvgt eadnftvlnl avaaashiyq nqfvqmilns linkskssmf qvrtlrellw
181 gyrdpflslv pypvttTvgl fypynntadg vykvfngkdn iskvaiidty kgkrnlsywe
241 shcdmingtd aasfppfvek sqvlqffssd icrsiyavee sdvnlkgipv yrfvlpskaf
301 aspvenpdny cfctekiisk nctsygvldi skckegrpvy islphflyas pdvsepidgl
361 npneeehrty ldiepitget lqfakrlqvn llvkpsekiq vlknlkrnyi vpilwlnetg
421 tigdekanmf rsqvtgkinl lgliemills vgvvmfvafm isycacrskt ik

(SEQ ID NO.: 9)

```
MGCDRNCGLI AGAVIGAVLA VFGGILMPVG DLLIQKTIKK QVVLEEGTIA FKNWVKTGTE
VYRQFWIFDV QNPQEVMMNS SNIQVKQRGP YTYRVRFLAK ENVTQDAEDN TVSFLQPNGA
IFEPSLSVGT EADNFTVLNL AVAAASHIYQ NQFVQMILNS LINKSKSSMF QVRTLRELLW
GYRDPFLSLV PYPVTTTVGL FYPYNNTADG VYKVFNGKDN ISKVAIIDTY KGKRNLSYWE
SHCDMINGTD AASFPPFVEK SQVLQFFSSD ICRSIYAVEE SDVNLKGIPV YRFVLPSKAF
ASPVENPDNY CFCTEKIISK NCTSYGVLDI SKCKEGRPVY ISLPHFLYAS PDVSEPIDGL
NPNEEEHRTY LDIEPITGET LQFAKRLQVN LLVKPSEKIQ VLKNLKRNYI VPILWLNETG
TIGDEKANMF RSQVTGKINL LGLIEMILLS VGVVMFVAFM ISYCACRSKT IK
```

Identidad de secuencia

En el presente documento se usan de forma intercambiable equivalentes funcionales y variantes. En una realización preferente de la invención también se proporcionan variantes de CD36 y variantes de fragmentos de la misma. Cuando son polipéptidos, las variantes se determinan basándose en su grado de identidad o su homología con una secuencia de aminoácidos predeterminada, siendo dicha secuencia de aminoácidos predeterminada una de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 cuando la variante es un fragmento, un fragmento de cualquiera de las secuencias de aminoácidos mencionadas anteriormente, respectivamente.

En consecuencia, las variantes tienen, preferentemente, al menos el 91 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos el 91 % de identidad de secuencia, tal como al menos el 92 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos el 93 % de identidad de secuencia, tal como al menos el 94 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos el 95 % de identidad de secuencia, tal como al menos el 96 % de identidad de secuencia, por ejemplo, al menos el 97 % de identidad de secuencia, tal como al menos el 98 % de identidad de secuencia, por ejemplo, el 99 % de identidad de secuencia, con la secuencia predeterminada.

Se usan los términos siguientes para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos: "secuencia predeterminada", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial".

Una "secuencia predeterminada" es una secuencia definida usada como base para una comparación de secuencias; una secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de un ADN de longitud completa, un producto transcripcional del mismo, una secuencia génica dada en un listado de secuencias, tal como una secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 o puede comprender una secuencia de ADN o génica completa. En general, una secuencia predeterminada tiene al menos 20 nucleótidos de longitud, frecuentemente al menos 25 nucleótidos de longitud y a menudo al menos 50 nucleótidos de longitud.

Dado que dos secuencias polinucleotídicas pueden (1) comprender cada una una secuencia (es decir, una porción de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos y (2) pueden comprender además una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan típicamente comparando secuencias de los dos polinucleótidos a lo largo de una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales con similitud de secuencia. Tal como se usa en el presente documento, una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 20 posiciones de nucleótido contiguas en el que se puede comparar una secuencia polinucleotídica con una secuencia predeterminada de al menos 20 nucleótidos contiguos y en el que la porción de la secuencia polinucleotídica de la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) del 20 por ciento o menos en comparación con la secuencia predeterminada (que no comprende adiciones o deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias.

La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación se puede llevar a cabo por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, por aplicación asistida por ordenador de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA del paquete informático de Wisconsin Genetics, versión 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), o por inspección, y se selecciona el mejor porcentaje de

alineación (es decir, el que da lugar al mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generado por los diversos procedimientos.

El término "identidad de secuencia" significa que dos secuencias polinucleotídicas son idénticas (es decir, en una base de nucleótido a nucleótido) en la ventana de comparación. El término "porcentaje de identidad de secuencia" se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se presenta la misma base de ácido nucleico (p. ej., A, T, C, G, U o I) en ambas secuencias para proporcionar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones de la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para proporcionar el porcentaje de identidad de secuencia. Tal como se usa en el presente documento, el término "identidad sustancial" designa una característica de una secuencia polinucleotídica, en la que el polinucleótido comprende una secuencia que tiene al menos el 85 por ciento de identidad de secuencia, preferentemente al menos del 90 al 95 por ciento de identidad de secuencia, más preferentemente al menos el 99 por ciento de identidad de secuencia, en comparación con una secuencia predeterminada en una ventana de comparación de al menos 20 posiciones de nucleótido, frecuentemente en una ventana de al menos 25-50 nucleótidos, en la que el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia predeterminada con la secuencia polinucleotídica que puede incluir deleciones o adiciones que suponen un 20 por ciento o menos de la secuencia predeterminada en la ventana de comparación. La secuencia predeterminada puede ser un subconjunto de una secuencia mayor, por ejemplo, como un segmento de la secuencia polinucleotídica de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3 de longitud completa ilustrada en el presente documento.

El término "productos transcripcionales o traduccionales" significa en el presente documento productos de transcripción génica, tales como un transcrito de ARN, por ejemplo un transcrito de ARN no ayustado, un transcrito de ARNm y los productos de ayuste de dicho transcrito de ARNm, y productos de traducción génica, tales como polipéptido(s) traducido(s) a partir de cualquiera de los transcritos de ARNm del gen y diversos productos de procesamiento postraduccional de dichos polipéptidos, tales como los productos de procesamiento postraduccional proteolítico del/de los polipéptido(s) o productos de diversas modificaciones postraduccionales de dicho(s) polipéptido(s). Tal como se usa en el presente documento, el término "producto transcripcional del gen" se refiere a una molécula de pre-ARN mensajero, pre-ARNm, que contiene la misma información de secuencia (aunque los nucleótidos de U reemplazan a los nucleótidos de T) que el gen, o una molécula de ARN mensajero maduro, ARNm, que se produjo debido al ayuste del pre-ARNm, y es el molde para la traducción de información genética el gen a una proteína. Tal como se usa en el presente documento, el término "producto traduccional del gen" se refiere a una proteína, que está codificada por el gen CD36.

Tal como se usa en el presente documento, el término "producto transcripcional del gen" se refiere a un transcrito que está codificado por el gen que codifica CD36 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3). El experto en la técnica apreciará que se conocen varias isoformas de CD36. Las isoformas son versiones de una proteína con algunas pequeñas diferencias, normalmente una variante de ayuste o el producto de alguna modificación postraduccional. La presente invención se refiere a cualquier isoforma de CD36. No se pretende que los ejemplos dados en el presente documento sean limitantes del alcance de la presente invención.

Por tanto, la presente divulgación se refiere a procedimientos para clasificar, diagnosticar y/o realizar un seguimiento de las placas ateroescleróticas en un individuo, por ejemplo, determinando la concentración de la menos un transcrito de CD36 correspondiente al producto transcripcional de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3, o parte del mismo.

En particular, la divulgación se refiere a procedimientos que implican las etapas de determinar la concentración de una molécula de ácido nucleico que codifica CD36, estando los productos transcripcionales del gen que codifica CD36 en

(i) una secuencia de ácido nucleico identificada en la invención como SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3 o fragmentos de la misma,

(ii) una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3 o fragmentos de la misma,

(iii) una secuencia de ácido nucleico complementaria a cualquiera de las secuencias de (i) o (ii).

La invención también se refiere a procedimientos que implican la etapa de determinar la concentración de un polipéptido de CD36 o parte del mismo en

(i) proteínas variantes correspondientes a la proteína identificada como SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9 o variantes o fragmentos de la misma,

(ii) secuencias polipeptídicas que tienen al menos el 90 % de identidad con las proteínas variantes, o fragmentos de las mismas, de (i).

Por tanto, es una realización de la divulgación el uso de las proteínas variantes identificadas anteriormente con el

propósito de

i) clasificar placas ateroescleróticas en un individuo

ii) diagnosticar placas ateroescleróticas en un individuo

iii) realizar un seguimiento de placas ateroescleróticas en un individuo

iv) diagnosticar a un individuo con riesgo de tener y/o desarrollar placas ateroescleróticas sintomáticas

v) diagnosticar la carga de placas ateroescleróticas en un individuo

vi) diagnosticar estenosis provocada por placas ateroescleróticas en un individuo y/o

vii) determinar la pauta de tratamiento de un individuo.

En una realización, se determina la identidad de secuencia utilizando fragmentos de péptidos de CD36 que comprenden al menos 25 aminoácidos contiguos y que tienen una secuencia de aminoácidos que es al menos el 80 %, tal como el 85 %, por ejemplo el 90 %, tal como el 95 %, por ejemplo el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9, en la que se determina el porcentaje de identidad con el algoritmo GAP, BESTFIT o FASTA del paquete informático de Wisconsin Genetics, versión 7.0, usando pesos de hueco por defecto.

Sustituciones de aminoácidos conservadoras:

Las sustituciones dentro de los grupos de aminoácidos, mostradas a continuación, se consideran sustituciones de aminoácidos conservadoras. Las sustituciones entre los diferentes grupos de aminoácidos se consideran sustituciones de aminoácidos no conservadoras.

P, A, G, S, T (neutros, débilmente hidrófobos)

Q, N, E, D, B, Z (hidrófilos, amina ácida)

H, K, R (hidrófilos, básicos)

F, Y, W (hidrófobos, aromáticos)

L, I, V, M (hidrófobos)

C (formador de entrecruzamiento)

Individuos

La presente invención se refiere a individuos, por ejemplo, mamíferos y en particular seres humanos de cualquier sexo o edad. Los individuos son asintomáticos en cuanto a las enfermedades provocadas por la ateroesclerosis como se describe en el presente documento. Por tanto, el individuo de la presente invención puede no haber padecido nunca ninguna enfermedad relacionada con la ateroesclerosis. Sin embargo, también está dentro del alcance de la presente invención que el individuo de la presente invención puede haber padecido anteriormente enfermedades relacionadas con la ateroesclerosis pero que son asintomáticas en el momento de llevar a cabo los procedimientos de la presente invención.

Muestra

La muestra de acuerdo con la divulgación puede ser una muestra de fluido corporal, en particular una muestra de suero o plasma sin células. La ausencia de células del plasma se puede comprobar al microscopio después de centrifugar la muestra de sangre. La centrifugación hace que las células sanguíneas se separen del plasma. La centrifugación de una muestra de sangre en el intervalo de 2.500 a 3.000 G dará lugar a un plasma sin células. En una realización la muestra es una muestra de sangre venosa periférica. Una realización preferente es una muestra sin células, preferentemente una muestra de plasma sin células.

Pueden ser preparaciones de plasma adecuadas el plasma de sangre estabilizada con heparina o la sangre estabilizada con citrato o estabilizada con EDTA.

Las muestras pueden ser recién preparadas o congeladas. Por ejemplo, se congelan las muestras a -80 °C y se descongelan una sola vez antes de determinar la concentración de CD36 y/o ácido nucleico que codifica CD36.

Procedimientos inmunológicos

En el contexto de la presente invención, se entiende que "procedimientos inmunológicos" significa procedimientos analíticos basados en la inmunoquímica, en particular en una reacción antígeno-anticuerpo. Los ejemplos de

procedimientos inmunológicos incluyen inmunoensayos tales cono radioinmunoensayo (RIA), inmunoensayo enzimático (EIA, combinado con técnica en fase sólida: ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)) o también ensayos de inmunofluorescencia. El inmunoensayo se lleva a cabo exponiendo la muestra que se va a estudiar a un anticuerpo que se une a CD36 y detectando y cuantificando la cantidad de CD36 unida a este anticuerpo. En estos ensayos, la detección y cuantificación se llevan a cabo directa o indirectamente de una manera conocida. Así, la detección y cuantificación de los complejos antígeno-anticuerpo se hacen posibles por el uso de marcas adecuadas que puede llevar el anticuerpo dirigido contra CD36 y/o un anticuerpo secundario dirigido contra el anticuerpo primario. En función del tipo de inmunoensayo mencionado anteriormente, las marcas son, por ejemplo, marcas radioactivas, una marca quimioluminiscente, tintes fluorescentes o también enzimas, tales como fosfatasa o peroxidasa, que se pueden detectar y cuantificar con ayuda de un sustrato adecuado.

En una realización de la invención, se lleva a cabo el procedimiento inmunológico con la ayuda de una fase sólida adecuada. Las fases sólidas adecuadas que pueden mencionarse incluyen las placas de microvaloración comerciales habituales fabricadas de poliestireno o membranas (por ejemplo, fabricadas de poli(difluoruro de vinilideno), PVDF) que se usan habitualmente para la técnica de ELISA.

Para llevar a cabo un procedimiento de acuerdo con la invención, se aplica una muestra adecuada, tal como una muestra líquida de un paciente, a la fase sólida. Preferentemente, la muestra es una muestra de plasma en la que la CD36 o la fracción de la misma está presente en una forma no unida o está presente en una forma que podría estar unida a su ligando LDL. La suposición del presente documento de que sCD36 está presente en un complejo con una fracción de alto peso molecular en el plasma implica que es preferente congelar y descongelar las muestras que se van a probar, de forma que, probablemente, dicho complejo de alto peso molecular (complejo lípido-proteína) se degrade.

En un aspecto la invención se refiere a un procedimiento, en el que se determina la concentración de polipéptido de CD36 i) proporcionando una muestra que se va a estudiar, ii) proporcionando un anticuerpo anti-CD36, iii) exponiendo la muestra al anticuerpo anti-CD36, iv) opcionalmente, exponiendo dicho complejo CD36-anticuerpo a al menos otro anticuerpo dirigido contra dicho complejo CD36-anticuerpo y v) detectando y cuantificando la cantidad de dicho anticuerpo.

En un aspecto más específico de la invención se proporciona un procedimiento para determinar la CD36 humana en una muestra de plasma por inmunoensayo enzimático ELISA en fase sólida, que comprende las etapas de

(i) proporcionar una muestra de plasma que se va a estudiar,

(ii) proporcionar un anticuerpo anti-CD36 como se define en el presente documento,

(iii) exponer la muestra que se va a estudiar a una fase sólida y al anticuerpo y

(iv) detectar y cuantificar la cantidad del anticuerpo que se une a CD36; y

en un aspecto más preferente de la invención se proporciona un procedimiento para determinar la CD36 humana en una muestra de plasma por inmunoensayo enzimático ELISA en fase sólida, que comprende las etapas de

(i) proporcionar una muestra de plasma que se va a estudiar,

(ii) proporcionar un anticuerpo anti-CD36,

(iii) exponer la muestra que se va a estudiar al anticuerpo anti-CD36 unido a una fase sólida,

(iv) opcionalmente, exponer el complejo CD36-anticuerpo a un segundo anticuerpo anti-CD36 y

(v) detectar y cuantificar la cantidad del anticuerpo que se une a CD36,

y en el que preferentemente la fase sólida es una placa de microvaloración, preferentemente la CD36 está presente (parte de ella) en una fracción de plasma de alto peso molecular, siendo dicha fracción de plasma de alto peso molecular, preferentemente, un complejo CD36-lipoproteína; preferentemente dicho anticuerpo anti-CD36 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales como se especifica a continuación; preferentemente dicha determinación se lleva a cabo por un inmunoensayo enzimático en fase sólida, en el que, en el inmunoensayo enzimático, se expone la muestra a un primer anticuerpo de unión a CD36 humana, y se mide la cantidad de CD36 unida usando un segundo anticuerpo anticuerpo de unión a CD36 que lleva una marca enzimática, donde la medida se lleva a cabo por una reacción de color catalizada por enzimas o quimioluminiscencia.

También está dentro del alcance de la presente invención determinar la concentración de CD36 por la técnica de matriz en suspensión multiplex.

Anticuerpos

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un anticuerpo dirigido a un epítopo de polipéptido de CD36 o

parte del mismo como se describe en otros puntos del presente documento. El anticuerpo se puede usar en procedimientos de la presente invención relativos a procedimientos para clasificar una placa ateroesclerótica, diagnosticar una placa ateroesclerótica, realizar un seguimiento de una placa ateroesclerótica, diagnosticar el riesgo de tener y/o desarrollar una placa ateroesclerótica sintomática, diagnosticar la carga de una placa ateroesclerótica, diagnosticar estenosis y/o determinar la pauta de tratamiento de un individuo. Así, en este contexto, epítopo cubre cualquier epítopo que pueda reconocer un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye anticuerpos tanto policlonales como monoclonales, así como fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab)2 que pueden unirse a un antígeno o hapteno. Incluye anticuerpos monoclonales murinos convencionales, así como anticuerpos humanos, y formas humanizadas de anticuerpos no humanos, y también incluye 'anticuerpos' aislados de colecciones de anticuerpos de fagos.

Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales y se puede producir por procedimientos *in vivo* o *in vitro* conocidos en la técnica. Por tanto, el anticuerpo anti-CD36 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales y policlonales específicos frente a CD36.

Un anticuerpo monoclonal es un anticuerpo producido por una célula de hibridoma. Los expertos en la técnica conocen bien procedimientos de preparación de células de hibridoma que sintetizan anticuerpos monoclonales, p. ej., por fusión de un linfocito B que produce anticuerpos con una línea celular de linfocitos B inmortalizada.

Un anticuerpo policlonal es una mezcla de moléculas de anticuerpo (específicas para un antígeno dado) que se ha purificado a partir de la sangre de un animal inmunizado (frente a ese antígeno dado), donde un ejemplo no limitante son moléculas de anticuerpo de conejo. Estos anticuerpos son policlonales en cuanto que son los productos de muchas poblaciones diferentes de células productoras de anticuerpos.

La divulgación también se refiere a mezclas de anticuerpos monoclonales y/o policlonales.

También está dentro del alcance de la presente invención una mezcla de al menos dos anticuerpos monoclonales. Se aprecia que la mezcla puede comprender 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o 15 anticuerpos monoclonales.

El anticuerpo anti-CD36 usado en el presente documento puede ser un anticuerpo monoclonal como se describe anteriormente y/o un anticuerpo policlonal aislado, que se puede obtener por un procedimiento de inmunización en el que se usa como componente de antígeno CD36 humana purificada o recombinante y, preferentemente, el anticuerpo es específico para diversas fracciones de la proteína CD36 que está presente en plasma sanguíneo humano en forma soluble, opcionalmente como parte de un complejo CD36-lipoproteína, tal como una CD36 o una fracción de la misma unida a liproproteína de baja densidad (LDL), IDL (lipoproteína de densidad intermedia o VLDL (liproproteína de muy baja densidad) que puede estar presente en una fracción de alto peso molecular de plasma sin células. En una realización el complejo CD36-lipoproteína comprende formas oxidadas de lipoproteínas. Por ejemplo, la sCD36 se asocia con LDL oxidada (oxLDL), LDL oxidada, IDL oxidada y/o VLDL oxidada. En otra realización más sCD36 se encuentra en un complejo con HDL oxidada.

En una realización el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en sc7309 (CD36 (SMf), IgM de ratón) y anticuerpos policlonales específicos frente a CD36, tales como sc5522 (CD36 (N-15), IgG de cabra, epítopo N-terminal (h)), sc9154 (CD36(H-300), IgG de conejo, epítopo 1-300 (h)), tales como sc5522 y sc9154 (ambos de Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, California, EE. UU.).

Preferentemente, los anticuerpos usados en el ensayo ELISA para la detección de CD36 circulante en plasma están marcados para facilitar su detección, estando la marca, preferentemente, en forma de biotinilación, lo cual conoce bien un experto en la técnica.

En particular el anticuerpo monoclonal específico frente a CD36 se puede seleccionar del grupo que consiste en:

185-1G2 Vilella

131.1 Tandon, Rockville

131.2 Tandon, Rockville

131.4 Tandon, Rockville

131.5 Tandon, Rockville

131.7 Tandon, Rockville

NAM28-8C12 Blanchard, Nantes

AmAK-5 Kehrel, Muenster

CLB-IVC7 CLB, Amsterdam

Lyp 10.5 McGregor, Lyon

Lyp 13.10 McGregor, Lyon

Nivel de referencia usado en el diagnóstico, clasificación y seguimiento

En un individuo que padece una placa ateroesclerótica, un aumento de la concentración de polipéptido de CD36 de al menos 1,15 veces el nivel de referencia es una indicación de progresión de la placa ateroesclerótica hacia una placa ateroesclerótica sintomática. En particular un aumento del al menos 1,25 del nivel de referencia, por ejemplo, un aumento de al menos 1,30, tal como un aumento de al menos 1,35 del nivel de referencia, por ejemplo, 1,40 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,45 del nivel de referencia, por ejemplo, 1,50 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,55 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,60 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,65 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,70 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,75 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,80 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 1,85 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 2,0 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 2,25 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 2,50 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 3 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 3,50 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 4 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 4,50 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 5 del nivel de referencia, tal como un aumento de al menos 6, 7, 8, 9 o 10 del nivel de referencia, es indicativo de progresión de la placa ateroesclerótica hacia una placa ateroesclerótica sintomática.

El término "nivel de referencia" significa la concentración de polipéptido de CD36 en una reserva de muestras de un grupo aleatorio de individuos. En una realización se determina el nivel de referencia en una reserva de muestra de un grupo aleatorio de individuos asintomáticos. La reserva comprende muestras de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o tal como de al menos 100 individuos.

En otra realización el nivel de referencia es la concentración de polipéptido de CD36 en una reserva de muestras de un grupo de individuos tal como de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17,18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o tal como de al menos 100 individuos, en los que no se ha observado ningún síntoma relacionado con la ateroesclerosis desde hace más de 2 meses, desde hace más de 3 meses, desde hace más de 4 meses, desde hace más de 5 meses o desde hace más de 6 meses, en el momento de suministrar una muestra. En una realización el nivel de referencia es la concentración de polipéptido de CD36 o molécula de ácido nucleico que codifica CD36 en una reserva de muestras de un grupo de individuos tal como de al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12,13, 14,15, 16,17, 18,19, 20, 25, 30, 35, 40,45, 50, 55, 60,65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o tal como de al menos 100 individuos, en los que no se ha observado ningún síntoma relacionado con la estenosis carotídea y/o la esclerosis carotídea desde hace más de 2 meses, desde hace más de 3 meses, desde hace más de 4 meses, desde hace más de 5 meses o desde hace más de 6 meses, en el momento de suministrar una muestra.

Kit

En un aspecto la invención se refiere a un uso de un kit para diagnosticar placas ateroescleróticas en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo, i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar dichas placas ateroescleróticas.

En otro aspecto la divulgación se refiere a un kit para diagnosticar a un individuo con riesgo de tener y/o desarrollar placas ateroescleróticas sintomáticas, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo, i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar si dicho individuo está en riesgo o no de tener y/o desarrollar una placa ateroesclerótica sintomática.

Además, la presente invención se refiere a un uso de un kit para diagnosticar la estenosis provocada por placas ateroescleróticas en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de dicho individuo, i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36, ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar el grado de estenosis provocado por placas ateroescleróticas en un individuo.

Así, los uno o más kits comprenden al menos un elemento de detección para la determinación de la concentración de un polipéptido de CD36. En una realización el elemento de detección es un anticuerpo que se puede unir específicamente al polipéptido de CD36 o parte del mismo.

La concentración de un polipéptido de CD36 o un fragmento del mismo se puede comparar manualmente por una persona o por ordenador u otra máquina. Se puede usar un algoritmo para detectar similitudes y diferencias. El

algoritmo puede puntuar y comparar, por ejemplo, los genes que se expresan y los genes que no se expresan. De forma alternativa, el algoritmo puede buscar cambios en la intensidad de la expresión de un gen en particular, un transcrito o un producto traduccional del mismo y puntuar los cambios en la intensidad entre dos muestras. Se pueden determinar similitudes basándose en genes, transcritos o productos traduccionales de los mismos que se expresan en ambas muestras y genes que no se expresan en ambas muestras, o basándose en genes cuya intensidad de expresión es numéricamente similar.

En general, la operación de detección se realizará usando un dispositivo de lectura externo al dispositivo de diagnóstico. Sin embargo, en algunos casos puede ser deseable incorporar la operación de recogida de datos en el propio dispositivo de diagnóstico.

El aparato de detección puede ser un detector de fluorescencia o un detector espectroscópico u otro detector.

Aunque la hibridación es un tipo de interacción específica que es claramente útil para su uso en esta realización de mapeo, también pueden ser muy útiles reactivos de anticuerpo.

Típicamente, la recogida de datos de las diversas operaciones de análisis, p. ej., matrices de oligonucleótidos y/o microcapilares, se llevará a cabo usando procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden escanear las matrices usando láseres para excitar objetivos marcados de forma fluorescente que han hibridado con regiones de matrices de sondas mencionadas anteriormente, de las que después se pueden tomar imágenes usando dispositivos acoplados cargados ("CCD") para un escaneo de campo amplio de la matriz. De forma alternativa, otro procedimiento particularmente útil para recoger datos de las matrices es a través del uso de microscopía láser confocal que combina la facilidad y la velocidad de un procedimiento automatizado fácilmente con una detección del alta resolución.

Típicamente, después de la operación de recogida de datos, se comunicarán los datos a una operación de análisis de datos. Para facilitar la operación de análisis de muestra, típicamente, los datos obtenidos por el lector del dispositivo se analizarán usando un ordenador digital. Típicamente, el ordenador estará programado de forma apropiada para la recepción y el almacenamiento de los datos desde el dispositivo, así como para el análisis y la comunicación de los datos recogidos, es decir, interpretación de datos de fluorescencia para determinar la secuencia de las sondas que hibridan, normalización de fondo e hibridaciones de desapareamientos de una sola base, ordenamiento de datos de secuencia en aplicaciones de SBH, y similares.

Parte experimental y ejemplos

Pacientes

Se clasificaron placas carotídeas de pacientes consecutivos con endarterectomía en dos grupos en función de si los pacientes habían experimentado o no apoplejía homolateral, AIT o amaurosis fugaz en los seis meses anteriores a la intervención quirúrgica. Se caracterizaron las placas como sintomáticas o asintomáticas de acuerdo con la presencia o ausencia de síntomas cerebrovasculares, respectivamente. Las estenosis carotídeas se diagnosticaron y clasificaron por ecografía dúplex a color precerebral (Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandres AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katanick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler RE. Carotid artery stenosis: gray-scale and Doppler US diagnosis-Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference. *Radiology.* 2003; 229:340-346) y angiotomografía (Anderson GB, Ashforth R, Steinke DE, Ferdinandy R, Findlay JM. CT angiography for the detection and characterization of carotid artery bifurcation disease. *Stroke.* 2000; 31:2168-2174) de acuerdo con criterios de consenso. Las estenosis carotídeas asintomáticas se detectaron durante exploraciones clínicas de pacientes con arteriopatía coronaria (APC), arteriopatía coronaria periférica o apoplejía/AIT más de seis meses antes.

Especímenes de endarterectomía carotídea

Se recuperaron placas ateroescleróticas carotídeas de pacientes durante la endarterectomía carotídea. Las placas que se usaron para extracción de proteínas y ARN se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Para realizar inmunotransferencias, se homogeneizaron los polvos de tejido de las placas en tampón de lisis helado (PBS que contenía cóctel inhibidor de proteasas [Gibco, Paisley, RU] con Triton X-100 al 1 % y Tween 20 al 0,1 %) en una proporción de 0,1 ml por 10 mg de peso húmedo de tejido mediante un homogeneizador de hoja metálica. Se incubaron extractos en hielo durante 15 minutos y se centrifugaron a 12.000 g (15 minutos a 4 °C). Se retuvieron los sobrenadante y se midió la concentración de proteína en las muestras con el procedimiento BCA (Pierce, Cheshire, RU).

Protocolo de toma de muestras de sangre

Se extrajo sangre venosa periférica en tubos con EDTA sin pirógenos que se sumergieron inmediatamente en hielo fundido y se centrifugaron a 2.500 g durante 20 minutos en un plazo de 20 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas. Se almacenaron todas las muestras a -80 °C y se descongelaron una sola vez antes de comenzar los procedimientos de ensayo.

Micromatrices de oligonucleótidos de alta densidad

Se aisló ARN total a partir de tejido carotídeo congelado usando el kit MagNA Pure Kit III (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), se cuantificó de forma espectrofotométrica y se almacenó a -80 °C. Se adquirió la matriz de genoma humano U133A 2.0 que codifica 14500 genes de Affymetrix (Santa Clara, CA) y se realizó la hibridación de acuerdo con el protocolo de marcaje de objetivos de dos ciclos del fabricante. Brevemente, se preparó ADNc a partir de 100 ng de ARN total y se obtuvo ARNc a partir de la transcripción *in vitro* de ADNc. Después se repitió el ciclo preparando ADNc a partir de 600 ng de ARNc. Después de esto, se generó ARNc marcado con biotina a partir de la transcripción *in vitro* de ADNc y se fragmentó antes de la hibridación con la matriz. Para el análisis de los datos se usaron GeneChip Operation Software (1.3) y ArrayAssist (3.4).

Ejemplo 1

Ejemplo de kit de análisis ELISA para detectar CD36 en suero

Análisis ELISA, reactivos usados y condiciones de ensayo

Tampón fosfato 0,1 mol/l, a pH 8,0

Na_2HPO4, $2H_2O$, 0,1 mol/l, a pH 8,0, almacenado a 4 °C.

Tampón POD

NaH_2PO4, H_2O, 1,5 mmol/l

Na_2HPO4, 2 H_2O, 8,5 mmol/l

NaCl 400 mmol/l

pH 7,4

Almacenado a 4 °C

Preparación de solución de lisozima:

Lisozima, Sigma L-6876, 20 mg/ml. Almacenada a -20 °C en porciones de 1 ml, duración en almacenamiento de 1 año. La duración en almacenamiento a 4 °C es de 4 días.

POD-avidina Dako P364: reactivo de color

Micropocillo de sustrato de peroxidasa TMB (1 componente)

N.º de cat. 50-76-06, Kirkegard and Perry Laboratories. Duración en almacenamiento de 1 año a 2-25 °C

Ácido fosfórico, 1 mol/l

Solución de POD-avidina:

Tampón POD 12 ml

Solución de lisozima 120 µl

POD-avidina 6 µl

Preparar inmediatamente antes de su uso.

Anticuerpo

Anti-CD36: sc-9154 biotinilado (anticuerpo policlonal de conejo de Santa Cruz)

Aparato

Lavador de placas de microvaloración automático Elx50 (Biotek Instruments). Se recubrieron placas de ELISA durante la noche a 4 °C con anticuerpo de cabra de captura (sc5522)-CD36 (0,1 µg/ml), seguido del bloqueo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Tween al 0,1 % durante 2 días a 4 °C. Se almacenaron las placas a -20 °C hasta su uso. Se aclaró una placa de microvaloración recubierta con anticuerpo contra CD36 3 veces con 340 µl de tampón de aclarado por pocillo usando el programa 12. El último aclarado se termina sin aspiración del tampón de aclarado, que se decanta en primer lugar inmediatamente antes de aplicar los patrones (reserva de EDTA-plasma) y las muestras (con posibles controles) e inmediatamente antes de la adición de reactivo 5.

Patrones

Se centrifuga sangre con EDTA de 100 sujetos de la toma de muestras rutinaria a 3000 G durante 10 min, se retira la parte superior del plasma pipeteando y se combinan. Se congela la reserva-plasma en alícuotas de 350 µl y se usan diluciones como curvas de calibrado. Se usan otras reservas de plasma con EDTA como controles de ensayo internos superiores e inferiores. El coeficiente de variación intraensayo, que se calculó a partir de una serie de 76 determinaciones individuales de la misma muestra, fue del 10 %, y calculado a partir de determinaciones dobles del control alto en 15 días diferentes, fue del 6 %. El coeficiente de variación interensayo, calculado a partir de los controles en cada serie realizada, fue del 16,4 %. Sólo se aceptaron series donde los controles estaban en el intervalo de +/-1,96 x DT (interensayo).

Procedimiento para ensayo ELISA

Se aclara una placa de microvaloración en el Elx50. Se aplican patrones, controles, muestras y tampón de dilución en filas dobles, 100 µl/pocillo. Se anotan las posiciones de las aplicaciones. Se cubre la placa de microvaloración con película plástica y se incuba durante 60 min en una mesa de agitación.

Se aclara la placa en el Elx50. Se añaden 100 µl de sc-9154 biotinilado por pocillo, se cubre con película plástica y se incuba 60 min en una mesa de agitación. Se aclara la placa en el Elx50.

Se añaden 100 µl de solución POD-avidina por pocillo. Se cubre con película plástica y se incuba durante aproximadamente 30 min en una mesa de agitación. Se aclara la placa en el Elx50. En una vitrina extractora, se añaden 100 µl de TMB por pocillo. Se cubre con película plástica, se incuba durante aproximadamente 10 min en una mesa de agitación. Se finaliza la reacción con 100 µl de ácido fosfórico por pocillo (en una vitrina extractora). Se cubre con película plástica hasta su lectura.

Medida

Se leen las extinciones a 450 nm y 620 nm en un aparato Multiscan antes de que transcurran 60 min desde la finalización de la reacción.

Cálculo

Spline cúbicas con escala lineal en ambos ejes. Se usan diluciones de reserva con EDTA como curva de calibrado y se expresan los resultados con relación a la reserva de plasma con EDTA. Tampón de dilución de ELISA: tampón fosfato 10 mmol/l con 0,145 mol/l de NaCl, a pH 7,4

Ejemplo 2

Expresión del gen CD36 en placas ateroescleróticas

Tabla 1. CD36 se expresó de forma diferente en placas obtenidas de pacientes con ateroesclerosis carotídea asintomática (n=4) en comparación con sintomática (n=4). 5 de 5 juegos de sondas del Affimetrix (matriz de genoma humano U133A 2.0) detectaron CD36 (Hs. 120949)

* asintomáticos frente a sintomáticos

ID de UniGene	Nombre del gen	Símbolo del gen	Proporción*
Hs.120949	antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I receptor de trombospondina)	CD36	0,38
Hs.120949	antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I receptor de trombospondina)	CD36	0,22
Hs.120949	antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I receptor de trombospondina)	CD36	0,14
Hs.120949	antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I receptor de trombospondina)	CD36	0,14
Hs.120949	antígeno CD36 (receptor de colágeno tipo I receptor de trombospondina)	CD36	0,07

Ejemplos 3 a 5

Pacientes

Se trató a sesenta y dos pacientes consecutivos con estenosis carotídea interna de alto grado (≥ 70 %) con endarterectomía carotídea (EAC, 53 pacientes) o angioplastia carotídea con implante de endoprótesis (ACE, 9 pacientes) (tabla 2). El estudio incluía 19 (31 %) mujeres y 43 (69 %) hombres, de 65,5 años de edad (intervalo de

44-83 años). Se clasificó a los pacientes en dos grupos en función de sus síntomas. Dieciséis (26 %) pacientes habían padecido síntomas clínicos tales como apoplejía, accidente isquémico transitorio (AIT) o amaurosis fugaz homolateral por arteria carótida interna estenósica en los últimos 2 meses, mientras que 46 (74 %) pacientes tuvieron síntomas más de 2 meses antes (n=22) o nunca habían padecido síntomas como los explicados anteriormente (n=24) (tabla 2). Las estenosis carotídeas se diagnosticaron y clasificaron usando dúplex a color precerebral y angiotomografía de acuerdo con criterios de consenso (Anderson *et al. Stroke.* 2000; Grant EG *et al. Radiology.* 2003;229:340-346).

Las estenosis carotídeas asintomáticas se detectaron durante exploraciones clínicas de pacientes con arteriopatía coronaria (APC), arteriopatía coronaria periférica o apoplejía/AIT más de seis meses antes. También se dividieron en dos grupos las placas, en función de la ecogenia de la placa en la exploración ecográfica de acuerdo con procedimientos descritos anteriormente (European Carotid Plaque Study, *Eur J Vase Endovasc Sung.* 1995; 10: 23-30; Mathiesen EB et al, *Circulation.* 2001 ;103: 2171-2175), y se clasificaron como ecolucentes o ecógenas/heterogéneas. Se realizaron ecografía tríplex de arterias precerebrales, exploración clínica neurológica y difusión cerebral-resonancia magnética nuclear ponderada (RMN) en un plazo de dos días antes y el día después de los procedimientos. Se excluyeron de todas las partes del estudio los pacientes con enfermedades inflamatorias concomitantes tales como infecciones y trastornos autoinmunitarios, o hepatopatías o nefropatías. Los protocolos fueron aprobados por la comisión regional de ética y se obtuvo el consentimiento informado firmado de todos los individuos.

Tabla 2. Variables iniciales en pacientes de acuerdo con los # síntomas clínicos y meses transcurridos desde los síntomas (n=62)

	≤ 2 meses (n=16)	**> 2 meses o ausencia de síntomas (n=46)**	**p**
Edad, años	66 (7,8)	65 (9,3)	,98
Sexo masculino*	12 (75)	31 (67)	,57
Grado de estenosis, %	80 (80-95)	80 (70-95)	,65
Placa carotídea ecolucente*	7 (43,8)	13 (28,3)	,25
Isquemia en RMN cerebral (n=53)	11 (68,8)	31 (67,4)	,94
Índice de masa corporal, kg/m^2	26,7 (20,4-35,5)	25,8 (19-35,5)	,72
Tratados con EAC*	15 (93,8)	38 (82,6)	,28
Presión sanguínea sistólica, mmHg	151 (110-196)	150 (110-194)	,60
Presión sanguínea diastólica, mmHg	73 (32-99)	80 (49-101)	,59
Diabetes mellitus*	4 (25)	10 (22)	,79
Tratamiento con estatinas	13 (81,3)	41 (89,1)	,42
Actualmente fumador*	7 (43,8)	25 (54,3)	,74
Neopterina, nmol/l	8,7 (4,9-18,0)	9,1 (5,7-60,3)	,48
PCR, mg/l	3,5 (1,0-39,0)	5 (0,6-28,0)	,93
Recuento leucocitario total, 10^9/l	8,3 (4,0-12,1)	7,5 (3,8-11,1)	,31
Fibrinógeno, g/l	4,0 (2,9-6,6)	3,9 (2,6-6,9)	,87
Colesterol, mmol/l	4,3 (3,6-5,9)	4,4 (2,8-7,5)	,68
Colesterol HDL, mmol/l	1,3 (0,7-1,9)	1,2 (0,8-2,5)	,82
Triglicéridos, mmol/l	1,4 (0,6-3,8)	1,5 (0,7-3,7)	,31
LDL (n=49)	2,6 (2,0-4,0)	2,6 (1,5-5,1)	,46
HbA1c, %	5,7 (5,2-6,9)	5,8 (0,9-8,8)	,95
β-tromboglobulina, Ul/ml	53,3 (26,7-142,1)	54,8 (15,4-268,5)	,61
Recuento plaquetario, 10^9/l	225,5 (132-391)	261 (168-441)	,10

Los síntomas clínicos incluyen apoplejía, AIT o amaurosis fugaz homolateral por arteria carótida interna estenósica. Los números son medias aritméticas (DT) o *números (porcentajes) no ajustados.

Protocolo de toma de muestras de sangre

Se extrajo sangre venosa periférica en tubos con EDTA sin pirógenos que se sumergieron inmediatamente en hielo fundido y se centrifugaron a 2.500 g durante 25 minutos a 4 °C en un plazo de 20 minutos para obtener plasma pobre en plaquetas. Se almacenaron todas las muestras a -80 °C y se descongelaron una sola vez.

Inmunohistoquímica

Se tiñeron secciones fijadas con acetona de placas ateroescleróticas carotídeas, extraídas de pacientes durante endarterectomías carotídeas, usando IgG anti-CD3 humana (DakoCytomation, Glostrup, Dinamarca) monoclonal de ratón anti-CD36 humana (FA6-152, Novus Biologicals, Littleton, CO), IgG policlonal de ratón purificada por afinidad anti-macrófagos humanos (calprotectina) (MCA874G, Serotec Ltd., Oxford, RU) anti-actina de músculo liso humana (DakoCytomation) e IgG de oveja anti-factor de von Willebrand de rata (Cedarlane, Ontario, Canadá). Se realizó el seguimiento de los anticuerpos primarios con IgG anti-ratón o anti-oveja biotiniladas (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las inmunorreactividades se amplificaron adicionalmente usando complejos de avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain Elite kit, Vector Laboratories). Se usó diaminobencidina como el cromógeno en un sistema comercial potenciado por metales (Pierce Chemical, Rockford, IL). Las secciones se contratiñeron con hematoxilina. La omisión del anticuerpo primario sirvió como control negativo.

Inmunoensayo ligado a enzimas de CD36 soluble (ELISA)

Se recubrieron placas de ELISA durante la noche a 4 °C con anticuerpo de cabra de captura (sc5522)-CD36 (0,1 µg/ml), seguido del bloqueo con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y Tween al 0,1 % durante 2 días a 4 °C. Se almacenaron las placas a -20 °C hasta su uso. Se biotiniló el anticuerpo de detección sc9154 como se describe en otros sitios (Glintborg D *et al.* publicado en línea antes de su impresión el 13 de noviembre de 2007). Todos los anticuerpos eran de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Una reserva de EDTA-plasma de 100 sujetos de la toma de muestras rutinaria sirvió como plasma de referencia y se aplicó a diluciones crecientes en duplicados. Otras reservas de EDTA-plasma sirvieron como controles superiores e inferiores y se usó PBS como control de fondo. Se aplicaron muestras de paciente a diluciones apropiadas en duplicados. Después de 1 hora de incubación a temperatura ambiente, se aclararon los pocillos y de aplicó anti-CD36 (sc9154) biotinilado y se incubó durante 30 minutos. Después del aclarado, se añadió micropocillo de sustrato de peroxidasa TMB (KemEnTec, Copenhague, Dinamarca). Se finalizó la reacción con ácido fosforoso y se determinaron las extinciones a 450 nm y 620 nm en un aparato Multiscan (Thermo, Langenselbold, Alemania). Se calcularon las absorciones con relación a la reserva de referencia de plasma con EDTA y se expresaron como unidades relativas. Se permitió una desviación de los controles de 1 SO del valor verdadero. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo a largo plazo fueron del 6 % y el 16 %, respectivamente.

Varios

Se determinaron los niveles de proteína C reactiva (PCR) mediante un ensayo inmunoturbidimétrico potenciado con partículas de alta sensibilidad en una plataforma modular (Roche Diagnostic, Basilea, Suiza). Se midieron las concentraciones de parámetros lipídicos y HbA1c por procedimientos de laboratorio rutinarios descritos anteriormente. Se midieron los niveles plasmáticos de neopterina y B-tromboglobulina (D-TG) por ELISA obtenidos de IBL Hamburg (Hamburgo, Alemania) y Diagnostica Stago (Asnieres, Francia), respectivamente.

Análisis estadísticos

Para la comparación de 2 grupos de individuos, se usó la prueba de la U de Mann-Whitney. Al comparar 3 grupos de individuos, se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. En caso de encontrar una diferencia significativa, se usó la prueba de la U de Mann-Whitney para calcular la diferencia entre cada par de grupos. Se calcularon los coeficientes de correlación (r) mediante la prueba de correlación de Spearman. Se usó la prueba exacta de Fisher para comparar proporciones. Se calculó la relación entre variables usando el análisis de regresión lineal y binaria para variables dependientes categóricas y continuas, respectivamente. Se consideró que los valores de probabilidad (bidimensionales) era significativos a un valor de <0,05.

Ejemplo 3

CD36 en plasma y estabilidad de las placas

En contraste con los de la PCR y la neopterina, los niveles plasmáticos de la sCD36 fueron significativamente mayores en aquellos que tuvieron síntomas relacionado con su estenosis carotídea en los últimos dos meses en comparación con los demás pacientes (2,17 [0,58-4,74] frente a 1,27 [0-6,03], p=0,019, los datos de dan en unidades relativas como medianas e intervalos). Además, al dividir a los pacientes en tres grupos en función de sus últimos síntomas clínicos (es decir, síntomas en los últimos 2 meses [n=16], síntomas en los últimos 3-6 meses [n=15] o placas asintomáticas, es decir, ningún síntoma o síntomas más de 6 meses antes [n=31]), el primer grupo presentó niveles plasmáticos de sCD36 significativamente elevados en comparación los otros dos grupos (figura 2). Dentro del grupo de pacientes en conjunto, los niveles plasmáticos de sCD36 estaban significativamente correlacionados con los recuentos leucocitarios totales (r=0,43, p<0,02) y el fibrinógeno (r=-0,40, p<0,02). Sin embargo, después del ajuste de estos parámetros, sCD36 seguía siendo un predictor significativo de síntomas clínicos de las placas en los últimos dos meses (p=0,049, CI: 1,0-2,7). Se ha informado anteriormente de niveles plasmáticos de sCD36 elevados en diabetes tipo 2 y en individuos obesos, pero en el presente estudio no se ha observado relación entre sCD36 y el IMC, la aparición de diabetes mellitus o el control glucémico (es decir, HbA1c) (datos no mostrados).

Se ha demostrado anteriormente que existe la CD36 en una forma soluble en el plasma, con niveles elevados en pacientes con diabetes tipo 2 y en pacientes con el síndrome del ovario poliquístico en relación con factores de riesgo para ateroesclerosis tales como la resistencia a la insulina y el control glucémico (Handberg A *et al. Circulation.* 2006;114:1169-1176; Glintborg D *et al. Diabetes Care.* publicado en línea antes de su impresión el 13 de noviembre de 2007. En el presente estudio, se ampliaron estos descubrimientos mostrando una relación más directa entre los niveles plasmáticos de sCD36 y la naturaleza de la lesión ateroesclerótica, independientemente del IMC y de la aparición del diabetes. Por tanto, aunque no se observaron diferencias en los marcadores de riesgo tradicionales de cardiovasculopatías o los marcadores establecidos de inflamación sistémica y activación plaquetaria entre aquellos con enfermedad sintomática en la arteria carótida en los 2 meses anteriores y los demás pacientes con ateroesclerosis carotídea, los niveles plasmáticos de sCD36 estaban significativamente elevados en el primer grupo de pacientes. Sin establecer ninguna restricción teórica, una posible fuente celular de sCD36 en estos pacientes, con base en la observación anterior del aumento de los niveles de ARNm de CD36 en placas carotídeas sintomáticas combinado con los presentes datos que muestran una inmunotinción fuerte de CD36 en macrófagos en placas sintomáticas en comparación con las asintomáticas, puede llevar a pensar que los niveles plasmáticos elevados de sCD36 podrían reflejar el aumento de la liberación desde la lesión sintomática inestable.

Ejemplo 4

CD36 en plasma y morfología de las placas

El aspecto de las placas en la ecografía o ecogenia se puede clasificar, en principio, en placas con ecos de nivel bajo, con una cubierta delgada y a menudo incompleta de la superficie luminal (placa ecolucente) y placas con ecos de nivel medio y alto, que a menudo reflejan un mayor contenido en tejido fibroso denso y calcificación (placas ecógenas/heterogéneas). Estaban disponibles datos sobre la morfología de las placas de 59 de los pacientes y, como se puede observar en la figura 4, los pacientes con placas ecolucentes (n=20) tendían a tener a niveles de sCD36 más altos en comparación con aquellos con placas ecógenas/heterogéneas (n=39, p= 0,09).

Ejemplo 5

Expresión de CD36 en la lesión carotídea

La fuente celular de los niveles plasmáticos de sCD36 en pacientes con lesiones carotídeas sintomáticas no está clara, pero recientemente se ha identificado el CD36 como uno de los 87 genes que estaba notablemente regulado por incremento en placas carotídeas sintomáticas, lo que indica que la propia placa podría contribuir a los niveles plasmáticos de sCD36 elevados en estos pacientes. Para dilucidar adicionalmente estas cuestiones, se realizaron análisis inmunohistoquímicos en placas carotídeas de 2 pacientes con enfermedad sintomática (<2 meses) y 2 pacientes con enfermedad asintomática (figura 6). La tinción de secciones seriadas de estas lesiones ateroescleróticas mostró inmunotinción anti-CD36 en placas de pacientes sintomáticos que se localizaban en el núcleo rico en lípidos de la placa (figura 6A) con una inmunotinción fuerte contra macrófagos positivos para calprotectina (figura 6B). Se observó una intensidad de la inmunorreactividad de CD36 diferentes en la región del núcleo y las regiones con una inmunotinción anti-CD36 muy débil o nula, como en el centro acelular del núcleo, mientras que otras regiones presentaron una inmunotinción más intensa. Como se demuestra en la figura 6, las regiones de la placa adyacentes al medio presentaban la inmunorreactividad de CD36 más fuerte. Sin embargo, no se observó nada de inmunotinción anti-CD36 fuera del núcleo. También se observó inmunotinción de CD36 en regiones ricas en lípidos, positivas para calprotectina en lesiones de pacientes con enfermedad asintomática, pero en estos pacientes, las placas ateroescleróticas estaban menos avanzadas y la región con inmunotinción positiva para CD36 era más pequeña que en lesiones de pacientes con enfermedad sintomática.

Se cree que la CD36 desempeña un papel crítico en el inicio y la progresión de lesiones ateroescleróticas por medio de su capacidad para unirse e internalizar LDL modificadas atrapadas en la pared arterial, facilitando la formación de células espumosas de macrófagos ingurgitados con lípidos (Col-lot-Teixeira S *et al. Cardiovasc Res.* 2007;75:468-477; Tuomisto TT *et al. Atherosclerosis.* 2005;180:283-291. De hecho, estudios anteriores han informado de la expresión de CD36 acelerada en paralelo con la progresión de la ateroesclerosis 6, especialmente localizada en macrófagos de gran tamaño espumosos (Nakata A *et al. Artehoscler Thromb Vase Biol.* 1999;19:1333-1339. El descubrimiento del presente estudio de la inmunotinción fuerte de CD36 en placas sintomáticas en comparación con las asintomáticas, principalmente localizada en macrófagos cargados con lípidos del núcleo graso de la placa ateroesclerótica, respalda adicionalmente una relación entre CD36 potenciada y la ateroesclerosis avanzada. Además, los niveles plasmáticos de sCD36 estaban notablemente elevados en aquellos con síntomas relacionados con su estenosis carotídea de los últimos dos meses en comparación con otros pacientes. Los mecanismos para la liberación de CD36 en su forma soluble no están claros actualmente, pero se ha sugerido que los niveles plasmáticos de sCD36 podrían servir como biomarcador de afecciones con expresión de CD36 alterada, tales como niveles elevados de lipoproteínas modificadas e inflamación de grado bajo (Tuomisto TT *et al. Atherosclerosis.* 2005;180:283-291).

Además, se ha relacionado la apoptosis de células espumosas con la desestabilización de placas y la formación de trombos con el desarrollo subsiguiente de episodios isquémicos agudos (Littlewood TD y Bennett. *Curr Opin Upidol.* 2003;14:469-475) y se puede especular con que la apoptosis de macrófagos cargados con lípidos puede dar lugar a

la liberación potenciada de CD36. Por lo tanto, es tentador plantear la hipótesis de que el aumento de los niveles plasmáticos de sCD36 en pacientes con placas carotídeas sintomáticas recientes, con una relación dependiente en el tiempo con los síntomas agudos, refleja al menos parcialmente la liberación intensificada de sCD36 durante la desestabilización de la placa.

La CD36 no sólo se expresa en monocitos y macrófagos, sino también en células endoteliales Adachi H y Tsujimoto M. *Prog Lipid Res.* 2006;45:379-404 y plaquetas (Ikeda H. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 1999;74:99-104. Recientemente, Podrez y colaboradores propusieron que la CD36 plaquetaria podría ser un sensor del estrés oxidativo y un modulador de la activación de las plaquetas, promoviendo la trombosis en condiciones hiperlipidémicas (Podrez EA *et al. Nat Med.* 2007;13:1086-1095) tal como durante la interacción entre plaquetas y una lesión ateroesclerótica inestable. En contraste con la sCD36, no se ha descubierto ninguna relación entre los niveles plasmáticos de PCR, neopterina y beta-TG, que son marcadores fiables de inflamación sistémica y activación de monocitos/macrófagos y plaquetas, respectivamente. Es posible que la capacidad de sCD36 para reflejar la inestabilidad de las placas y la enfermedad sintomática pueda reflejar su capacidad para poner de manifiesto varios procesos patogénicos implicados en la estabilización de placas, tales como la activación de plaquetas y monocitos/macrófagos, así como episodios patogénicos dentro de la lesión tales como apoptosis de células espumosas e interacciones entre plaquetas y la placa ateroesclerótica. Se propone que la sCD36 en plasma es un marcador de inestabilidad de la placa y ateroesclerosis carotídea sintomática, posiblemente al menos en parte como consecuencia de la liberación de CD36 a la circulación desde la capa infiltrada con células espumosas superpuesta al núcleo graso, y que esta liberación se intensifica durante la ruptura de la placa. Los resultados del presente estudio sugieren que sCD36 predice episodios cardiovasculares futuros.

Referencias

Anderson GB, Ashforth R, Steinke DE, Ferdinandy R, Findlay JM. CT Angiography for the detection and characterization of carotid artery bifurcation disease, *Stroke.* 2000; 31:2168-2174

Grant EG, Benson CB, Moneta GL, Alexandrov AV, Baker JD, Bluth EI, Carroll BA, Eliasziw M, Gocke J, Hertzberg BS, Katarick S, Needleman L, Pellerito J, Polak JF, Rholl KS, Wooster DL, Zierler E. Carotid artery stenosis: gray-scale and doppler US diagnosis—Society of Radiologists in Ultrasound Consensus Conference, *Radiology.* 2003;229:340-346

European Carotid Plaque Study G, Carotid artery plaque composition— relationship to clinical presentation and ultrasound B-mode imaging, *Eur J Vase Endovasc Surg.* 1995; 10: 23-30

Mathiesen EB, Bonaa KH, Joakimsen O. Echolucent plaques are associated with high risk of ischemic cerebrovascular events in carotid stenosis: the Tromso study, *Circulation.* 2001;103: 2171-2175

Handberg A, Levin K, Hojlund K, Beck-Nielsen H. Identification of the oxidized low-density lipoprotein scavenger receptor CD36 in plasma: A novel marker of insulin resistance. *Circulation.* 2006;114:1169-1176

Glintborg D, Hojlund K, Andersen M, Henriksen JE, Beck-Nielsen H, Handberg A. Soluble CD36 and risk markers of insulin resistance and atherosclerosis are elevated in polycystic ovary syndrome and significantly reduced during pioglitazone treatment. *Diabetes Care.* publicado en línea antes de su impresión el 13 de noviembre de 2007.

Collot-Teixeira S, Martin J, McDermott-Roe C, Poston R, McGregor JL CD36 and macrophages in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2007;75:468-477

Tuomisto TT, Riekkinen MS, Viita H, Levonen AL, Yla-Herttuala S. Analysis of gene and protein expression during monocyte-macrophage differentiation and cholesterol loading-cDNA and protein array study. *Atherosclerosis.* 2005;180:283-291.

Nakata A, Nakagawa Y, Nishida M, Nozaki S, Miyagawa J, Nakagawa T, Tamura R, Matsumoto K, Kameda-Takemura K, Yamashita S, Matsuzawa Y. CD36, a novel receptor for oxidized low-density lipoproteins, is highly expressed on lipidladen macrophages in human atherosclerotic aorta. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 1999;19:1333-1339.

Littlewood TD, Bennett MR. Apoptotic cell death in ateroesclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:469-475.

Adachi H, Tsujimoto M. Endothelial scavenger receptors. *Prog Lipid Res.* 2006;45:379-404.

Ikeda H. Platelet membrane protein CD36. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 1999;74:99-104.

Podrez EA, Byzova TV, Febbraio M, Salomon RG, Ma Y, Valiyaveettil M, Poliakov E, Sun M, Finton PJ, Curtis BR, Chen J, Zhang R, Silverstein RL, Hazen SL Platelet CD36 links hyperiipidemia, oxidant stress and a prothrombotic phenotype. *Nat Med.* 2007;13:1086-1095

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para diagnosticar placas ateroescleróticas como inestables y/o diagnosticar estenosis provocada por placas ateroescleróticas inestables en un individuo, comprendiendo dicho procedimiento, en una muestra de sangre de dicho individuo,

(i) determinar la concentración de un polipéptido de CD36 soluble,

(ii) correlacionar dicha concentración determinada en i) con un nivel de referencia y

(iii) basándose en dicha correlación de acuerdo con ii), diagnosticar dichas placas ateroescleróticas como inestables y/o diagnosticar estenosis provocada por placas ateroescleróticas inestables.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha muestra es una muestra sin células.

3. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha muestra es una muestra de plasma.

4. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que un aumento de la concentración de CD36 de al menos 1,15 del nivel de referencia es una indicación de una placa ateroesclerótica en progresión.

5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha concentración de dicho polipéptido de CD36 o parte del mismo se determina en

(i) una secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 4,

(ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 % de identidad de secuencia con una secuencia de (i).

6. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la concentración de polipéptido de CD36 se determina

(i) proporcionando un anticuerpo anti-CD36,

(ii) exponiendo la muestra al anticuerpo anti-CD36

(iii) opcionalmente, exponiendo dicho complejo CD36-anticuerpo a al menos un anticuerpo adicional dirigido contra dicho complejo CD36-anticuerpo y

(iv) detectando y cuantificando la cantidad de dicho anticuerpo.

7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido de CD36 se determina

(i) proporcionando un anticuerpo anti-CD36,

(ii) exponiendo la muestra que se va a estudiar al anticuerpo anti-CD36 unido a una fase sólida,

(iii) opcionalmente, exponiendo el complejo CD36-anticuerpo a un segundo anticuerpo anti-CD36 y

(iv) detectando y cuantificando la cantidad del anticuerpo que se une a CD36.

8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en el que dicho procedimiento inmunológico es un inmunoensayo enzimático ELISA en fase sólida en el que en la etapa (iii) se pone en contacto la muestra con dicho anticuerpo unido a una fase sólida.

9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la fase sólida es una placa de microvaloración.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que dicho anticuerpo anti-CD36 se selecciona del grupo que consiste en anticuerpos monoclonales y policlonales específicos frente a CD36.

11. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que dicho anticuerpo anti-CD36 se selecciona del grupo de anticuerpos que consiste en sc5522 (CD36 (N-15), IgG de cabra (epítopo N-terminal (h)), sc9154 (CD36 (H-300), IgG de conejo (epítopo 1-300 (h)) y sc7309 (CD36 (SMf), IgM de ratón).

12. Uso de un kit para el procedimiento como se define en la reivindicación 1, que comprende al menos un anticuerpo dirigido contra un polipéptido de CD36 o parte del mismo.

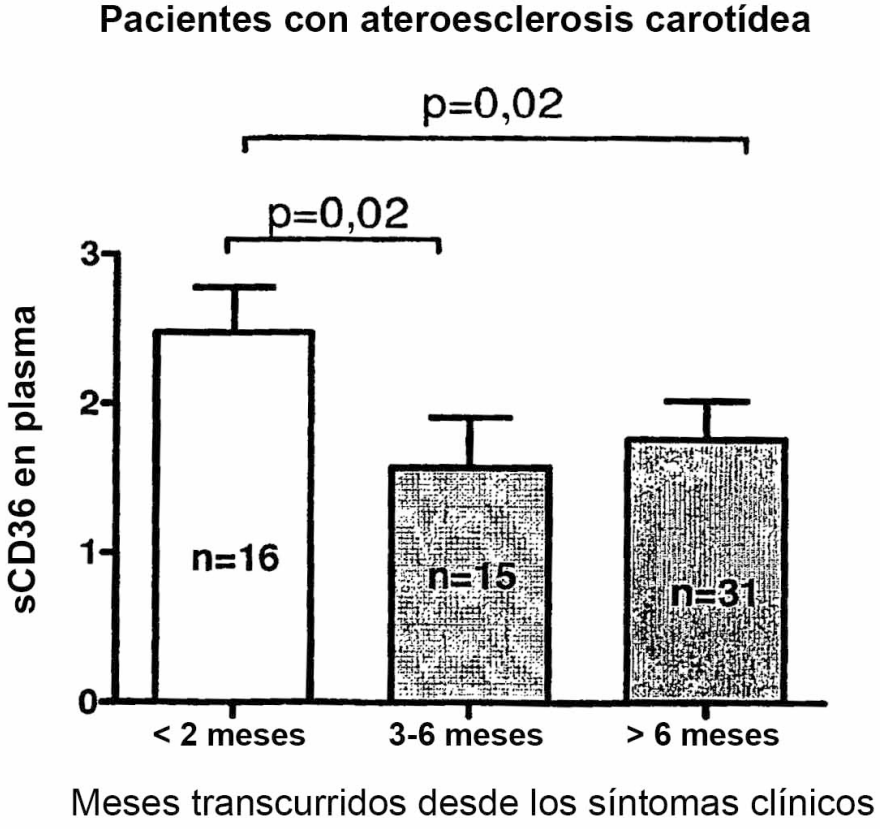
Pacientes con ateroesclerosis carotídea
p=0,02
p=0,02
sCD36 en plasma
3
2
1
0
n=16
n=15
n=31
< 2 meses
3-6 meses
> 6 meses
Meses transcurridos desde los síntomas clínicos

Fig. 1

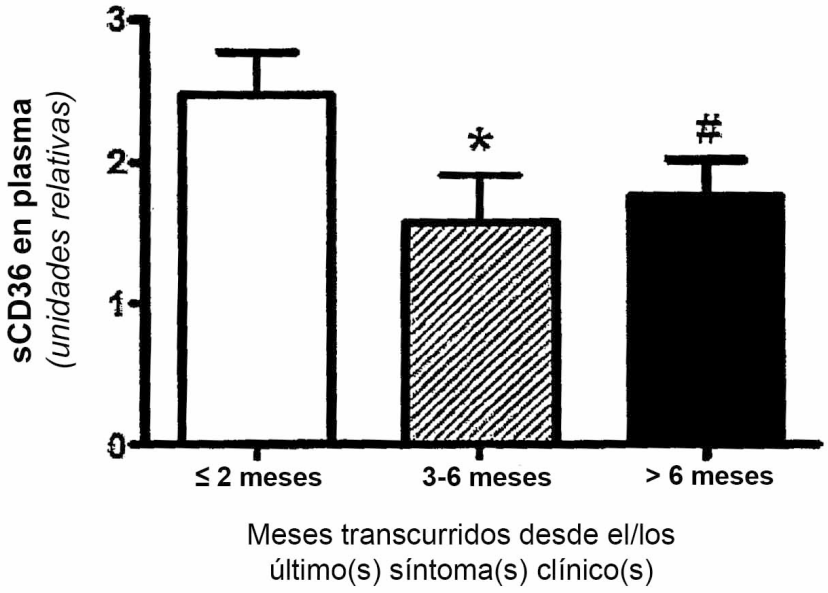
sCD36 en plasma
(unidades relativas)
3
2
1
0
*
#
≤ 2 meses
3-6 meses
> 6 meses
Meses transcurridos desde el/los
último(s) síntoma(s) clínico(s)

Fig. 2

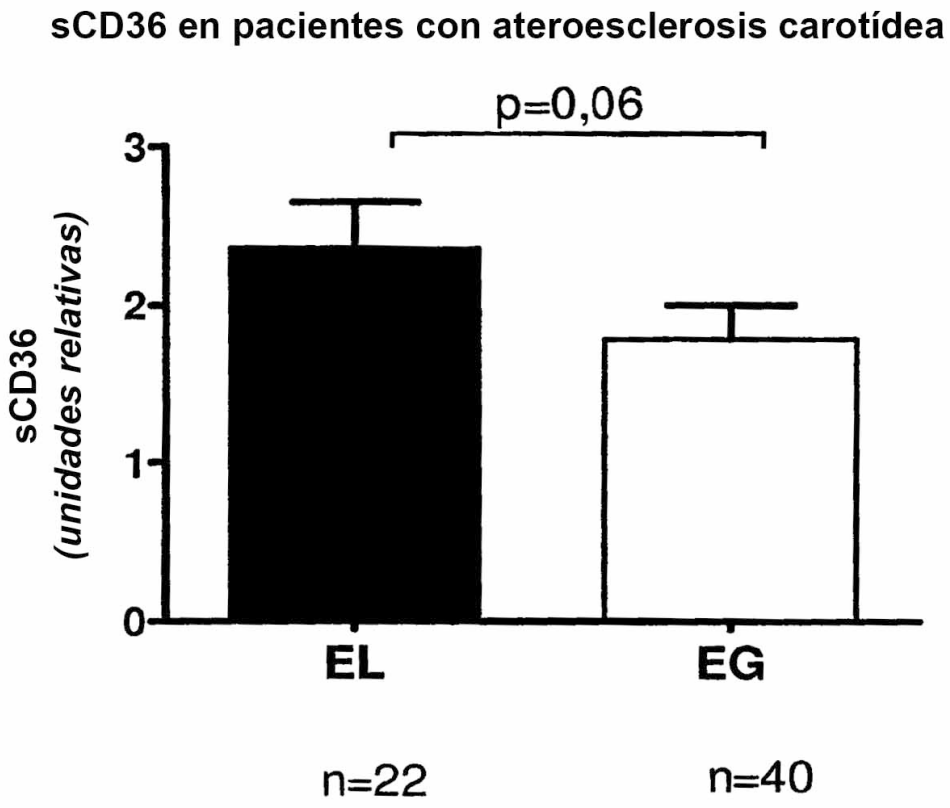
sCD36 en pacientes con ateroesclerosis carotídea
p=0,06
sCD36
(unidades relativas)
3
2
1
0
EL
EG
n=22
n=40

Fig. 3

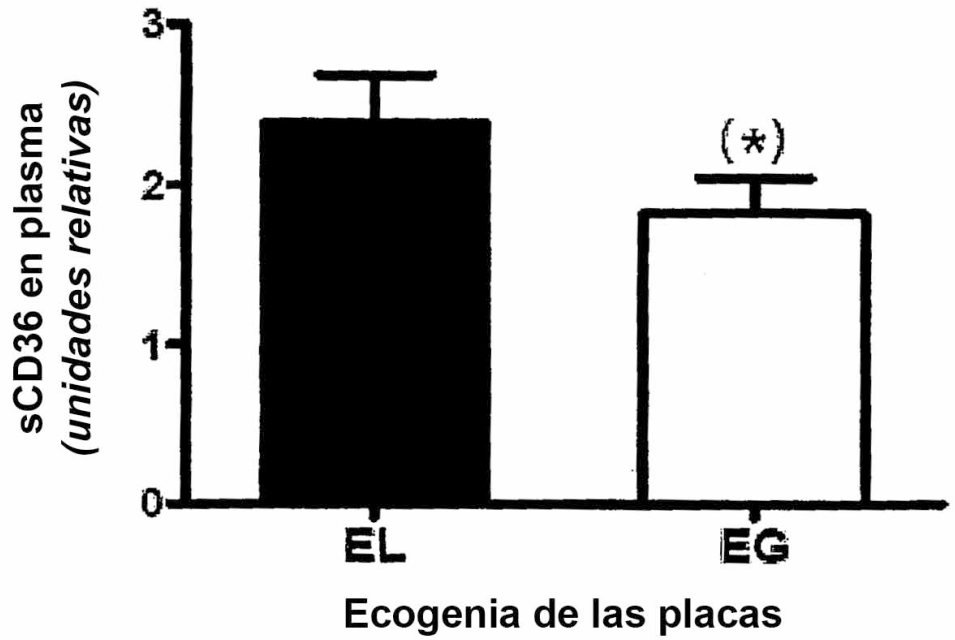
sCD36 en plasma
(unidades relativas)
3
2
1
0
(*)
EL
EG
Ecogenia de las placas

Fig. 4

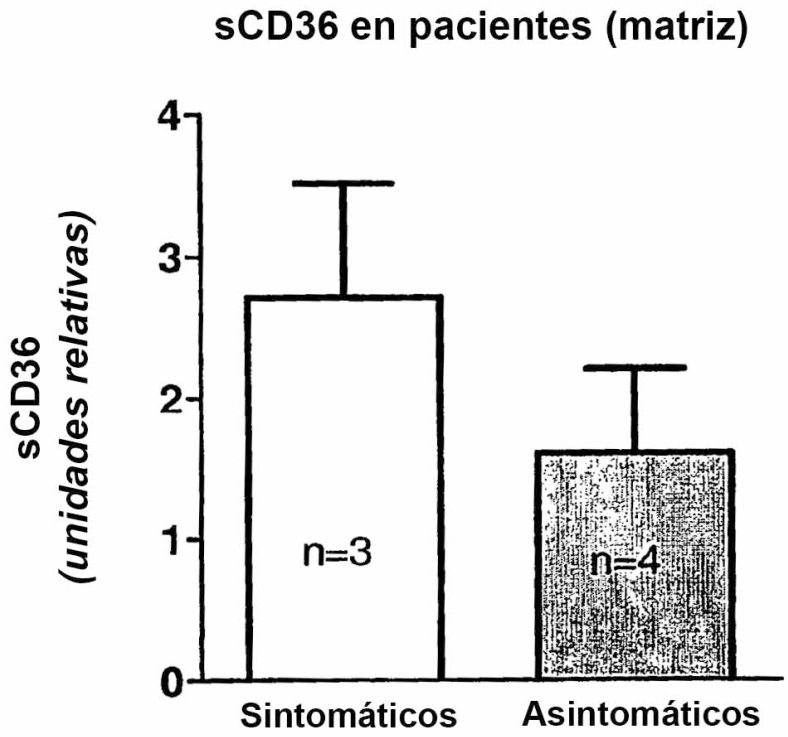
sCD36 en pacientes (matriz)
sCD36
(unidades relativas)
4
3
2
1
0
n=3
n=4
Sintomáticos
Asintomáticos

Fig. 5

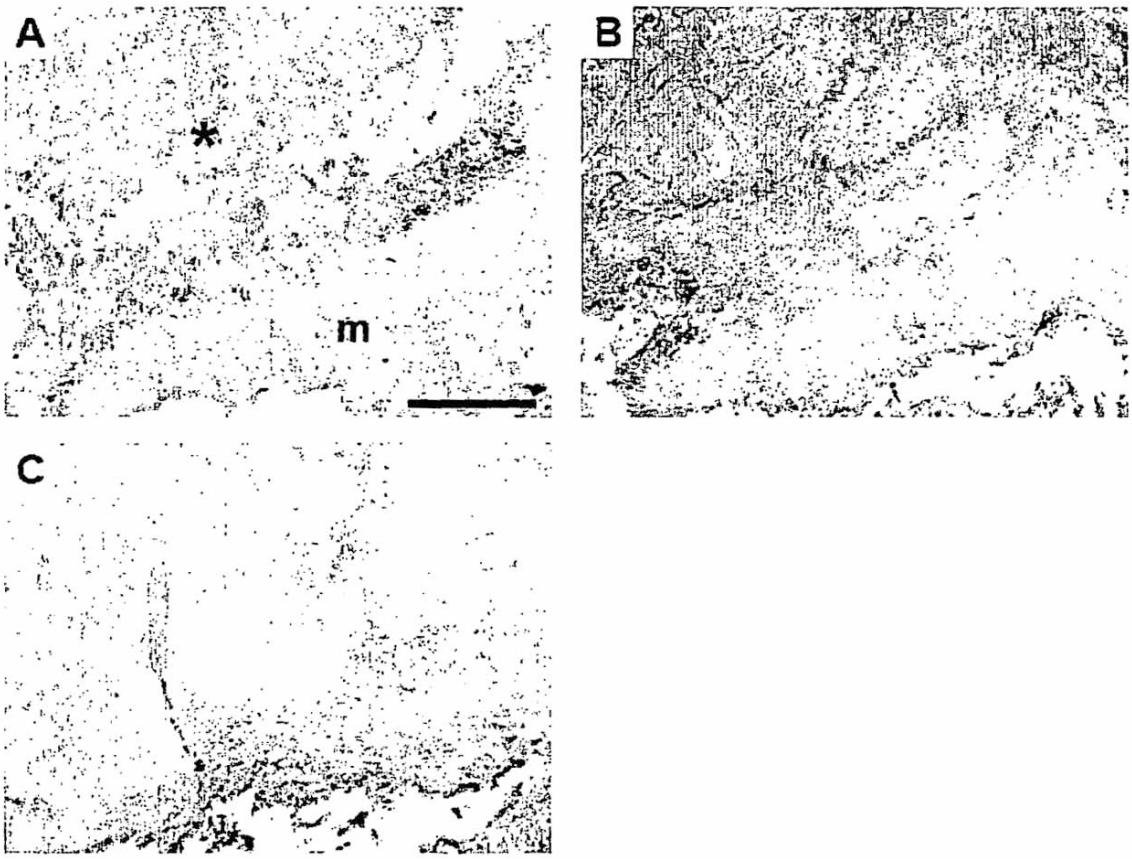

Fig. 6